

**PAS_C als signaltransduzierende Domäne
des Sensorproteins DcuS
von *Escherichia coli***

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Pia Degreif-Dünnwald

geb. am 16.07.1979 in Stuttgart Bad-Cannstatt

Mainz, 19.07.2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methode.....	13
3.1 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Primer von <i>Escherichia coli</i>	13
3.2 Zucht und Medien	31
3.3 Medien und Puffer.....	32
3.4 Molekulargenetische Methoden	41
3.5 Biochemische Methoden.....	52
3.6 Datenbanken, Programme und Weblinks	57
4. Ergebnisse	59
4.1 Funktionsuntersuchungen von DcuS: Expression von <i>dcuB</i>	60
4.2 Bedeutung von PAS _C für die Funktion von DcuS: Deletion der cytoplasmatischen PAS-Domäne.....	61
4.3 Funktionsmutanten von PAS _C : Einfluss auf die Expression von <i>dcuB</i>	64
4.3.1 Gerichtete und ungerichtete Mutagenese der PAS _C -Domäne.....	64
4.3.2 Qualitativer Nachweis der Funktion von DcuS	67
4.3.3 Drei Klassen von DcuS-Varianten	69
4.3.4 ON-Mutationen der PAS _C -Domäne.....	70
4.3.5 OFF-Mutationen der PAS _C -Domäne	74
4.3.6 Stille Mutationen in PAS _C : Expression von <i>dcuB</i>	75
4.3.7 Lage der PAS _C -Mutanten.....	78
4.3.8 Effekt von Malat auf die Funktion von DcuS	79
4.3.9 Einfluss der ON-Mutation N248D auf andere Mutationen der PAS _C -Domäne	81
4.3.10 Phänotyp von Kombinationsmutanten in PAS _P und PAS _C	82
4.4 Einfluss einer <i>dcuB</i> -Deletion und von DcuB-Varianten auf PAS _C -Varianten	84
4.5 Protein-Protein Interaktion	86
4.5.1 Interaktionsstudien mit dem Bacterial Two-Hybrid-System	87
Homo-Dimerisierung von DcuS: Bedeutung von PAS _C	87
4.5.2 Einfluss von Effektoren auf die Interaktion von Vollängen- und verkürztem DcuS93	

4.6. <i>In vivo</i> Fluoreszenzmikroskopie	96
4.6.1 Lokalisation von DcuS und DcuS -Varianten in <i>E. coli</i>	96
4.6.2 Einfluss verschiedener Substrate auf die Lokalisation von DcuS-YFP	100
4.6.3 Einfluss von Fumarat auf die Lokalisation von DcuS-YFP-Varianten	101
4.7 <i>In vivo</i> Crosslinking mit DSS	103
4.8 NMR-Strukturuntersuchungen von verkürztem DcuS	106
5. Diskussion	111
5.1 PAS-Domänen	111
5.2 PAS _C ist die signalweiterleitende Domäne	113
5.3 Die Homo-Dimerisierung von PAS _C	122
5.4 Funktionsmodell von DcuS	126
6. Literatur	129
7. Anhang	139
8. Veröffentlichungen	154

1. Zusammenfassung

Das fakultativ anaerobe Enterobakterium *Escherichia coli* ist in der Lage sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen C_4 -Dicarboxylate zur Energiekonservierung zu nutzen. Das Zweikomponentensystem DcuSR, bestehend aus der membrangebundenen Sensor-Histidinkinase DcuS und dem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR. Dieser reguliert in Abhängigkeit von C_4 -Dicarboxylaten die Expression der Gene der Fumaratatmung. DcuS liegt als Oligomer in der Membran vor und erkennt mit der periplasmatischen Sensordomäne (PAS_P) C_4 -Dicarboxylate. Die Signaltransduktion erfolgt vom Periplasma über die Transmembrandomäne, die cytoplasmatischen PAS-Domäne (PAS_C) bis hin zur Kinase-Domäne. Dort kommt es zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes. Die Phosphorylgruppe wird anschließend auf den Responseregulator DcuR übertragen und führt zur Induktion der Zielgene.

PAS-Domänen kommen in allen Reichen des Lebens vor und spielen eine wichtige Rolle als vielseitige Sensoren und für die Signalweiterleitung in Multidomänen-Proteinen. Die Funktion und Struktur der PAS_C -Domäne von DcuS war bis jetzt ungeklärt. Durch gerichtete und ungerichtete Mutagenese wurden 70 PAS_C -Varianten identifiziert. Die PAS_C -Domäne setzt sich aus 111 Aminosäuren zusammen, von diesen Resten wurden 48% mutiert. Die Funktionsmutanten konnten in drei Klassen eingeteilt werden: Klasse 1 beinhaltet 18 ON-Varianten, wobei unter anderem DcuS-N248D und DcuS-N304D eine fumaratunabhängige *dcuB*-Expression zeigten. Klasse 2 setzt sich aus fünf OFF-Varianten und Klasse 3 aus 47 stillen DcuS-Varianten zusammen.

Die Reste N248 und N304 spielen eine wichtige Rolle für die Funktion und Struktur von DcuS. In Kombination mit N248D oder N304D zeigten OFF-Varianten aus PAS_P und PAS_C wieder Aktivität. Varianten von DcuS mit N248D oder N304D zeigten im verkürzten DcuS-Konstrukt DcuS- PAS_C eine abgeschwächte Homo-Dimerisierung oder Interaktion der Monomere. Nur die Variante DcuS-N248D hatte einen Verlust der Homo-Dimerisierung im Vollängen-DcuS zur Folge. *In vivo* Crosslinking-Untersuchungen bestätigten eine wildtypische Oligomerisierung der Vollängen-DcuS Varianten. *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie zeigte für DcuS-N248D und DcuS-N304D eine homogene Verteilung in der Zellmembran und eine vom Wildtyp abweichende polare Lokalisation. Diese Untersuchungen zeigen, dass PAS_C keine sensorische PAS-Domäne ist, sondern eine Rolle im Signaltransfer spielt. ON-Varianten führen zu einer Destabilisierung von PAS_C , was die Signalweiterleitung an die Kinase stimuliert. Die Deletion der PAS_C -Domäne zeigte eine permanente Stimulierung der Kinase-Domäne. Somit ist PAS_C für die Ruhigstellung der Kinase verantwortlich. Es wurde ein Funktionsmodell erstellt, in dem PAS_C das Signal von PAS_P nach Transfer über die Membran von TM2 aufnimmt und an die Kinase vermittelt. Bei der Signalweiterleitung spielt eine Destabilisierung des PAS_C -Dimers eine wichtige Rolle.

2. Einleitung

Mikroorganismen erkennen eine große Vielfalt von externen und internen Stimuli und können sich somit schnell auf wechselnde Umweltbedingungen einstellen. Das fakultativ anaerobe Enterobakterium *Escherichia coli* ist in der Lage unter aeroben und anaeroben Bedingungen C₄-Dicarboxylate wie Fumarat, Succinat und Malat zur Energiekonservierung zu nutzen (Engel *et al.*, 1994; Unden & Kleefeld, 2004). Der C₄-Dicarboxylatstoffwechsel wird durch verschiedene Elektronenakzeptoren auf der Transkriptionsebene reguliert. Eine strikte Hierarchie regelt die Auswahl der Elektronenakzeptoren, damit eine maximale ATP-Ausbeute gewährleistet ist (Gunsalus *et al.* 1992; Unden & Bongaerts, 1997). In Anwesenheit von Sauerstoff betreibt *E. coli* aerobe Atmung, dabei werden C₄-Dicarboxylate als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet. Die Substrate werden dazu im Citratzyklus vollständig zu CO₂ oxidiert. In Abwesenheit von Sauerstoff, in der anaeroben Atmung nutzt das Bakterium unter anderem Nitrat, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Fumarat als alternative Elektronenakzeptoren.

Die Umstellung von aerober auf anaerobe Atmung steht hauptsächlich unter der Kontrolle des globalen Sauerstoffsensors FNR (Fumarat/Nitrat Regulator) (Shaw *et al.*, 1982, Guest *et al.*, 1996) und des Zweikomponentensystem ArcBA (Aerobe Respirationskontrolle) (Lynch & Lin, 1988; Gunsalus *et al.*, 1994). FNR stellt ein cytoplasmatisches Einkomponentensystem dar, das in Abwesenheit von Sauerstoff in seiner dimeren aktiven Form als Transkriptionsfaktor Strukturgene des anaeroben Stoffwechsels und der Gärung aktiviert, während ArcBA die Gene der aeroben Atmung reprimiert (Iuchi *et al.*, 1989). Die Gene der Nitratatmung werden durch das homologe NarXL- und NarQP-Zweikomponentensystem induziert. Zusätzlich reprimieren NarXL und NarPQ die Gene der anaeroben Atmung und einige Gene der Gärung (Stewart, 1993; Stewart & Rabin, 1995) (Abb. 1).

Unter anaeroben Bedingungen kommen der Citratzyklus und die aerobe Atmungskette zum Stillstand. Dann können C₄-Dicarboxylate nach Umwandlung zu Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden (Gunsalus, 1992). Die Elektronen eines geeigneten Elektronendonors, z.B. Glycerin, werden auf Fumarat übertragen, das zu Succinat reduziert wird. Die Reduktion von Fumarat wird von der membranständigen Fumaratreduktase katalysiert. Succinat kann unter anaeroben Bedingungen nicht weiter verstoffwechselt werden und wird anschließend aus der Zelle transportiert.

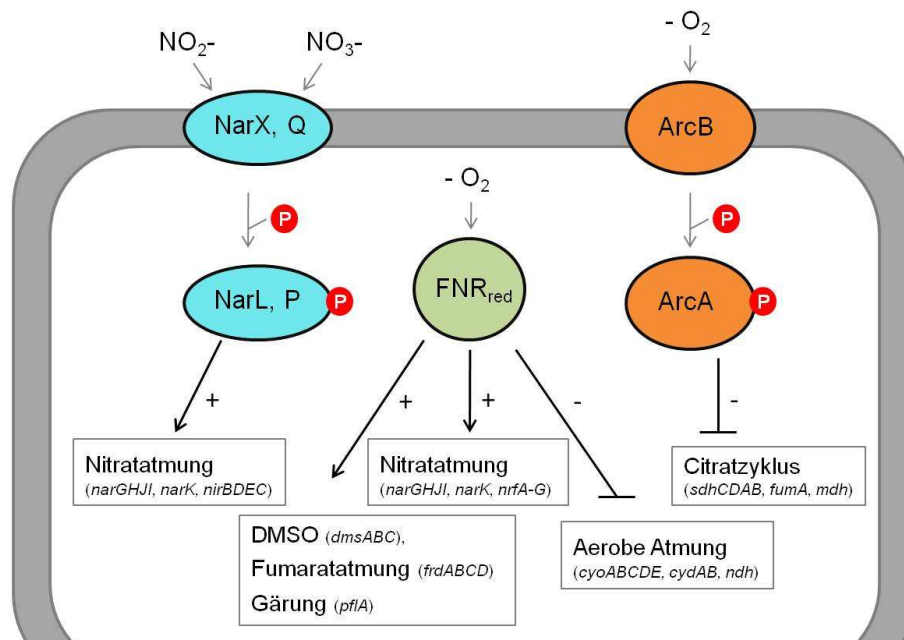


Abb. 1: Schematische Darstellung des Energiestoffwechsels in *Escherichia coli* (abgeändert nach Uden & Bongaertz, 1997). Jeder Regulator kann in Abhängigkeit vom Zielgen als Aktivator (+) oder als Repressor (-) dienen. Eine strikte Hierarchie und kombinatorische Kontrolle regelt die Auswahl der Elektronenakzeptoren, damit eine maximale ATP-Ausbeute gewährleistet ist. Abkürzungen: ArcBA (Aerobic respiratory control), Chinoloxidase bo_3 (*cyoABCDE*), Chinoloxidase *bd* (*cydAB*), DMSO-Reduktase (*dmsABC*), Fumarat-Nitrat-Reduktaseregulator (FNR), Fumarase (*fumA*), Fumaratreduktase (*frdABCD*), Formiat-abhängige-Nitritreduktase (*nrfA-G*), Malatdehydrogenase (*mdh*), Nitratreduktase-Regulator (Nar), Nitratreduktase (*narGHJI*), NADH-Dehydrogenasell (*ndh*), NADH-abhängige Nitritreduktase (*nirBDEC*), Nitrat/Nitrit-Antiporter (*narK*), Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflA*), Succinatdehydrogenase (*sdhCDAB*).

Die Aufnahme, der Gegentauch und der Efflux von C_4 -Dicarboxylaten unter anaeroben Bedingungen erfolgt über die sekundären Transporter DcuA, DcuB und DcuC (dicarbonylate uptake) (Engel *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998; Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996) (Abb. 2). Die Transporter DcuA und DcuB gehören der DcuAB-Familie an und kommen bei anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien vor (Kleefeld & Uden, 2004). Das Gen *dcuB* wird unter anaeroben Bedingungen in der Fumaratatmung, während *dcuA* konstitutiv exprimiert wird (Golby *et al.*, 1998; Zientz *et al.*, 1996). DcuB besitzt von den Dcu-Transportern die höchste Transportaktivität. Der Antiporter transportiert Fumarat im elektroneutralen Austausch mit Succinat in die Zelle, er wird unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von C_4 -Dicarboxylaten exprimiert (Engel *et al.*, 1994). DcuB fungiert zusätzlich als Co-Sensor der Sensorkinase DcuS und beeinflusst damit die Expression von *dcuB* und anderen DcuSR-regulierten Genen (Kleefeld *et al.*, 2009). Die Detektion der C_4 -Dicarbonsäure Fumarat im Medium erfolgt über das Zweikomponentensystem DcuSR (dicarbonylate uptake). Über dieses System, wird die Expression der Gene der Fumaratatmung stimuliert (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999). Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme von externen

Substraten durch den C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA (dicarboxylate transport) (Gutowski *et al.*, 1975; Davies *et al.*, 1999), welcher mit dem Sensor DcuS interagiert (Witan *et al.*, unveröffentlicht).

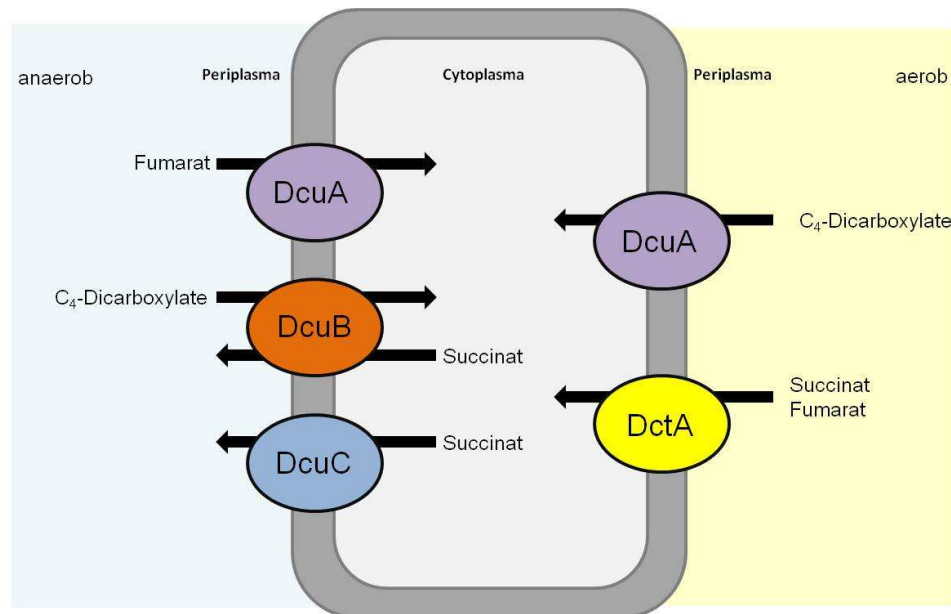


Abb. 2: C₄-Dicarboxylat-Transporter in *Escherichia coli*. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme von Succinat und anderen C₄-Dicarboxylaten hauptsächlich durch den Transporter DctA und den konstitutiv exprimierten Transporter DcuA. Unter anaeroben Bedingungen werden Aufnahme, Gegentauch und Efflux von C₄-Dicarboxylaten durch Dcu-Transporter katalysiert.

2.1 Das Zweikomponentensystem DcuSR von *Escherichia coli*

Die Expression der Gene der Fumaratatmung wird durch externe C₄-Dicarboxylate wie Fumarat, Succinat und Malat, aber auch Citrat induziert. Die Induktion erfolgt durch das Zweikomponentensystem DcuSR (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Kneuper *et al.*, 2005). Zielgene von DcuSR sind die Strukturgene der Fumaratreduktase (*frdABCD*), die Gene des anaeroben Fumarat/Succinat-Antiporters DcuB (*dcuB*) und der aeroben Fumarase B (*fumB*) (Abb. E3). *fumB* wird mit *dcuB* cotranskribiert und unterliegt somit einer indirekten Kontrolle durch DcuSR. Unter aeroben Bedingungen steht der C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA ebenfalls unter der Transkriptionskontrolle von DcuSR.

Zweikomponentensysteme stellen einen wichtigen Typ von Sensorsystemen dar, mit deren Hilfe Mikroorganismen wechselnde Umweltbedingungen erkennen und verarbeiten können (West & Stock, 2001; Mascher *et al.*, 2006). Ein typisches Zweikomponentensystem besteht aus einer membranständigen Sensorkinase und einem intrazellulären Responseregulator. Im

Genom von *Escherichia coli* wurden 30 unterschiedliche Zweikomponentensysteme mit 30 Sensorkinasen und 32 Responseregulatoren identifiziert (Mizuno, 1997; Stock *et al.*, 2000).

Das Zweikomponentensystem DcuSR von *E. coli* (Abb. 3) besteht aus der membranständigen Sensor-Histidinkinase DcuS und dem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR. DcuS besitzt zwei Transmembranhelices und eine periplasmatische Sensordomäne (PAS_P), die eine PAS-Domäne darstellt. Hinter der Transmembranhelix 2 befindet sich die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C), abschließend folgt eine Histidinkinase.

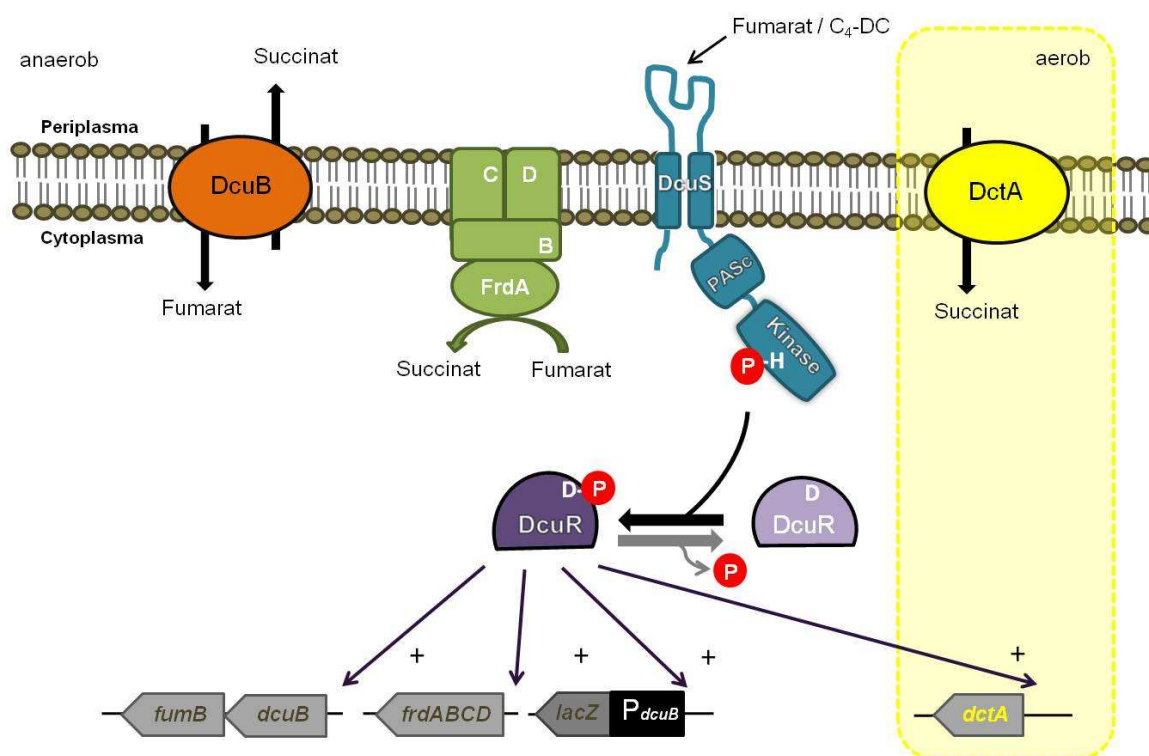


Abb. 3: Modell des Zweikomponenten-Regulationssystems DcuSR von *E. coli*. Die membranständige Sensorkinase DcuS erkennt C₄-Dicarboxylate über die periplasmatische Domäne. Dies führt zur Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes (H) der Kinasedomäne. Der Phosphatrest (P) wird auf den Aspartatrest (D) des Responseregulators DcuR übertragen und bedingt eine Konformationsänderung. Als DNA-Bindeprotein induziert DcuR die Expression der anaerob und aerob regulierten Gene des DcuSR-Regulons. Abkürzungen: *fumB*: Fumarase B; *dcuB*: Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB; *frdABCD*: Fumaratreduktase; *dctA*: Succinat-Transporter DctA; *dcuB*'-*lacZ*: Reporterfusion; DcuS: Sensorkinase; DcuR: Responseregulator

Die periplasmatische Sensordomäne PAS_P von DcuS erkennt externe C₄-Dicarboxylate oder Citrat über positiv geladene oder polare Aminosäurereste (Kneuper *et al.*, 2005; Krämer *et*

al., 2007). Die Struktur von PAS_P ist durch NMR-Strukturanalyse und Röntgenkristallographie aufgeklärt (Pappalardo *et al.*, 2003; Cheung & Hendrickson, 2008). Die Bindung der Signalmoleküle an die Substratbindungsstelle verursacht eine Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes (H-349) der Histidinkinase. Als Phosphatdonor dient ATP. Der Phosphatrest wird auf einen konservierten Aspartatrest (D-56) des Responsregulators übertragen. Dadurch erfährt DcuR eine Konformationsänderung und funktioniert als Transkriptionsfaktor. DcuR enthält ein Helix-Turn-Helix DNA-Binde-Motiv zur Bindung an die Zielpromotorregionen. DcuR stimuliert dann die Expression der regulierten Gene (Zientz *et al.*, 1998; Janausch *et al.*, 2004). Der C₄-Dicarboxylatsensor DcuS gehört zusammen mit dem Citratsensor CitA innerhalb der Histidinkinasen zur CitA-Histidinkinasen Familie (Bott *et al.*, 1995; Golby *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002) und ist in der Lage, neben C₄-Dicarboxylaten auch die Tricarbonsäure Citrat zu erkennen (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999, Krämer *et al.*, 2007). CitA ist der hoch-affine Citrat-Sensor des Zweikomponentensystems CitAB, welches die Gene des Citratstoffwechsel induziert (Kaspar *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002b). Durch Mutationen in periplasmatischen Domäne konnte DcuS in einen Citrat-spezifischen Sensor umgewandelt werden (Krämer *et al.*, 2007).

2.2 Per-ARNT-Sim Domänen

Per-ARNT-Sim (PAS) Domänen wurden zuerst anhand von Sequenzhomologien der Proteine von *Drosophila* Period (Per), Single-minded (Sim) und von Vertebraten Arcyl Hydrogen Rezeptor Nuclear Transporter (ARNT) (Nambu *et al.*, 1991) identifiziert. PAS-Domänen findet man in einer Vielzahl eukaryotischer und prokaryotischer Sensorproteine (Zhulin *et al.*, 1997; Taylor & Zhulin 1999; Gu *et al.*, 2000, Finn *et al.*, 2006; Möglich *et al.*, 2009). Laut SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) sind 14597 Proteine bekannt, die insgesamt 22276 PAS-Domänen enthalten (SMART 04/11). Doch ist nur von den wenigsten die Struktur und Funktion bekannt. Im Gegensatz zu vielen anderen Sensordomänen sind PAS-Domänen meist im Cytoplasma lokalisiert (Taylor & Zhulin, 1999). Es gibt auch periplasmatische PAS-Domänen, z.B. PAS_P von DcuS_{Ec} und CitA_{Kp}, die als extrazelluläre Sensordomäne Substrate erkennen und reversibel binden können (Reinelt *et al.*, 2003; Pappalardo *et al.*, 2003; Cheung & Hendrickson, 2008; Kneuper *et al.*, 2010). PAS-Domänen sind Komponenten von signaltransduzierenden Proteinen, die als universale Signalsensoren, weiterleitende Domänen und Mittelpunkte für Protein-Protein-Interaktionen dienen (Möglich *et al.*, 2009, Campell *et al.*, 2010; Kneuper *et al.*, 2010; Slavny *et al.*, 2010;).

PAS-Domänen wurden zunächst als die homologe Region der Proteine Per, ARNT und Sim mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren identifiziert (Nambu *et al.*, 1991). Zusätzlich konservierte Regionen wurden zunächst als PAC-Motif (Ponting und Aravind, 1997) oder S₂-Boxen (Zhulin *et al.*, 1997) charakterisiert. Die erste dreidimensionale Struktur einer PAS-Domäne, die PAS-Domäne des photoaktiven gelben Proteins (PYP) aus *Halorhodospira halophila*, wurde 1995 von Borgstahl *et al.* veröffentlicht. Dabei wurde eine globale Faltung der PAS-Domäne identifiziert, die eine Länge von ca. 110 Aminosäuren aufwies und heute als PAS-Domäne bekannt ist (Hefti *et al.*, 2004). Neue PAS-Domänen werden meist über Strukturhomologien identifiziert (Finn *et al.*, 2006) oder mit Hilfe von Programmen, wie dem PSI-BLAST (Altschult *et al.*, 1997) analysiert. Eine Identifizierung über die Aminosäuresequenz ist aufgrund der schlechten Konservierung von unter 20% schwierig (Finn *et al.*, 2006). Nur neun Reste sind in PAS-Domänen gut konserviert (Taylor & Zhulin, 1999), darunter auch ein Rest, welcher sich zwischen dem zweiten β -Faltblatt und der zweiten α -Helix befindet. Dieser Rest ist zu 44% ein Asparagin, kann aber vor allem in Eukaryoten auch ein Aspartat- (21%) oder Serin-Rest (31%) sein (Taylor & Zhulin, 1999). Bis jetzt wurden ca. 60 Strukturen von PAS-Domänen in der Protein-Datenbank (PDB) hinterlegt. Charakteristisch für PAS-Domänen ist das zentrale, antiparallele β -Faltblatt Gerüst, welches sich aus drei β -Faltblättern zusammensetzt. Zusätzlich befinden sich N-terminal noch 2 β -Faltblätter. Diese fünf β -Faltblätter werden N- und C-terminal von mehreren, meist fünf α -Helices flankiert. Die Abbildung 4 zeigt die Sekundärstrukturen in PAS-Domänen und die typische Anordnung der β -Faltblätter von β_2 - β_1 - β_5 - β_4 - β_3 (Amezcuca *et al.*, 2002; Möglich *et al.*, 2009).

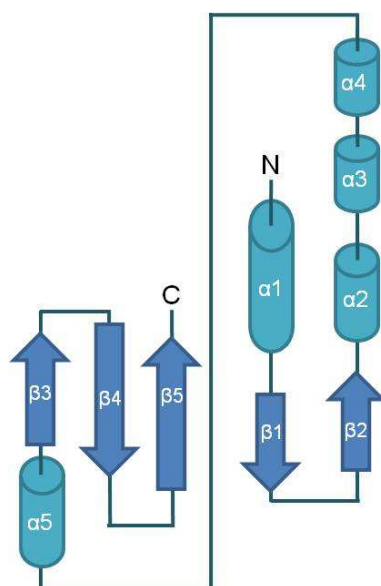


Abb. 4: Anordnung der Sekundärstrukturen in PAS-Domänen (abgeändert nach Möglich *et al.*, 2009). Die fünf β -Faltblätter weisen eine charakteristische Anordnung von β_2 - β_1 - β_5 - β_4 - β_3 in der PAS-Domäne auf und sind insgesamt von fünf α -Helices flankiert.

Viele der bekannten PAS-Domänen sind normalerweise in Dimeren organisiert oder stabilisieren die Dimerisierung von anderen Proteinen (Gu *et al.*, 2000; Chapman-Smith *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004). Somit begünstigen sie die Bildung von Dimeren und höher organisierte Oligomeren in vielen Proteinen (Taylor & Zhulin, 1999). PAS Monomere können sich auf verschiedene Weisen zusammenfinden um Dimere zu bilden (Ayer & Moffat, 2008). Einige PAS-Domänen bilden parallele Dimere, so dass die N-Termini jedes Monomers proximal sind (Key *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2008). Wieder andere PAS-Domänen nehmen verschiedene Orientierungen an (Ayer & Moffat, 2008). Dies führt zur Vermutung, dass die Interaktionsfläche von PAS Monomeren variabel ist. Viele PAS-Domänen sind in der Lage über hydrophobe Aminosäureresten an der äußeren Oberfläche der β -Faltblätter Homo- oder Heterodimere zu bilden. Zusätzlich können elektrostatische Interaktionen zwischen geladenen Resten in spiegelbildsymmetrischen β -Faltblättern der Monomere die Quartärstruktur beeinflussen (Card *et al.*, 2005).

Oligomerisierung ist ein wichtiger Teil der Funktion vieler Proteine mit PAS-Domänen. Mutationen von Aminosäure-Resten in den β -Faltblättern oder in den N- oder C-terminalen Regionen können die Funktion beeinflussen, während der oligomere Zustand beibehalten wird (Miyatake *et al.*, 2000). PAS-Domänen regulieren die Aktivität einer großen Auswahl von Effektor-domänen (Abb. 5). Bakterielle Proteine, können einzelne, doppelte oder multiple PAS-Domänen besitzen (Taylor & Zhulin, 1999; Hefti *et al.*, 2004, Möglich *et al.*, 2009) und sind oft mit anderen signalweiterleitenden Domänen, z.B. mit einer GAF-Domäne (Aravind und Ponting, 1997) oder einer HAMP-Domäne (Ma *et al.*, 2005) kombiniert. Eine generelle Aufgabe von PAS-Domänen besteht darin, die Affinität der Proteine zu identischen (homo-Oligomere) oder anderen Proteinen (hetero-Oligomere) zu modulieren (Möglich *et al.* 2009).

Für einzelne PAS-Domänen ist nachgewiesen, dass diese durch Veränderungen des Redoxstatus (Aer *E. coli* oder NifL *A. vinelandii*) zu einer Konformationsänderung im Protein führt, wodurch eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird (Repik *et al.*, 2000; Crosson & Moffat, 2001; Campell *et al.*, 2010; Slavny *et al.*, 2010). So wurden in den PAS-Domänen der Redoxsensoren Aer und NifL Aminosäure-Reste identifiziert, die in der Signaltransduktion involviert sind (Repik *et al.*, 2000; Campell *et al.*, 2010; Slavny *et al.*, 2010).

Es gibt Regionen in PAS-Domänen, die eine höhere Flexibilität bzw. Beweglichkeit aufweisen. In den flexiblen Regionen ist eine Bindung von prosthetischen Gruppen oder externen Liganden möglich (Repik *et al.*, 2000; Amezcua *et al.*, 2002; Key & Moffat, 2005; Slavny *et al.*, 2010). Diese Regionen befinden sich in der Mitte der PAS-Domäne (Vreede *et al.*, 2003; Pandini & Bonati, 2005). Nach Bindung mit Liganden oder Effektoren kann es in

diesem Bereich zu einer Änderung der Konformation kommen. PAS-Domänen sind an der Wahrnehmung von Sauerstoff (Gong *et al.*, 1998; Key and Moffat, 2005), Licht (Borgstahl *et al.*; 1995; Getzoff *et al.*, 2003) und Veränderung des Redoxpotential (Rebbapragada *et al.*, 1997; Repik *et al.*, 2000) beteiligt.

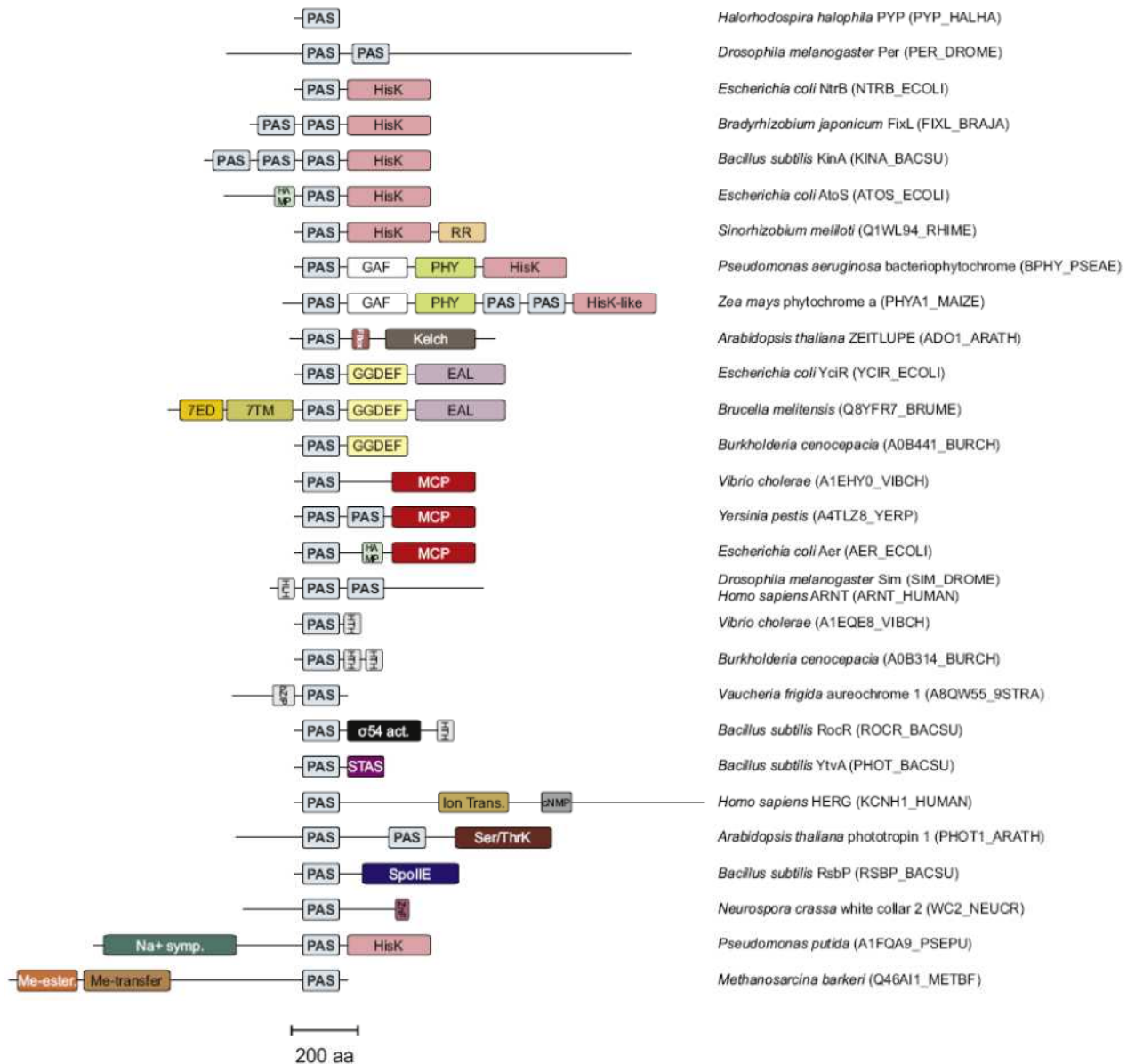


Abb. 5: Vielfalt von PAS-Domänen. Die Abbildung zeigt die vielfältige Architektur von 28 Proteinen mit PAS- und begleitenden Domänen (Möglich *et al.*, 2009). Die Skala kennzeichnet 200 Aminosäuren. Die Abkürzungen der Domänen sind beispielhaft zu sehen und sind hier nicht erläutert.

Es gibt drei Klassen von PAS-Domänen. Die erste Klasse beinhaltet gut untersuchte Cofaktor-bindende PAS-Domänen, die den Redoxstatus der Zelle erkennen. So bindet die PAS-Domäne des Sauerstoffsensors NreB reversibel ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster (Müllner *et al.*, 2008). Der Sauerstoffsensor FixL bindet in seiner PAS-Domäne ein Häm- (Gong *et al.*, 1998), und Aer und NifL ein FAD-Molekül (Repik *et al.*, 2000; Key *et al.*, 2007). Die zweite Klasse von PAS-Domänen setzt sich aus wenigen signalerkennenden PAS-Domänen zusammen. Diese befinden sich oft im Periplasma, binden und erkennen einen Effektor, wie die periplasmatische PAS-Domänen von DcuS und CitA (Kneuper *et al.*, 2010). Die dritte und größte Klasse der PAS-Domänen ist noch schlecht untersucht. Sie binden keinen Cofaktor oder Effektor und dienen nicht der Signalerkennung.

2.3 Die cytoplasmatische PAS-Domäne von DcuS

Die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) von DcuS gehört zu der dritten Klasse der PAS-Domänen. PAS_C befindet sich zwischen der zweiten Transmembranhelix und der cytoplasmatischen Kinase-Domäne (Abb. 6). PAS_C von DcuS umfasst den Bereich von Aminosäure 212 bis 323 (Etzkorn *et al.*, 2008). Mithilfe der Festkörper-NMR und des Programmes „Pspred“ konnte ein Strukturmodell der cytoplasmatischen PAS-Domäne von DcuS erstellt werden (Etzkorn *et al.*, 2008). PAS_C von DcuS besteht aus 5 α -Helices (α_1 - α_5) und 5 β -Faltblättern (β_1 - β_5) in der Reihenfolge $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2\alpha_3\alpha_4\alpha_5\beta_3\beta_4\beta_5$. Diese Sekundärstruktur ähnelt der PAS-Domäne von NifL aus *A. vinelandii* (Key *et al.*, 2007; Etzkorn *et al.*, 2008; Kneuper *et al.*, 2010) und FixL aus *Sinorhizobium meliloti* (Kneuper *et al.*, 2010).

Die Funktion der PAS_C -Domäne von DcuS wurde bis jetzt nicht geklärt. Es konnten keine prosthetischen Gruppen nachgewiesen werden (Abo-Amer *et al.*, 2005). Die cytoplasmatische PAS-Domäne erhöht die Autophosphorylierung der Histidinkinase, doch scheint sie nicht an der Modifikation von DcuS in Abhängigkeit des Redoxstatus oder C_4 -Dicarboxylaten beteiligt zu sein (Abo-Amer *et al.*, 2005). Vermutlich übt PAS_C keine sensorische, sondern eine signaltransduzierende Funktion aus. PAS_P von DcuS dagegen, stellt eine periplasmatische PAS-Domäne mit sensorischer Funktion dar, ähnlich der periplasmatischen Sensordomäne von CitA (Kneuper *et al.*, 2010).

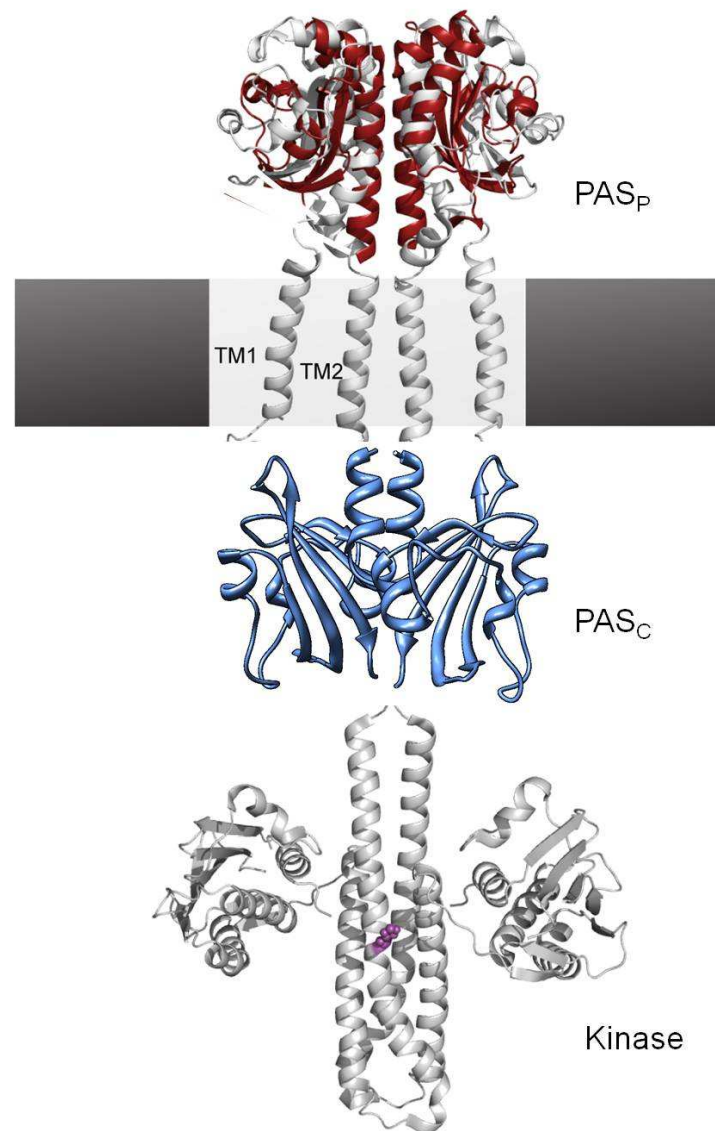


Abb. 6: Volllängen-Strukturmodell von DcuS (modelliert nach Etkorn *et al.*, 2008). Das Modell zeigt zwei alignierte Strukturen der periplasmatischen Signal-Domäne (PAS_p). Dargestellt in Weiß ist die ssNMR-Struktur von PAS_p (Pappalardo *et al.*, 2003) und in Rot die Kristallstruktur des dimeren Sensors CitA (Sevvana *et al.*, 2008). Die Abbildung zeigt das PAS_c-Dimer in Blau und die anhängende Kinase-Domäne (modelliert nach Marina *et al.*, 2005).

2.4 Ziel der Arbeit

Bis jetzt ist wenig über die Signalweiterleitung im Zweikomponentensystem DcuSR von *E. coli* bekannt. Ungeklärt ist, welche Funktion die cytoplasmatische PAS-Domäne von DcuS ausübt. Von anderen PAS-Domänen ist bekannt, dass sie z.B. Umweltveränderungen detektieren (Taylor & Zhulin, 1999), oder zur Stabilisierung des Proteins beitragen (Gu *et al.*, 2000). Entsprechend könnte PAS_c von DcuS für die Dimerisierung von DcuS zuständig sein,

oder diese stabilisieren. PAS_C könnte ebenfalls der Signaltransduktion von PAS_P zur Kinase-Domäne und somit als signalweiterleitendes Regulationsmodul fungieren.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels gerichteter und ungerichteter Mutagenese einzelner Aminosäuren der PAS_C-Domäne funktionell wichtige Reste zu identifizieren. Die Bedeutung der mutierten Aminosäurereste sollte durch funktionelle Untersuchung der entsprechenden Mutanten charakterisiert werden. Zur funktionellen Charakterisierung wurde die Rolle der Mutation in der Regulation, der Dimerisierung von DcuS und der Lokalisation von DcuS in der Zelle untersucht. Die Regulation wurde anhand der Expression der DcuSR anhängigen *dcuB*-Reporterfusion bestimmt. Die Oligomerisierung wurde mit Crosslinking Experimenten und die Proteininteraktion mit einem bakteriellen Two-Hybrid-System untersucht. DcuS zeigt eine polare Lokalisation in der Zelle. Die Bedeutung der PAS_C-Domäne für diese Lokalisation sollte untersucht werden.

3. Material und Methode

3.1 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Primer von *Escherichia coli*

Die Tabellen M1 bis M7 fassen die Stämme und Plasmide zusammen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. M1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stämme	Genotyp	Referenz
MC4100	F- araD139 Δ (argF-lac)U169, rpsL150, (Δ lacZ), relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B,F' hsdS gal1 DE3, mit IPTG- induzierbarer chromosomaler T7-RNA- Polymerase; Proteinüberproduktionsstamm	Studier & Moffat, 1986
C43(DE3)	spontane Mutation von BL21(DE3) zur Überproduktion von Membranproteinen	Miroux & Walker, 1996
IMW237	MC4100, λ (Φ (dcuB'-lacZ) hyb, Amp ^R	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW260	MC4100, (dcuB'-lacZ)hyb, bla ⁺ , Δ lacZ; aber dcuS::cam ^R	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW536	P1(IMW497) x IMW535, MC4100 (dcuB'-lacZ) dcuS::Spec ^R dcuB::Cam ^R	Kleefeld <i>et al.</i> , 2009
XL1-Blue	F-,recA1-,(mk+,rk-) supE44, endA1, thi-1, λ -, gyrA96,relA1, (lac-) [F-, proAB, lacIq, Z Δ M15 Tn10(Tetr)] Zellen zur gerichteten Mutagenese	Stratagene
BTH101	Reporterstamm cya ⁻ Two-Hybrid System, Rec ⁺ , F- cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Strr), hsdR2, mcrA1, mcrB1	Karimova <i>et al.</i> , 1998
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁺ , lacI ^q [lacZ Δ M15]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

Tab. M2: Expressionsvektoren

Plasmide	Genotyp	Referenz
pBAD30	pACYC ori, arabinose-inducible PBAD Promoter, Amp ^R	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pET28a	pBR322 ori, IPTG-induzierbar T7 Promoter, C- and N-terminaler Histag, Kan ^R	Novagen, Madison, USA

Tab. M3: Mutageneseplasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pMW114	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -R90A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW151	<i>dcuS</i> in pET28a, <i>Kan</i> ^R	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW181	pET28a mit <i>dcuS</i> (mit eigenem Promotor!) über <i>Xba</i> I / <i>Hind</i> III (2,2 kbp), <i>Kan</i> ^R	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW228	<i>dcuB</i> mit eigenem Promotor in pME6010 über <i>Eco</i> RI- <i>Xho</i> I, <i>Tet</i> ^R	Kleefeld <i>et al.</i> , 2009
pMW237	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -R147A, <i>Kan</i> ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW309	1003 bp <i>Nde</i> I- <i>Xho</i> I Fragment <i>dcuS</i> in pET28a	Etzkorn <i>et al.</i> , 2008
pMW318	pMW145, aber DcuS-Mutation PAS _P -H110A, <i>Kan</i> ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW319	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -F120M, <i>Kan</i> ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW351	pMW181, aber DcuS-Doppelmutation PAS _P -T101G, PAS _P -F120M, <i>Kan</i> ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW398	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -R107A, <i>Kan</i> ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW397	pMW228, aber DcuB-Mutation PAS _C -T394I; <i>Tet</i> ^R	Kleefeld <i>et al.</i> , 2009
pMW405	pMW228, aber DcuB-Mutation PAS _C -D398N, <i>Tet</i> ^R	Kleefeld <i>et al.</i> , 2009
pMW421	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Kan</i> ^R	Etzkorn <i>et al.</i> , 2008
pMW552	pMW309, aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Kan</i> ^R	Etzkorn <i>et al.</i> , 2008
pMW558	pMW318 (PAS _P -H110A), aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, DcuS-Doppelmutante, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW559	pMW318 (PAS _P -H110A), aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, DcuS-Doppelmutante, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW562	pMW398 (PAS _P -R107A), aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, DcuS-Doppelmutante, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW563	pMW398 (PAS _P -R107A), aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, DcuS-Doppelmutante, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW564	pMW421 (PAS _C -N248D), aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, Doppel- PAS _C -Mutante, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW631	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -Y215A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW632	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -Q229A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW633	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -K232A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW634	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW636	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -A317C, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW637	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -A317Y, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW638	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -A317D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW639	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I296A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW640	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I296C, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW641	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I296D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW667	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW668	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -V276C, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW669	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -V276D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW670	pMW309, aber DcuS-Mutation PAS _P -T101G, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW671	pMW309, aber DcuS-Mutation PAS _P -R147A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW712	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -N311A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW713	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -N311D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW733	pMW337, aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D (PAS _C +Kinase,	Diese Arbeit

	AS 215-543), <i>Kan^R</i>	
pMW734	pMW421 (PAS _C -N248D), aber DcuS-Mutation PAS _C -Q229A, Doppel-PAS _C -Mutante, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW740	pMW151 aber DcuS-Mutation PAS _P -N248D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW748	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -D323N, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW770	pMW309, aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW771	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -Q83A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW772	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -P111A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW773	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -D124A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW774	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -E133A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW776	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-M24A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW777	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-S26A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW778	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-L201A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW779	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-F189A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW780	pMW151, aber DcuS-Mutation TM2-V276A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW790	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -V99A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW791	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -N130A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW792	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -N130D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW793	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -A145D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW796	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -A145C, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW809	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-S186C+G190A (GxxxG-Motiv), <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW810	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -N256A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW811	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -N256D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW812	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-H271A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW813	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-G190A-G194A, (GxxxG-Motiv), <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW816	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -S274A+V277A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW816	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -V277A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW818	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -G140A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW819	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-G190A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW827	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-S186C, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW841	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-G194A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW849	pMW181, aber DcuS-Mutation TM1-A27G+S31C, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW850	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-S186A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW851	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-M191A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW852	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-W185A+F189A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW853	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-G194A+T198A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW854	pMW181, aber DcuS-Mutation N-Terminus-T20A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW864	pMW181, aber DcuS-Mutation N-Terminus-I22V, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW865	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-S186L, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW866	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -D124V, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW867	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -A317T, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW868	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I231T, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW869	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -R92H, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW870	pMW181, aber DcuS-Mutation TM1-S26R, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW871	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -L96Q, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit

pMW872	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -I125T, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW873	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -N156D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW874	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -D239G, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW913	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -L228A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW914	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I318A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW920	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -L246R, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW921	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -L246A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW922	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW923	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -V313A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW924	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -A237C, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW925	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -S319P, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW926	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -N246T, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW936	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -E213A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW937	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -P214A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW938	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -E216A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW939	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I217A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW940	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -L220A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW941	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW942	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -E222A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW943	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -Q225A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW944	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -D249A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW945	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -T320A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW946	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -F321A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW947	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -R322A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW956	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -S218A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW957	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -T219A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW958	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -S272A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW959	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -I315A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW962	pMW181, aber DcuS-Mutation TM2-V193A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW963	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _P -I125F, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW964	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -G234S, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW965	pMW181, aber DcuS-Mutation PAS _C -D278G, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1353	pMW181 aber DcuS-Doppelmutation PAS _P -H110A mit PAS _C -V276A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1354	pMW181 aber DcuS-Doppelmutation PAS _P -H110A mit PAS _C -L300A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1355	pMW181 aber DcuS-Doppelmutation PAS _P -H110A mit PAS _C -L220A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1356	pMW181 aber DcuS-Doppelmutation PAS _P -H110A mit PAS _C -D240A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1357	pMW181 aber Doppelmutante PAS _P -H110A mit PAS _C -I318A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1386	pMW181 aber DcuS-Doppelmutation PAS _C -N248D und PAS _C -L300A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit

Tab. M4: Plasmide für das Bacterial Two-Hybrid-System

Plasmide	Genotyp	Referenz
pKT25-zip	Derivat von pKT25, Leucine-Zipper von GCN4 (1) fusioniert mit T25-Fragment	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUTC18-zip	Derivat von pUT18C, Leucine-Zipper von GCN4 fusioniert mit T18- Fragment.	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pMW426	pKT25 mit <i>dcuS</i> , <i>Kan^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW427	pKT25 mit <i>dcuR</i> , <i>Kan^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW428	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW429	pUT18C mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW430	pUT18 mit <i>dcuR</i> , <i>Amp^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW431	pUT18C mit <i>dcuR</i> , <i>Amp^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW919	<i>dcuS</i> -pKNT25, <i>Kan^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW948	<i>dcuS</i> -TM2-pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 in pUT18 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW949	<i>dcuS</i> -TM2-pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 in pKNT25 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW950	<i>dcuS</i> - PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 in pUT18 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW951	<i>dcuS</i> - PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 in pKNT25 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW952	PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 in pUT18 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW953	PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 in pKNT25 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW954	Kinase-pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 330-539 in pUT18 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW955	Kinase-pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 330-539 in pKNT25 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW977	<i>dcuS</i> -TM2-pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _P -R107A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW978	<i>dcuS</i> -TM2-pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _P -R107A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit

3. Material und Methode

pMW979	<i>dcuS</i> -TM2-pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _P -H110A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW980	<i>dcuS</i> -TM2-pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _P -H110A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW981	<i>dcuS</i> -TM2-pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _P -F120A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW982	<i>dcuS</i> -TM2-pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-206 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _P -F120A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW983	PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW984	PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW985	PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW986	PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW987	PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW988	PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW989	PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW990	PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW991	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW992	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW993	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW994	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW995	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW996	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit

pMW997	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>Bam</i> H1 und <i>Eco</i> R1, aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW998	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>Bam</i> H1 und <i>Eco</i> R1, aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1009	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>Bam</i> H1 und <i>Eco</i> R1, aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1010	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>Bam</i> H1 und <i>Eco</i> R1, aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1011	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1012	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW429), aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1013	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1014	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW429), aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1015	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1016	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW429), aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1017	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1018	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW429), aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1019	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1020	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW429), aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1023	pKT25 mit <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -F221S, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1029	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -L228A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1030	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW429), aber DcuS-Mutation PAS _C -L228A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1031	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW427), aber DcuS-Mutation PAS _C -R322A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1032	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW426), aber DcuS-Mutation PAS _C -R322A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1033	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>Bam</i> H1 und <i>Eco</i> R1, aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1034	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>Bam</i> H1 und <i>Eco</i> R1, aber DcuS-Mutation PAS _C -L228A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit

3. Material und Methode

pMW1035	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -R322A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1036	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -R322A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1075	PAS _C -Kinase-pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-539 in pKNT25 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1076	PAS _C -Kinase-pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 211-539 in pKNT25 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1156	<i>dcuS</i> -pKNT25 über <i>Pst1</i> und <i>EcoR1</i> aus pMW428, aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1157	<i>dcuS</i> -pKNT25 über <i>Pst1</i> und <i>EcoR1</i> aus pMW428, aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1158	<i>dcuS</i> -pKNT25 über <i>Pst1</i> und <i>EcoR1</i> aus pMW428, aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1159	<i>dcuS</i> -pKNT25 über <i>Pst1</i> und <i>EcoR1</i> aus pMW428, aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1160	<i>dcuS</i> -pKNT25 über <i>Pst1</i> und <i>EcoR1</i> aus pMW428, aber DcuS-Mutation PAS _C -L228A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1161	<i>dcuS</i> -pKNT25 über <i>Pst1</i> und <i>EcoR1</i> aus pMW428, aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1162	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D	Diese Arbeit
pMW1163	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i> aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D	Diese Arbeit
pMW1164	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -V276A	Diese Arbeit
pMW1165	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A	Diese Arbeit
pMW1166	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -L228A	Diese Arbeit
pMW1167	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -L300A	Diese Arbeit
pMW1231	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW427), aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1232	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW427), aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1233	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW428), aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1236	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber D240A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW1237	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1240	<i>dcuS</i> -PAS _C -pKNT25: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -L220A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit

pMW1241	<i>dcuS</i> -PAS _C -pUT18: Verkürztes <i>dcuS</i> von AS 1-326 über <i>BamH1</i> und <i>EcoR1</i> , aber DcuS-Mutation PAS _C -L220A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1242	pKT25- <i>dcuS</i> (pMW427), aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1243	pUT18C- <i>dcuS</i> (pMW428), aber DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Amp</i> ^R	Diese Arbeit

Tab. M5: Plasmide für PAS_C-EX Experimente

Plasmide	Genotyp	Referenz
pMW1168	PAS _C -EX: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 209-324, (115 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1169	PAS _C -EX12: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 209-233, (24 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1170	PAS _C -EX13: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 209-253, (44 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1171	PAS _C -EX14: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 209-285, (66 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1172	PAS _C -EX45: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 285-324, (49 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1173	PAS _C -EX35: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 253-324, (71 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit
pMW1174	PAS _C -EX25: pMW181 mit <i>EcoR1</i> -Schnittstellen; Δ AS 233-324, (91 AS); <i>Kan</i> ^R	Diese Arbeit

Tab. M6: Plasmide für *in vivo* DSS-Crosslinking Experimente

Plasmide	Genotyp	Referenz
pMW967	<i>dcuS</i> (Cys ⁻) aus pMW336 über <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i> in pMW643 kloniert, Arabinose-induzierbar, <i>Amp</i> ^R , <i>Tet</i> ^R	Scheu <i>et al.</i> , 2010
pMW999	pMW967: <i>dcuS</i> (Cys ⁻) Arabinose-induzierbar, <i>Amp</i> ^R , <i>Tet</i> ^R , aber DcuS-Mutation PAS _C -N304D	Diese Arbeit
pMW1000	pMW967: <i>dcuS</i> (Cys ⁻) Arabinose-induzierbar, <i>Amp</i> ^R , <i>Tet</i> ^R , aber DcuS-Mutation PAS _C -F221A	Diese Arbeit
pMW1154	pMW967: <i>dcuS</i> (Cys ⁻) Arabinose-induzierbar, <i>Amp</i> ^R , <i>Tet</i> ^R , aber DcuS-Mutation PAS _C -V287A	Diese Arbeit
pMW1155	pMW967: <i>dcuS</i> (Cys ⁻) Arabinose-induzierbar, <i>Amp</i> ^R <i>Tet</i> ^R , aber DcuS-Mutation PAS _C -N248D	Diese Arbeit

Tab. M7: Plasmide für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Plasmide	Genotyp	Referenz
pEYFP	Vektor mit GFP-Protein-Variante YFP, <i>Amp^R</i> ; Clontech	Scheu <i>et al.</i> , 2008
pMW407	<i>dcuS-yfp</i> Fusion in pBAD30, <i>Amp^R</i>	Scheu <i>et al.</i> , 2008
pMW1202	pMW407 (<i>dcuS-yfp</i>) mit DcuS-Mutation PAS _C -N248D, <i>Amp^R</i>	Steinmetz, 2010
pMW1228	pMW407 (<i>dcuS-yfp</i>) mit DcuS-Mutation PAS _C -N304D, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1229	pMW407 (<i>dcuS-yfp</i>) mit DcuS-Mutation PAS _C -I318A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1230	pMW407 (<i>dcuS-yfp</i>) mit DcuS-Mutation PAS _C -V276A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1241	pMW407 (<i>dcuS-yfp</i>) mit DcuS-Mutation PAS _C -L300A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1242	pMW407 (<i>dcuS-yfp</i>) mit DcuS-Mutation PAS _C -D240A, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW1302	<i>dcuS-yfp</i> , PAS _C -EX, PAS _C mit <i>XhoI</i> rausgeschnitten, Deletion von 106 AS, <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit

Die Tabellen M8 bis M14 fassen alle Primer zusammen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. M8: Mutageneseprimer. In rot markiert sind die Mutationen, die zu dem genannten Aminosäureaustausch führen (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Mutagenese- primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	AS- austausch
PAS _C -Y215A-for PAS _C -Y215A-rev	GGC CTG GAA CCC GCC GAA ATC TCC ACG CTG CAG CGT GGA GAT TTC GGC GGG TTC CAG GCC	75	Y215A
PAS _C -Q229A-for PAS _C -Q229A-rev	CGC CAG GCC ATG TTG GCG TCT ATC AAA GAA GGC GCC TTC TTT GAT AGA CGC CAA CAT GGC CTG GCG	73	Q229A
PAS _C -K232A-for PAS _C -K232A-rev	CAG TCT ATC GCA GAA GGC GTC GTT GCC GGC AAC GAC GCC TTC TGC GAT AGA CTG	69	K232A
PAS _C -D240A-for PAS _C -D240A-rev	GTC GTT GCC GTG GAC GCT CGC GGC GAG GTC GAC CTC GCC GCG AGC GTC CAC GGC AAC GAC	78	D240A
PAS _C -A317C-for PAS _C -A317C-rev	GGC GTT ATC ATC GGT TGC ATT TCA ACC GGT TGA AAT GCA ACC GAT GAT AAC GCC	65	A317C
PAS _C -A317Y-for PAS _C -A317Y-rev	GGC GTT ATC ATC GGT TAC ATT TCA ACC GGT TGA AAT GTA ACC GAT GAT AAC GCC	63	A317Y
PAS _C -A317D-for PAS _C -A317D-rev	GGC GTT ATC ATC GGT GAC ATT TCA ACC GGT TGA AAT GTC ACC GAT GAT AAC GCC	65	A317D
PAS _C -I296A-for PAS _C -I296A-rev	GAC GAA GAG ATT ACG GCT AAA GAC CGG CCG GTC TTT AGC CGT AAT CTC TTC GTC	66	I296A
PAS _C -I296C-for PAS _C -I296C-rev	GAC GAA GAG ATT ACG TGT AAA GAC CGG CCG GTC TTT ACA CGT AAT CTC TTC GTC	65	I296C

3. Material und Methode

PAS _C -I296D-for PAS _C -I296D-rev	GAC GAA GAG ATT ACG GAT AAA GAC CGG CCG GTC TTT ATC CGT AAT CTC TTC GTC	65	I296D
PAS _C -V276A-for PAS _C -V276A-rev	CAC TCA TGG TCA CAG GCG GTA GAT GTC TCG CGA GAC ATC TAC CGC CTG TGA CCA TGA GTG	71	V276A
PAS _C -V276C-for PAS _C -V276C-rev	CAC TCA TGG TCA CAG TGC GTA GAT GTC TCG CGA GAC ATC TAC GCA CTG TGA CCA TGA GTG	70	V276C
PAS _C -V276D-for PAS _C -V276D-rev	CAC TCA TGG TCA CAG GAC GTA GAT GTC TCG CGA GAC ATC TAC GTC CTG TGA CCA TGA GTG	69	V276D
PAS _C -N311D-for PAS _C -N311D-rev	CCG GTG CGC AGT GAT GGC GTT ATC ATC GGT GCC GGC ACC GAT GAT AAC GCC ATC ACT GCG CAC CGG	78	N311D
PAS _C -N311A-for PAS _C -N311A-rev	CCG GTG CGC AGT GCT GGC GTT ATC ATC GGT GCC GGC ACC GAT GAT AAC GCC AGC ACT GCG CAC CGG	78	N311A
PAS _C -D323N-for PAS _C -D323N-rev	GCC ATT TCA ACC TTC AGG AAC AAA ACT GAA GTA CGT ACG TAC TTC AGT TTT GTT CCT GAA GGT TGA AAT GGC	68	D323N
<i>dcuS</i> _pd-Q83A-for <i>dcuS</i> _pd-Q83A-rev	GAG AGT GGC ATC GCG GCC ATC GCG GAA GCC GGC TTC CGC GAT GGC CGC GAT GCC ACT CTC	78	Q83A
<i>dcuS</i> _pd-P111A-for <i>dcuS</i> _pd-P111A-rev	CTT CGC TAC TCG CAT GCT GAA GCC CAG CTG GGC TTC AGC ATG CGA GTA GCG AAG	69	P111A
<i>dcuS</i> _pd-D124A-for <i>dcuS</i> _pd-D124A-rev	CCA TTT AAA GGT GAT GCC ATC CTT AAA GCG CGC TTT AAG GAT GGC ATC ACC TTT AAA TGG	65	D124A
<i>dcuS</i> _pd-E132A-for <i>dcuS</i> _pd-E132A-rev	CTG AAT GGC GAA GCA AAT GTC GCT ATC AAT CGC GCG ATT GAT AGC GAC ATT TGC TTC GCC ATT CAG	69	E132A
<i>dcuS</i> _pd-V99A-for <i>dcuS</i> _pd-V99A-rev	CTG CTG TTT ATT GCG GTT ACC GAT ATG CAT ATC GGT AAC CGC AAT AAA CAG CAG	63	V99A
<i>dcuS</i> _pd-N130A-for <i>dcuS</i> _pd-N130A-rev	CTT AAA GCG CTG GCT GGC GAA GAA AAT GTC GAC ATT TTC TTC GCC AGC CAG CGC TTT AAG	68	N130A
<i>dcuS</i> _pd-N130D-for <i>dcuS</i> _pd-N130D-rev	CTT AAA GCG CTG GAT GGC GAA GAA AAT GTC GAC ATT TTC TTC GCC ATC CAG CGC TTT AAG	67	N130D
<i>dcuS</i> _pd-A145C-	GGT TTT CTG GCG CAG TGT TTA CGC GTA TTT ACC	69	A145C

for <i>dcuS</i> _pd-A145C- rev	GGT AAA TAC GCG TAA ACA CTG CGC CAG AAA ACC		
<i>dcuS</i> _pd-A145D- for <i>dcuS</i> _pd-A145D- rev	GGT TTT CTG GCG CAG GAT TTA CGC GTA TTT ACC	69	A145D
	GGT AAA TAC GCG TAA ATC CTG CGC CAG AAA ACC		
PAS _C -N256A-for PAS _C -N256A-rev	GCA CAA GAA TTG CTG GCT TAC CGT AAG TCG CGA CTT ACG GTA AGC CAG CAA TTC TTG TGC	68	N256A
PAS _C -N256D-for PAS _C -N256D-rev	GCA CAA GAA TTG CTG GAT TAC CGT AAG TCG CGA CTT ACG GTA ATC CAG CAA TTC TTG TGC	67	N256D
PAS _C -H271A-for PAS _C -H271A-rev	CTG TCG ACG CTA AGC GCC TCA TGG TCA CAG CTG TGA CCA TGA GGC GCT TAG CGT CGA CAG	72	H271A
PAS _C -S274A-for PAS _C -S274A-rev	CTA AGC CAC TCA TGG GCA CAG GTG GTA GAT GTC GAC ATC TAC CAC CTG TGC CCA TGA GTG GCT TAG	72	S274A
TM1-for_ A27G/S31C TM1-rev_ A27G/S31C	GTC AGT GGG GTA CTG TTC TGC GTG CTA TTG CAA TAG CAC GCA GAA CAG TAC CCC ACT GAC	70	A27G S31C
TM2-for_ S186C/G190A TM2-rev_ S186C/G190A	CGC TGG AGC ATT ATC TGG TGC GTA TTA TTT GCG ATG CTG GTC GAC CAG CAT CGC AAA TAA TAC GCA CCA GAT AAT GCT CCA GCG	74	S186C G190A
TM2-for_ G190A/G194A TM2-rev_ G190A/G194A	GTA TTA TTT GCG ATG CTG GTC GCA CTG ATT GGC GCC AAT CAG TGC GAC CAG CAT CGC AAA TAA TAC	70	G190A G194A
PAS _P -R90A-for PAS _P -R90A-rev	GCG GAA GCC GTA GCC AAA CGA AAC GAT CTG CAG ATC GTT TCG TTT GGC TAC GGC TTC CGC	71	R90A
PAS _P -G140A-for PAS _P -G140A-rev	GCT ATC AAT CGC GCT TTT CTG GCG CAG CTG CGC CAG AAA AGC GCG ATT GAT AGC	68	G140A
PAS _C -V277A-for PAS _C -V277A-rev	CAC TCA TGG TCA CAG GTG GCA GAT GTC TCG CGA GAC ATC TGC CAC CTG TGA CCA TGA GTG	71	V277A
TMH2_ G190A-for TMH2_ G190A-rev	GTA TTA TTT GCG ATG CTG GTC GGA CTG ATT GGC GCC AAT CAG TCC GAC CAG CAT CGC AAA TAA TAC	70	G190A
TMH2_ S186C-for TMH2_ S186C-rev	CGC TGG AGC ATT ATC TGG TGC GTA TTA TTT GGC GCC AAA TAA TAC GCA CCA GAT AAT GCT CCA GCG	70	S186C
TM2-for_ G194A TM2-rev_ G194A	GGC ATG CTG GTC GCA CTG ATT GGC ACC GGT GCC AAT CAG TGC GAC CAG CAT GCC	71	G194A
TM2-for_ M191A	GTA TTA TTT GGC GCG CTG GTC GGA CTG	68	M191A

TM2-rev_M191A	CAG TCC GAC CAG CGC GCC AAA TAA TAC		
TM2-for_W185A/F189A	GCA TTA TCG CGT CGG TAT TAG CTG GCA TGC	70	W185A
TM2-rev_W185A/F189A	GCA TGC CAG CTA ATA CCG ACG CGA TAA TGC		F186A
TM2-for_G194A/T198A	ATG CTG GTC GCA CTG ATT GGC GCC TGC ATT CTG	73	G194A
TM2-rev_G194A/T198A	CAG AAT GCA GGC GCC AAT CAG TGC GAC CAG CAT		T198A
PAS _c -S186A-for	CGC TGG AGC ATT ATC TGG GCC GTA TTA TTT GGC	70	S186A
PAS _c -S186A-rev	GCC AAA TAA TAC GGC CCA GAT AAT GCT CCA GCG		
dcuS-T20A-for	CCG ATG AAA TTG AGT ACC GCA GTG ATC TTA ATG	70	T20A
dcuS-T20A-rev	GAC CAT TAA GAT CAC TGC GGT ACT CAA TTT CAT		
dcuS_I22V-for	G AGT ACC ACA GTG GTC TTA ATG GTC AGT GC	68	I22V
dcuS_I22V-rev	GCA CTG ACC ATT AAG ACC ACT GTG GTA CTC		
dcuS_D124V-for	G CCA TTT AAA GGT GAT GTC ATC CTT AAA GCG	68	D124V
dcuS_D124V-rev	CAG CGC TTT AAG GAT GAC ATC ACC TTT AAA TGC		
dcuS_S186L-for	CGC TGG AGC ATT ATC TGG TTG GTA TTA TTT GGC	68	S186L
dcuS_S186L-rev	GCC AAA TAA TAC CAA CCA GAT AAT GCT CCA GCG		
dcuS_I231T-for	GCC ATG TTG CAG TCT ACC AAA GAA GGC GTC	70	I231T
dcuS-I231T-rev	GAC GCC TTC TTT GGT AGA CTG CAA CAT GGC		
dcuS_A317T-for	GGC GTT ATC ATC GGT ACC ATT TCA ACC	65	A317T
dcuS_A317T-rev	GGT TGA AAT GGT ACC GAT GAT AAC GCC		
dcuS_S26R-for	GTG ATC TTA ATG GTC AGG GCG GTA CTG	67	S26R
dcuS_S26R-rev	CAG TAC CGC CCT GAC CAT TAA GAT CAC		
dcuS_R92H-for	GCC GTA CGC AAA CAC AAC GAT CTG CTG	68	R92H
dcuS_R92H-rev	CAG CAG ATC GTT GTG TTT GCG TAC GGC		
dcuS_I125T-for	CCA TTT AAA GGT GAT GAC ACC CTT AAA GCG CTG	68	I125T
dcuS_I125T-rev	CAG CGC TTT AAG GGT GTC ATC ACC TTT AAA TGC		
dcuS_L96Q-for	CGC AAC GAT CTG CAG TTT ATT GTC GTT ACC	67	L96Q
dcuS_L96Q-rev	GGT AAC GAC AAT AAA CTG CAG ATC GTT GCG		
dcuS_N156D-for	CCC ATC TAC GAT GAA GAT CAT AAA CAA ATT GGC	66	N156D
dcuS_N156D-rev	GCC AAT TTG TTT ATG ATC TTC ATC GTA GAT GGG		
dcuS_D239G-for	GGC GTC GTT GCC GTG GGC GAT CGC GGC GAG	75	D239G
dcuS_D239G-rev	CTC GCC GCG ATC GCC CAC GGC AAC GAC GCC		

PAS _C -R224A-for PAS _C -R224A-rev	CTG TTT GAG CAA GCC CAG GCC ATG TTG CAG CTG CAA CAT GGC CTG GGC TTG CTC AAA CAG	70	R224A
PAS _C -L228A-for PAS _C -L228A-rev	CAA CGC CAG GCC ATG GCG CAG TCT ATC GAT AGA CTG CGC CAT GGC CTG GCG TTG	70	L228A
PAS _C -A237C-for PAS _C -A237C-rev	GAA GGC GTC GTT TGC GTG GAC GAT CGC GGC GCC GCG ATC GTC CAC GCA AAC GAC GCC TTC	75	A237C
PAS _C -L246A-for PAS _C -L246A-rev	GGC GAG GTC ACG GCG ATC AAC GAT GCC GGC ATC GTT GAT CGC CGT GAC CTC GCC	73	L246A
PAS _C -L300A-for PAS _C -L300A-rev	CG ATT AAA GAC CGG GCA TTA CTG ATC AAC ACC GGT GTT GAT CAG TAA TGC CCG GTC TTT AAT CG	68	L300A
PAS _C -V313A-for PAS _C -V313A-rev	CGC AGT AAT GGC GCT ATC ATC GGT GCC GGC ACC GAT GAT AGC GCC ATT ACT GCG	70	V313A
PAS _C -I318A-for PAS _C -I318A-rev	GTT ATC ATC GGT GCC GCT TCA ACC TTC AGG CCT GAA GGT TGA AGC GGC ACC GAT GAT AAC	70	I318A
PAS _C -E113A-for PAS _C -E113A-rev	CTT TTC GGC CTG GCA CCC TAC GAA ATC GAT TTC GTA GGG TGC CAG GCC GAA AAG	71	E113A
PAS _C -P114A-for PAS _C -P114A-rev	GGC CTG GAA GCC TAC GAA ATC TCC GGA GAT TTC GTA GGC TTC CAG GCC	69	P114A
PAS _C -E116A-for PAS _C -E116A-rev	CTG GAA CCC TAC GCA ATC TCC ACG CGT GGA GAT TGC GTA GGG TTC CAG	69	E116A
PAS _C -I117A-for PAS _C -I117A-rev	GAA CCC TAC GAA GCC TCC ACG CTG CAG CGT GGA GGC TTC GTA GGG TTC	71	I117A
PAS _C -S118A-for PAS _C -S118-rev	CCC TAC GAA ATC GCA ACG CTG TTT GAG CTC AAA CAG CGT TGC GAT TTC GTA GGG	70	S118A
PAS _C -T119A-for PAS _C -T119A-rev	GAA ATC TCC GCG CTG TTT GAG CAA CGC GCG TTG CTC AAA CAG CGC GGA GAT TTC	71	T119A
PAS _C -L220A-for PAS _C -L220A-rev	GAA ATC TCC ACG GCG TTT GAG CAA CGC GCG TTG CTC AAA CGC CGT GGA GAT TTC	71	L220A
PAS _C -F221A-for PAS _C -F221A-rev	GAA ATC TCC ACG CTG GCT GAG CAA CGC GCG TTG CTC AGC CAG CGT GGA GAT TTC	73	F221A
PAS _C -E222A-for PAS _C -E222A-rev	CTG TTT GCA CAA CGC CAG GCC ATG CAT GGC CTG GCG TTG TGC AAA CAG	69	E222A
PAS _C -Q225A-for PAS _C -Q225A-rev	CTG TTT GAG CAA CGC GCG GCC ATG TTG CAA CAT GGC CGC GCG TTG CTC AAA CAG	73	Q225A
PAS _C -S272A-for PAS _C -S272A-rev	CTA AGC CAC GCA TGG TCA CAG GTG CAC CTG TGA CCA TGC GTG GCT TAG	69	S272A

3. Material und Methode

PAS _C -E281A-for	GTA GAT GTC TCG GCA GTG TTA CGC GAC	71	E281A
PAS _C -E281A-rev	GTC GCG TAA CAC TGC CGA GAC ATC TAC		
PAS _C -D249A-for	CTG ATC AAC GCT GCC GCA CAA GAA TTG	70	D249A
PAS _C -D249A-rev	CAA TTC TTG TGC GGC AGC GTT GAT CAG		
PAS _C -N248C-for	GTC ACG CTG ATC TGC GAT GCC GCA CAA GAA TTG	80	N248C
PAS _C -N248C-rev	CAA TTC TTG TGC GGC ATC GCA GAT CAG CGT GAC		
PAS _C -N304C-for	CGG CTA TTA CTG ATC TGC ACC GTT CCG GTG	82	N304C
PAS _C -N304C-rev	CAC CGG AAC GGT GCA GAT CAG TAA TAG CCG		
PAS _C -F221C-for	GAA ATC TCC ACG CTG TGT GAG CAA GCG CAG	73	F221C
PAS _C -F221C-rev	CTG CGC TTG CTC ACA CAG CGT GGA GAT TTC		
PAS _C -xS221Fx-for	GAA ATC TCC ACG CTG TTT GAG CAA GCG CAG	70	xS221Fx
PAS _C -xS221Fx-rev	CTG CGC TTG CTC AAA CAG CGT GGA GAT TTC		
PAS _C -F221S-for	GAA ATC TCC ACG CTG TCT GAG CAA GCG CAG	71	F221S
PAS _C -F221S-rev	CTG CGC TTG CTC AGA CAG CGT GGA GAT TTC		
PAS _C -R224C-for	CTG TTT GAG CAA TGC CAG GCC ATG TTG CAG	73	R224C
PAS _C -R224C-rev	CTG CAA CAT GGC CTG GCA TTG CTC AAA CAG		
PAS _C -I318C-for	GTT ATC ATC GGT GCC TGT TCA ACC TTC AGG	68	I318C
PAS _C -I318C-rev	CCT GAA GGT TGA ACA GGC ACC GAT GAT AAC		
PAS _C -L300C-for	CG ATT AAA GAC CGG TGA TTA CTG ATC AAC ACC	67	L300C
PAS _C -L300C-rev	GGT GTT GAT CAG TAA TCA CCG GTC TTT AAT CG		
PAS _C -D323C-for	GCC ATT TCA ACC TTC AGG TGA AAA ACT GAA GTA	68	D323C
PAS _C -D323C-rev	CGT ACG TAC TTC AGT TTT TCA CCT GAA GGT TGA AAT GGC		
PAS _C -R322A-for	GCC ATT TCA ACC TTC GCG GAC AAA ACT	65	R322A
PAS _C -R322A-rev	AGT TTT GTC CGC GAA GGT TGA AAT GGC		

Tab. M9: Primer für die ungerichtete Mutagenese (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Primer für ungerichtete Mutagenese in pMW181	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
<i>dcuS</i> -pMW437/438-for (N-Terminus von <i>dcuS</i>)	CGC ATG TTA CGC AAA CGT CCG	62
<i>dcuS</i> -pMW437/439/440-rev (Ende von PAS _C)	GAC CAG ACC GTC GAG TCG CTG	65
<i>dcuS</i> -pMW439-for (Ende von PAS _P)	CGA TCG GCC TTG AGT TAA GCC	62
<i>dcuS</i> -pMW440-for (Mitte von TM2)	CAT GCT GGT CGG ACT GAT TGG	62
<i>dcuS</i> -pMW438-rev (Anfang von PAS _C)	CAG CGT GGA GAT TTC GTA GGG	62

Tab. M10: Primer für Schnittstellen. In rot markiert sind die Mutationen, die zu den genannten Schnittstellen führen (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Primer für Schnittstelle	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Schnittstelle
Nde1-TM1-pd-TM2-for	CGT CCG ATG CAT ATG AGT ACC ACA GTG	66	<i>NdeI</i> (pMW181 Pos. 5619)
Nde1-TM1-pd-TM2-rev	CGT CCG ATG CAT ATG AGT ACC ACA GTG		
EcoR1-TM1-pd-TM2-for	GTA CTG AAA AGA ATT CTT TTC GGC	58	<i>EcoRI</i> (pMW181 Pos. 6193)
EcoR1-TM1-pd-TM2-rev	GCC GAA AAG AAT TCT TTT CAG TAC		
TMH2- PAS _C - <i>NdeI</i> -for	GTG ACC CAA CAG ATC AAT GAC ATA TGC TGG AGC	69	<i>NdeI</i> (pMW181 Pos. 6107)
TMH2- PAS _C - <i>NdeI</i> -rev	GCT CCA GCA TAT GTC ATT GAT CTG TTG GGT CAC		
PAS _C - <i>NdeI</i> -for	GTA CTG AAA AAA ATC CTC ATA TGC CTG GAA CCC TAC	68	<i>NdeI</i> (pMW181 Pos. 6200)
PAS _C - <i>NdeI</i> -rev	GTA GGG TTC CAG GCA TAT GAG GAT TTT TTT CAG TAC		
PAS _C - <i>EcoRI</i> -for	GCC ATT TCA ACC TTC AGG GAG AAT TCT GAA GTA CGT AAA CTG	71	<i>EcoRI</i> (pMW181 Pos. 6542)
PAS _C - <i>EcoRI</i> -rev	CAG TTT ACG TAC TTC AGA ATT CTC CCT GAA GGT TGA AAT GGC		

Tab. M11: Primer für PAS_C-EX Schnittstellen. In rot markiert sind die Mutationen, die zu der genannten Schnittstelle führen (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Primer PAS _C -EX Schnittstellen	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Schnittstelle
PAS _C -EX1-for PAS _C -EX1-rev	CTG AAA AAA ATC GAA TTC GGC CTG GAA CCC GGG TTC CAG GCC GAA TTC GAT TTT TTT CAG	66,8 66,8	<i>EcoR1</i> (pMW181 Pos. 6198)
PAS _C -EX2-for PAS _C -EX2-rev	CAG TCT ATC AAA GAA TTC GTC GTT GCC GTG CAC GGC AAC GAC GAA TTC TTT GAT AGA CTG	66,8 66,8	<i>EcoR1</i> (pMW181 Pos. 6270)
PAS _C -EX3-for PAS _C -EX3-rev	GAT GCC GCA CAA GAA TTC CTG AAT TAC CG CG GTA ATT CAG GAA TTC TTG TGC GGC ATC	66,7 66,7	<i>EcoR1</i> (pMW181 Pos. 6330)
PAS _C -EX4-for PAS _C -EX4-rev	GTG TTA CGC GAA TTC ACC CCG CGC GCG CGG GGT GAA TTC GCG TAA CAC	67,8 67,8	<i>EcoR1</i> (pMW181 Pos. 6426)
PAS _C -EX5-for PAS _C -EX5-rev	CAA CCT TCA GGG ACG AAT TCG AAG TAC G CGT ACT TCG AAT TCG TCC CTG AAG GTT G	66,6 66,6	<i>EcoR1</i> (pMW181 Pos. 6543)
PAS _C -EX1 pBAD-f PAS _C -EX1 pBAD-r	GAA ATC TCC ACT CGA GTT GAG CAA CGC GCG TTG CTC AAC TCG AGT GGA GAT TTC	65	<i>Xho1</i> (pMW407 Pos. 3075)
PAS _C -EX5 pBAD-f PAS _C -EX5 pBAD-r	GGG ACA AAA CTC GAG TAC GTA AAC TGA TG CAT CAG TTT ACG TAC TCG AGT TTT GTC CC	65	<i>Xho1</i> (pMW407 Pos. 3393)

Tab. M12: Primer für Bacterial-Two Hybrid Schnittstellen. In rot markiert sind die Mutationen, die zu der genannten Schnittstelle führen (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Primer BACTH Schnittstellen	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Schnittstelle
THS_ PAS _C -f	CTT TTG GAT CCG GAA CCC TAC	60	<i>BamH1</i>
THS_ PAS _C -r	CAT CAG TTT ACG TGA ATT CGT TTT GTC	60	<i>EcoR1</i>
THS_ <i>dcuS</i> -f	CAC ACA AGG ATC CGA TGA GAC ATT CAT TGC	67	<i>BamH1</i>
THS_ <i>dcuS</i> - PAS _C -r	CGCTG CAT CAG TTT ACG TGA ATT CGT TTT GTC	67	<i>EcoR1</i>
THS_ <i>dcuS</i> -TM2-r	GCC GAA AAG GAT TGA ATT CAG TAC CTT AAC CAG	67	<i>EcoR1</i>
Kinase-f	GTA AAC GGA TCC AGC GAC TC	59	<i>BamH1</i>
Kinase-r	CGA TAA TTA ATA CAT GAA TTC CTG TTC G	59	<i>EcoR1</i>

Tab. M13: Sequenzierungsprimer für das Plasmid pMW181. (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Sequenzierungsprimer für pMW181	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
pMW181Seq1 (Pos. 150 AS vor <i>dcuS</i> -for)	CCT CTC TCA TCA GTA TGA TTA TC	57
pMW181Seq2 (Pos. 6756-6779 in Kinase-rev)	GAT TAA AAA ACC AGC GAT AAC CGG	59
midcuSseq (Pos. 5992-6014 Ende von PAS _p -for)	GTT TTC TGG CGC AGG CTT TAC G	60
PiDcuSSeq1 (Pos. 5724-5750 Anfang von PAS _p -for)	GGG CTA GCC AAC AAG GCA CTG GCA GTG	71
PiDcuSSeq2 (Pos. 5750-5724 Anfang von PAS _p -rev)	CAC TGC CAG TGC CTT GTT GGC TAG CCC	71
PiDcuSSeq3 (Pos. 6599-6579 Anfang Kinase-rev)	GTC AGC ATA GTT GAC CAG ACC	60

Tab. M14: Sequenzierungsprimer für Bacterial Two-Hybrid-System Vektoren. (Eurofins MWG, Ebersberg, HPSF gereinigt).

Sequenzierungsprimer für BACTH-Vektoren	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
pUT18-Seq-for	CCA AGC TTG CAT GCC TGC	58
pUT18-Seq-rev	GCG ACG CGC CTC GGT GCC CAC	71
pKT25-seq_for2	GCG ATT CGG TGA CCG ATT AC	59
pKT25-seq_rev	GGA TGT GCT GCA AGG CGA TT	59
pKNT25-seq_for	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC	58
pKNT25-seq_rev	GTC GGC GGC GTT TGC GTA	60
pUT18C-for-seq	CTG GAA ACG GTG CCG GCG TC	65
pUT18C-rev-seq	CGG GGC TGG CTT AAC TAT GC	61

3.2 Zucht und Medien

3.2.1 Zucht von *Escherichia coli*

Für alle **genetischen Arbeiten** sowie für Vorkulturen (sofern nicht anders angegeben) wurden die Bakterien in Reagenzgläsern à 5 ml LB-Medium unter Schütteln (Excella E24, New Brunswick Scientific) aerob über Nacht bei 37°C inkubiert. Den Medien wurden bei Bedarf Antibiotika zugesetzt. Bei Zugabe von zwei und mehr Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert.

Für die **Überproduktion** von doppelt isotopenmarkiertem Protein wurde in M9-Medium ohne NH₄Cl überproduziert, dem 1 g/l ¹⁵N-NH₄Cl, 10 mM Glucose, und die Zusätze CaCl₂ und MgSO₄ zugesetzt wurden. Die Glucose wurde durch 7 mM ¹³C-Glucose (Promochem, Wesel) als Kohlenstoffquelle ersetzt. Die Vorkulturen wurden in LB-Medium plus Antibiotikum unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Für Festkörper-NMR-Untersuchungen wurden unmarkierte Aminosäuren im Medium angeboten. Die Zucht erfolgte mit 400 ml Kulturvolumen in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Die Kulturen wurden mit 2 % Inokulum beimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Induktion erfolgte nach ca. 2 - 3 Stunden bei einer OD₅₇₈ 0,5 - 0,8 mit 1 mM IPTG. Nach 4 - 5 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Für die **Überproduktion** von Proteinen erfolgte die Zucht in LB Medium mit 10 mM Glukose. Die Vorkulturen wurden unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Zucht erfolgte mit 400 ml Kulturvolumen in 2 Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Die Kulturen wurden mit 2 % Inokulum beimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Induktion erfolgte nach ca. 2 - 3 Stunden bei einer OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 mit 1 mM IPTG. Nach 4 - 5 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Für die **Bestimmungen der β-Galaktosidase-Aktivität** wurden die Vorkulturen in Reagenzgläsern à 5 ml angereichertem M9-Medium (eM9) plus Antibiotika mit allen Zusätzen sowie Glycerin als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Elektronenakzeptor stehend ohne Schütteln gezüchtet. Als Effektor wurde 20 mM Fumarat verwendet. Die Zucht erfolgte bei 37°C über Nacht als Standkultur im Brutschrank. Die anaeroben Hauptkulturen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit mit 1 - 8 % Inokulum beimpft und in Kulturen à 5 ml in gasdichten Sovirell-Röhrchen 3 x 15 Minuten entgast. Anschließend wurde mit 1,2 atm Stickstoff (N₂ 5,0; Reinheit >99,999 %, Westfalengas) begast und bei 37°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Die Zucht erfolgte bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8.

Für **BACTH Experimente** wurden Bakterienzuchten in 5 ml LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin als Antibiotikas und IPTG als Induktor über Nacht bei 30°C aerob im Schüttler (Certomat IS, B. Braun Biotech International) inkubiert. Als Effektor wurde 50 mM Fumarat

verwendet. Die Hauptkulturen wurden mit 4 % Inokulum beimpft und für 2 - 3 Stunden bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8 gezüchtet.

Bakterienzuchten für ***in vivo* Crosslinking Experimente** wurden in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika und 300 µM Arabinose als Induktor bei 30°C aerob im Schüttler über Nacht inkubiert. Die Hauptkulturen wurden mit 4 % Inokulum beimpft und für 3 - 4 Stunden bei 30°C aerob im Schüttler bis zu einer OD₅₇₈ von 0,8 – 1,0 gezüchtet.

Die Zuchten für ***in vivo* Fluoreszenzmikroskopie Experimente** wurden in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika und 133 µM Arabinose als Induktor bei 30°C aerob im Schüttler über Nacht inkubiert und 20 mM Effektor verwendet. Die Hauptkulturen wurden mit 1 % Inokulum beimpft und für 2,5 - 3 Stunden bei 30°C aerob im Schüttler bis zu einer OD₅₇₈ von 0,7 - 0,8 gezüchtet.

3.3 Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril-filtriert.

LB-Medium (Luria Bertani, Sambrook und Russell, 2001)

- 10 g/l Casein (Peptone Nr. 140, Gibco)
- 5 g/l Yeast extract (Serva)
- 5 g/l NaCl (Roth)

LB-Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar (Roth, Art.-Nr. 5210.2)

KAXI (Kanamycin-Ampicillin-X-Gal-IPTG)-Platten für BACTH

- LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar (Roth)
- Zugabe vor Verwendung (steril):
 - 50 µg/ml Kanamycin
 - 100 µg/ml Ampicillin
 - 0,5 mM IPTG
 - 20 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)

Minimalmedium, eM9-Medium (Miller, 1992)

10xM9 Stammlösung, pH 7,0

75 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Roth)

30 g/l KH_2PO_4 (Roth)

5 g/l NaCl (Roth)

10 g/l NH_4Cl (Fluka)

Zusätze vor Verwendung (separat autoklaviert)

10 ml/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Roth), 10 mM

10 ml/l säurehydrolysiertes Casein (Pepton Nr. 5, Gibco), 10 %

5 ml/l L-Tryptophan (Serva), 1 %

1 ml/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Roth), 1 M

Für angereichertes M9 (eM9) wurde die Stammlösung mit allen Zusätzen, Glycerin und DMSO versehen. Für isotopenmarkierte Zuchten wurde das M9-Medium ohne NH_4Cl angesetzt und autoklaviert. Die Zugabe von 1 g/l $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$ anstelle 10 g/l NH_4Cl erfolgte mittels Sterilfiltration in das fertige Medium.

eM9-X-Gal-Platten

Wasser mit 15 g/l Agar-Agar (Roth)

Zugabe vor Verwendung (steril):

1 x M9-Medium mit allen Zusätzen, Antibiotika und 20 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal

Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren und Effektoren (Endkonzentration)

50 mM Glycerin (Fluka)

20 mM Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fluka)

200 mM Na_2 -Fumarat (Fluka)

50 mM Na_2 -Fumarat (Fluka)

20 mM Na_2 -Fumarat (Fluka)

50 mM L-Malat (Roth)

20 mM L-Malat (Roth)

20 mM Glutarat (Sigma)

20mM Tricarballoylat (Fluka)

Falls erforderlich, wurde der pH mit Natriumhydroxid eingestellt.

SOC-Medium, Erholungsmedium nach Transformation (Sambrook and Russell, 2001)

20 g/l Casein (Select Pepton Nr. 140, Gibco)

5 g/l Hefeextrakt (Serva)

0,584 g/l NaCl (Roth)

0,19 g/l KCl (Roth)

2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O (Roth)

2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O (Fluka)

3,96 g/l Glukose x H₂O (Roth)

Glycerin-MOPS

1 mM MOPS (Roth)

15 % Glycerin (Roth)

TSB-Medium

100 g/l Polyethylenglykol (PEG 6000)

2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O (Roth)

2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O (Fluka)

100 ml/l Dimethylsulfoxid (DMSO) (Fluka)

Induktoren (Stammlösungen in H₂O)

1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Roth), Lagerung bei -20°C

1 M L(+)-Arabinose (Roth), Lagerung bei -4°C

Isotope für markierte Zuchten

1 g/l ¹⁵N-NH₄Cl (Spectra Stable Isotopes, 5300)

7 mM ¹³C-Glucose (Promochem, Wesel)

Die Isotope wurden in 10 ml Wasser gelöst und steril-filtriert. Die Isotope wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Griesinger (Max-Planck-Institut für physikalische Chemie; Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Aminosäuren (Endkonzentration für markierte Zuchten)

1 mM L-Phenylalanin (Roth)

1 mM L-Isoleucin (Roth)

1 mM L-Leucin (Sigma)

1 mM L-Arginin (Roth)

1 mM L-Lysin (Roth)

4 mM L-Valin (Roth)

Für die Festkörper-NMR-Messungen wurden die einzelnen Aminosäuren steril dem fertigen Medium zugegeben.

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Roth)	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycinsulfat (Roth)	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Spectinomycin (Sigma)	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol (Fluka)	20 mg/ml in EtOH	20 µg/ml
Tetracyclin (Fluka)	50 mg/ml in H ₂ O	15 µg/ml

Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

Puffer für SDS-Gelelektrophorese

Trenngel (10 %)

3,33 ml 30 % Acrylamid (Roth)

3,75 ml 1 M Tris-HCl; pH 8,8

0,1 ml 10 % (w/v) SDS (Roth)

0,01 ml TEMED (Fluka)

0,1 ml 10 % APS (Fluka)

2,7 ml H₂O

Sammelgel (4 %)

0,67 ml 30 % Acrylamid
1,25 ml 1 M Tris-HCl; pH 6,8
0,05 ml 10 % SDS (Roth)
0,005 ml TEMED
0,05 ml 10 % APS
2,98 ml H₂O

10 x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris (ICN)
1,92 M Glycin (Roth)
1 % (w/v) SDS (Roth)
Auffüllen mit dH₂O bis Endvolumen

2 x SDS Probenpuffer (Laemmli, 1970)

100 mM Tris/HCl, pH 6,8
200 mM Dithiothreitol (DTT, Sigma)
4 % (w/v) SDS (Roth)
0.2 % Bromphenol Blau (Janssen Chimica)
20 % Glycerin (Roth)

Färbelösung

2 g/l Coomassie brilliant blue (Serva)
10 % (v/v) Eisessig (Riedel de Haen)
5 % (v/v) Methanol (Roth)

Entfärbelösung

10 % (v/v) Eisessig (Riedel de Haen)
5 % (v/v) Methanol (Roth)

Puffer und Lösungen für Semi-dry Western blotting (Towbin *et al.*, 1979)

Transferpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % Methanol (v/v) (Roth)

Auffüllen mit dH₂O bis Endvolumen

Blockingpuffer A

1 x PBS Puffer

5 % fettreduziertes Milchpulver (Roth)

0,1 % Tween 20 (w/v) (Serva)

Blockingpuffer B

1 x PBS Puffer

3 % BSA (BSA)

0,1 % Tween 20 (w/v) (Serva)

Waschpuffer

0.1 % Tween 20 in 1 x PBS Puffer

Antikörper-Lösung

25 ml Blockingpuffer mit Antikörper-Verdünnung

Antikörper (polyklonal)

Primärer Antikörper

Anti-DcuS-PD (vom Hasen, Eurogenetec), gegen die periplasmatische Domäne von DcuS gerichtet (Müller, 2007)

Verdünnung für Chlornaphtol-Entwicklung 1:2000

Verdünnung für Chemilumineszenz-Entwicklung 1:5000

Sekundärer Antikörper

Anti-IgG-rabbit, an Peroxidase gekoppelt (Sigma-Aldrich)

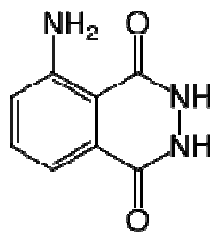
Verdünnung für Chlornaphtol-Entwicklung 1:1000

Verdünnung für Chemilumineszenz-Entwicklung 1:10000

Entwicklerlösung

Chemilumineszenz-Entwicklung

Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)



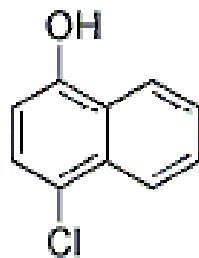
ol

Chlornaphtol-Entwicklung

300 g/l 4-Chloro-1-naphtol (Sigma-Aldrich) in 200 ml/l Ethanol (Roth) gelöst

80 mM Tris/HCl, pH 7,7

0.015 % H₂O₂ (30%, Fluka)



naphtol

Puffer für DSS-Crosslinking und *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie

1 x PBS Puffer, pH 7,5 (Sambrook and Russell, 2001)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Lösung für *in vivo* DSS-Crosslinking

DSS (Disuccinimidyl Suberat)

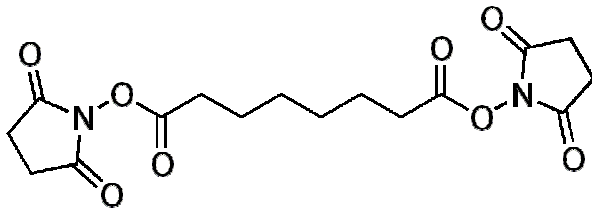


Abb. M3: Chemische Struktur des homobifunktionalen Disuccinimidyl Suberat (DSS) Crosslinker.

DSS-crosslinking Lösung wurde immer frisch angesetzt. Dafür wird 2 mg DSS in 217 μ l DMSO gelöst und auf 25 mM verdünnt.

Tris/HCl Puffer

1 M Tris (Roth), mit HCl auf pH 7.6 eingestellt

Material für *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Objektträger Immobilisierungslösung

1 x PBS Puffer (+/- 20 mM Fumarat)

1 % Agarose

Puffer für Protein-Überexpression und Reinigung

Tris/HCl Puffer

2 M Tris (Roth), mit HCl auf pH 7.7 eingestellt

P1 (Waschpuffer)

50 mM TrisHCl pH 7,7

10 mM MgCl₂

P2 (Membranwaschpuffer)

1 mM TrisHCl pH 7,7

3 mM EDTA

P3 (Homogenisierungspuffer)

50 mM TrisHCl pH 7,7
0,5 M NaCl
10 % Glycerin
10 mM Imidazol

P4 (Solubilisierungspuffer)

50 mM TrisHCl pH 7,7
0,5 M NaCl
10 % Glycerin
10 mM Imidazol
2 % Empigen BB

P5 (Säulenequilibrationpuffer)

50 mM TrisHCl pH 7,7
0,5 M NaCl
10 % Glycerin
20 mM Imidazol
0,04 % LDAO

P6 (Elutionspuffer)

50 mM TrisHCl pH 7,7
0,5 M NaCl
10 % Glycerin
500 mM Imidazol
0,04 % LDAO

Vor Verwendung von Puffer 2-6 wird 1 mM DTT (1 M Stammlösung, Lagerung bei -20°C) frisch hinzugefügt.

Puffer und Lösung für β -Galaktosidase Test

β -Galaktosidase Reaktionspuffer, pH 7

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer
10 mM KCl (Roth)
1 mM MgCl₂ (Fluka)
2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol (Roth)

Lösungen für den β -Galaktosidase Test

4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG, Fluka)

1 M Na₂CO₃ (Fluka)

Chloroform (Roth)

0,1 % SDS (Roth)

3.4 Molekulargenetische Methoden

Sofern nicht anders angegeben wurden die molekularbiologischen Standardmethoden wie Polymerasekettenreaktionen (PCR) und Ligationen nach Sambrook & Russell, 2001 durchgeführt. Die Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase und SAP (shrimp alkaline phosphatase) wurden von der Firma Fermentas bereitgestellt. Ligationen wurden in den molaren Verhältnissen von Vektor zu Insert von 1:5 bei 16°C über Nacht durchgeführt. Die gerichtete Mutagenese wurde nach dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (USA) mit der *Pfu* Polymease (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) oder der *Pfu*Ultrall Polymerase (Stratagene) in Kombination mit *DpnI* Endonuclease (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) und XL1-Blue hitzekompetenter Zellen (Stratagene) durchgeführt. Die komplementären Mutageneseprimer wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) bereitgestellt. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen und die Transformation erfolgten nach Farinha *et al.* (1990). Die analytische Plasmidisolierung wurde mit dem Plasmid-Mini-Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die DNA Konzentrationen wurden mit dem Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Die Reinigung und Isolierungen von PCR- und Ligationsansätzen erfolgten mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden). Die Restriktionsenzyme stammen von der Firma Fermentas, Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot). *E. coli* Plasmide wurden mittels Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) oder Hitzeschock (Froger & Hall, 2007) transformiert. Die DNA-Sequenz der resultierenden Konstrukte wurden mittels DNA Sequenzierung mit designten Primern von den Firmen Agowa LGC (Berlin) und Genterprise (Mainz) überprüft.

Für BACTH- und Expressionsexperimente wurden, wenn nötig, zwei Plasmide mit unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzgenen und unterschiedlichen Replikationsursprüngen in eine *E. coli* Zelle transformiert.

3.4.1 Hitzeschock und hitzeschockkompetente Zellen

Hitzekompetente Zellen wurde wie folgend hergestellt. Die Zellzucht erfolgte aerob unter Schütteln in 200 ml LB-Medium mit Antibiotika bis zur frühen Log Phase (OD_{578} 0,5-0,6). Die Zellen wurden für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mittels Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem TSB-Medium gewaschen und nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt in 20 ml eiskaltem TSB-Medium resuspendiert und erneut für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden sofort in Aliquots à 500 µl bei -80°C eingefroren und gelagert.

Der Transformationsansatz mit 50 µl hitzekompetente Zellen und Plasmid DNA (Mutagenese: 1,5 µl *DpnI*-Verdau) wurde vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 42°C für 45 Sekunden erhitzt und danach für 2 Minuten auf Eis gehalten. Nach der Zugabe von 1 ml SOC- Erholungsmedium wurden der Ansatz für mindestens 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz komplett auf LB-Agarplatten mit den jeweiligen Antibiotikas ausplattiert.

3.4.2 Expressionsvektoren

Expressionsplasmid für Funktionsmessungen

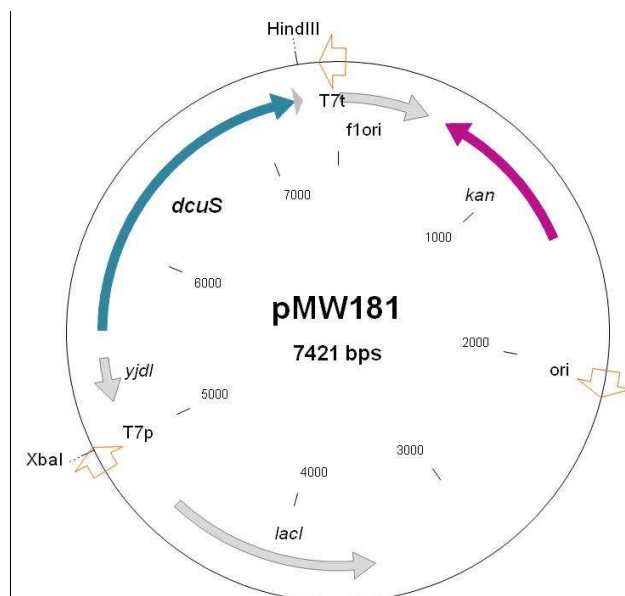


Abb. M4: Das Expressionsplasmid pMW181 (Janausch *et al.*, 2002) zur Komplementation des *dcuS*-Insertionsstamms. Das Plasmid enthält eine Kopie des kompletten chromosomalen *dcuS* Gens und eigenem Promoter mit 2,2 kb.

Expressionsplasmide für Protein-Überproduktion

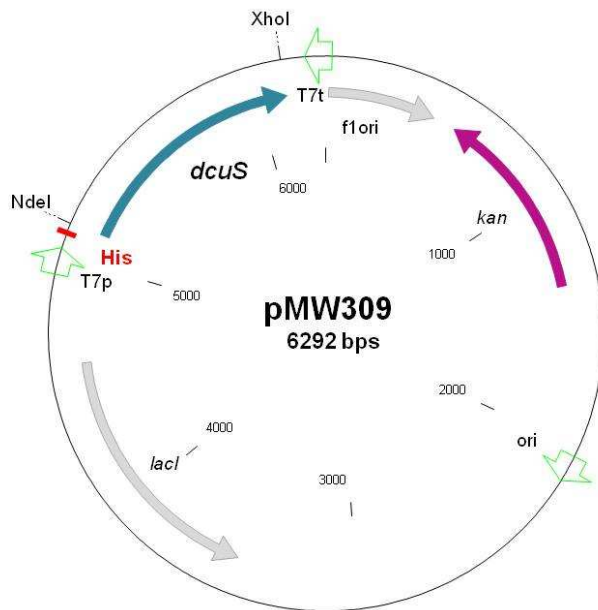


Abb. M5: Das Expressionsplasmid pMW309 (Etzorn *et al.*, 2008) zur Überexpression von DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C). Die Überproduktion von C-terminal verkürztem DcuS steht unter Kontrolle des T7lac-Promoters. Stromaufwärts von *dcuS*, nach dem T7lac-Promoter, befindet sich die Sequenz für einen His-tag.

Expressionsplasmid für *in vivo* Fluoreszenzmessungen

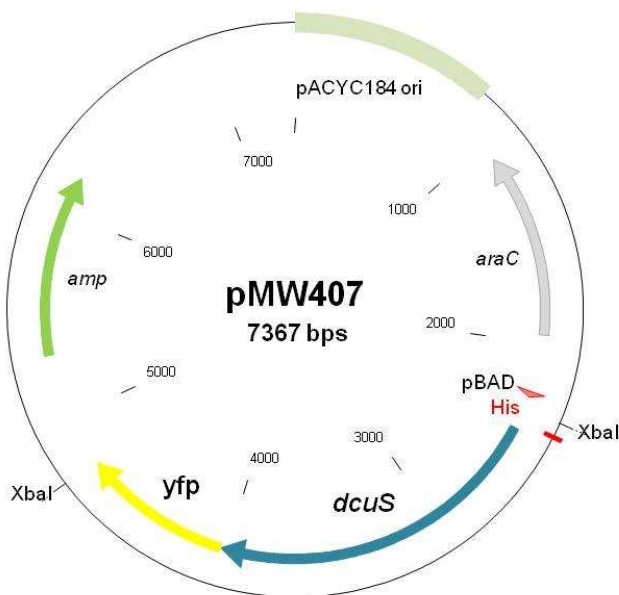


Abb. M6: Das Expressionsplasmid pMW407 (Scheu *et al.*, 2008) zur moderaten Expression von DcuS-YFP. Die *dcuS-yfp* Genfusion wird unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren P_{BAD} Promotors exprimiert. Stromaufwärts befindet sich die Sequenz für den His-tag.

Expressionsplasmid für *in vivo* Crosslinking

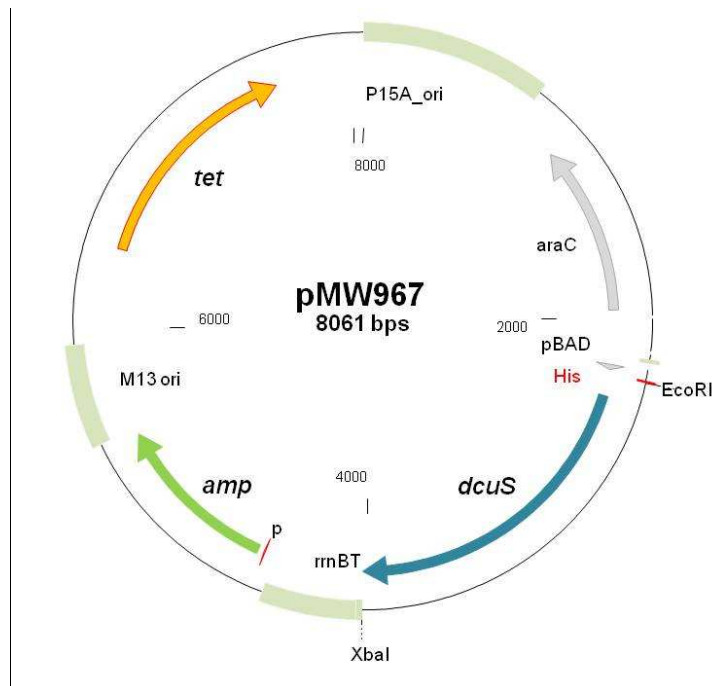


Abb. M7: Das Expressionsplasmid pMW967 (Scheu *et al.*, 2010) zur Expression von cysteinfreiem DcuS. *dcuS* wird unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren P_{BAD} Promotors exprimiert. Stromaufwärts befindet sich die Sequenz für den His-tag. Das Plasmid besitzt zwei Antibiotika Resistenzen, Ampicillin und Tetracyclin.

Expressionsplasmid für PAS_C-EX Funktionsuntersuchung

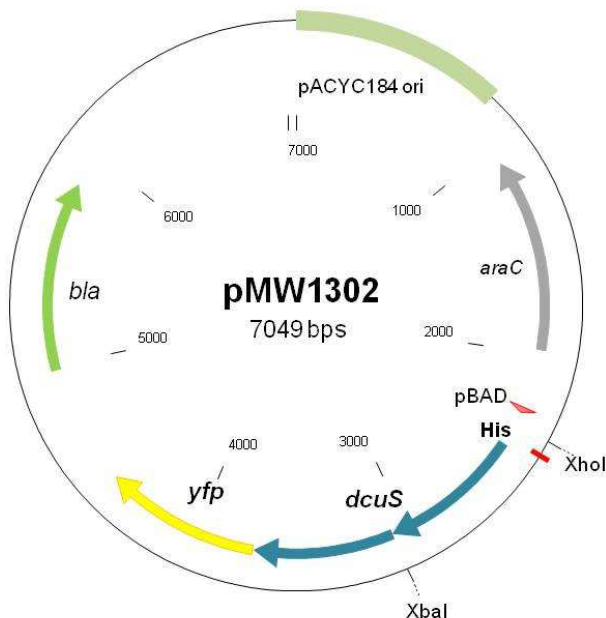


Abb. M8: Das Expressionsplasmid pMW1302 zur moderaten Expression von PAS_C-EX-YFP. Die *yfp*-Genfusion wird unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren P_{BAD} Promotors exprimiert. Stromaufwärts befindet sich die Sequenz für den His-tag.

3.4.3 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System (Karimova et al., 1998)

Interaktionsmessungen wurden mit dem Bacterial Two-Hybrid System durchgeführt. Das "Bacterial Two-Hybrid-System" (BACTH) basiert auf einer interaktionsvermittelten Rekonstitution der Adenylatcyclase-Aktivität im *cya*-negativen *E. coli* Stamm BTH101. Hierzu wird die katalytische Domäne der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* verwendet, die aus den zwei Fragmenten T18 und T25 (Abb. M9A) besteht. Werden die Fragmente genetisch voneinander getrennt, verlieren sie ihre katalytische Aktivität (Abb. M9B). Fusioniert man T25 und T18 an zwei interagierende Proteine, werden die Fragmente über die Heterodimerisierung der entstehenden Hybridproteine wieder funktionell zusammengeführt. Die wiederhergestellte Adenylatcyclaseaktivität resultiert in der Synthese von cAMP (Abb. M9C). Zyklisches AMP bindet im nächsten Schritt an das „catabolite activator protein“, CAP. Der cAMP/CAP Komplex aktiviert in *E. coli* als Transkriptionsfaktor die Expression von verschiedenen Reportergenen. Hierzu gehören die Gene des *lac*- und des *mal*-Operons, die für Gene des Laktose- bzw. des Maltose-Stoffwechsels kodieren (Abb. M9D). Die Expression der β -Galaktosidase (*lacZ*) kann somit als Maß für die Interaktion von Proteinen benutzt werden.

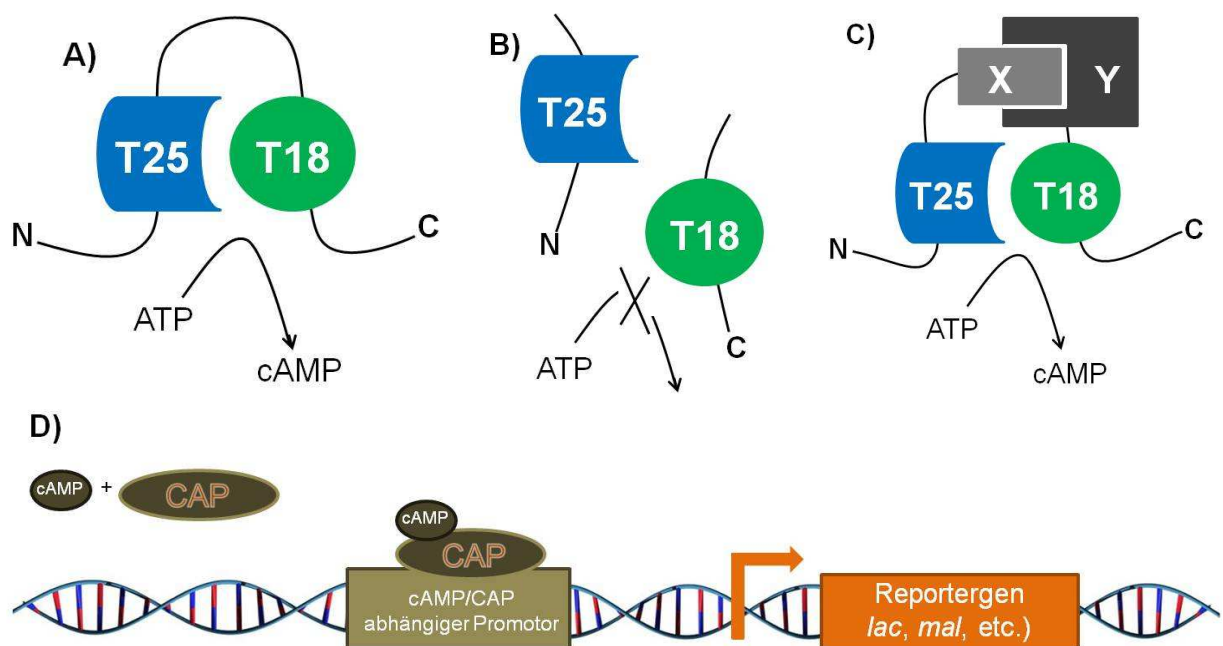


Abb. M9: Schematische Darstellung der Funktion des BACTH-Systems nach Karimova et al. 1998. Die katalytischen Fragmente T25 (blau) und T18 (grün) der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* setzen ATP zu cAMP um (A). Eine Trennung der Fragmente führt zum Verlust der katalytischen Aktivität (B), die durch eine Fusion an zwei interagierenden Proteinen X und Y wieder hergestellt werden kann (C). Die wiederhergestellte Adenylatcyclaseaktivität führt zur Bildung von cAMP und über die Bildung des cAMP/CAP-Komplexes zur Expression von Reportergenen (D).

Der Vektor pKT25 trägt die Sequenz für das T25-Fragment mit einer anschließenden Multiple Cloning Site (MCS). Dies ermöglicht die Konstruktion eines Fusionsproteins mit dem T25 am N-Terminus des zu testenden Proteins. Der Vektor pKNT25 trägt ebenfalls das T25-Fragment, die Lage der MCS am 5'-Ende von T25 erlaubt jedoch die Konstruktion eines Fusionsproteins mit dem T25-Fragment am C-Terminus des Fusionsproteins. Das Plasmid pUT18C enthält die Sequenz des T18-Fragments und fusioniert es an den C-Terminus des Hybridproteins. Die Verwendung von pUT18C führt zu einem Hybridprotein mit dem T18-Fragment am N-Terminus des Fusionsproteins (Abb. M10). Die zur Konstruktion der Fusionsproteine verwendeten Primer sind in Tab. M12 dargestellt.

Der Interaktionstest erfolgte in dem *cya* Deletionsstamm BTH101. Hierzu wurden elektrokompetente Zellen von BTH101 hergestellt. 50 µl elektrokompetente Zellen wurden mit je 15 ng der beiden Fusionsplasmide transformiert und zur Selektion auf KAXI-Platten ausplattiert. Als Positivkontrolle wurden kompetente Zellen mit den Plasmiden pKT25-Zip und pUT18C-Zip transformiert, in denen die jeweiligen Fragmente an die Leucinzipper-Domäne des Transkriptionsfaktor GCN4 aus Hefen fusioniert sind. Die verschiedenen DcuS-Varianten, in den jeweiligen Vektoren A-F (Abb. M11), wurden durch gerichtete Mutagenese erstellt.

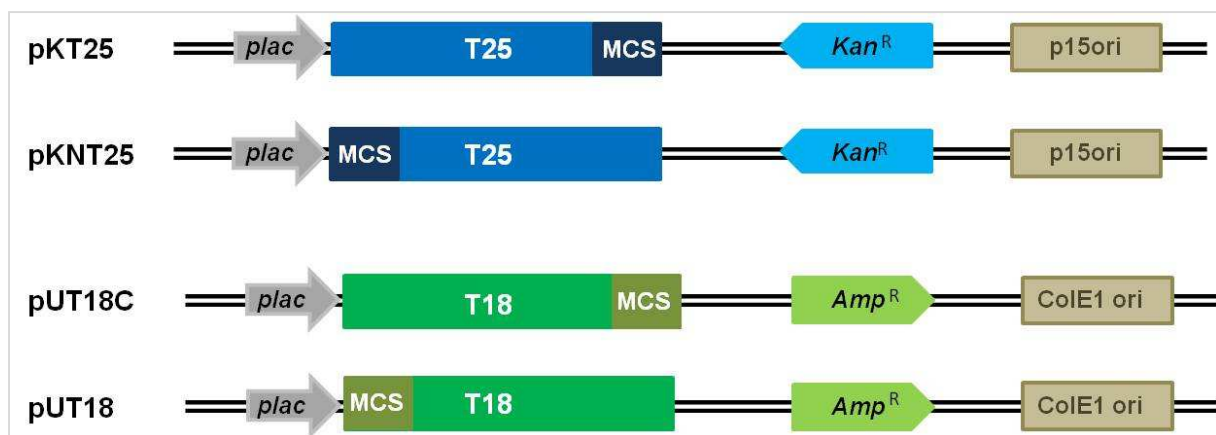


Abb. M10: Verwendete Ursprungsvektoren des Bacterial Two-Hybrid Systems. Dargestellt sind die vier unterschiedlichen BACTH Vektoren mit den T25 (blau) und T18 (grün) Fragmenten. Die Abbildung zeigt die Lage der katalytischen Fragmente in Bezug auf die Multiple Cloning Site (MCS), sowie die Resistenz und der Replikationsursprung der jeweiligen Vektoren.

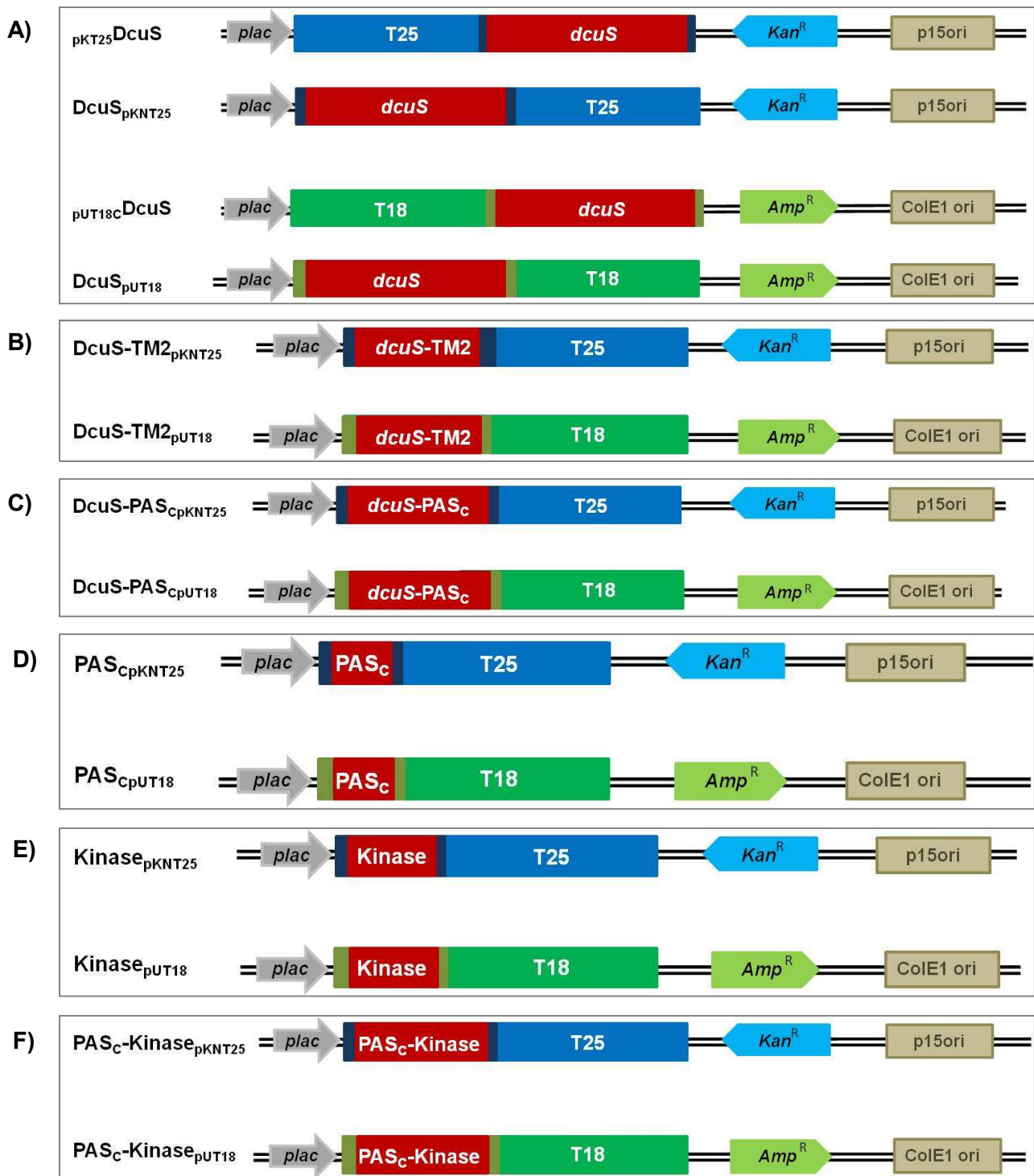


Abb. M11: Verwendete BACTH Vektoren. Die Abbildung zeigt die Lage der katalytischen Fragmente T25 und T18 in Bezug auf die jeweiligen DcuS-Fragmenten (rot), sowie die Resistenz und der Replikationsursprung der jeweiligen Vektoren. A) komplettes DcuS mit N-terminal und C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten; B) C-terminal verkürztes DcuS bis Transmembranhelix2 mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten; C) C-terminal verkürztes DcuS bis PAS_C mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten; D) isolierte PAS_C Domäne mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten; E) isolierte Kinase Domäne mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten; F) isolierte PAS_C -Kinase mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986). Die Reaktionen wurden entweder im iCycler (Bio-Rad) oder im MyCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg). Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und Schmelzpunkte der verwendeten Primer wurde das Programm abgeändert. Pro 1 kb zu amplifizierende Nukleotide wurden für die *Taq* Polymerase (Abgene), für die *PfuUltra* Polymerase (Stratagene) und *Pfu* Polymerase (Fermentas) eine Elongationszeit von 60 Sekunden und für die *PfuUltrall* Polymerase (Stratagene) 15 Sekunden genutzt. Der Primer-Schmelzpunkt (T_m) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times \text{GC \%} - 650/n$$

n = Anzahl der Nukleotide

Die Hybridisierung wurde 5°C unter dem niedrigeren T_m -Wert der beiden Primer durchgeführt. In der Regel wurde die Sequenz so gewählt und anschließend die Oligonukleotide so generiert, dass die Schmelztemperaturen identisch sind. Das Reaktionsvolumen beträgt für die Ansätze mit der *Taq*, der *PfuUltra*, *Pfu Ultrall* und der *Pfu* Polymerase jeweils $50 \mu\text{l}$ (Tab. M15, M17, M19).

Tab. M15: Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für den PCR-Ansatz ($50 \mu\text{l}$)

Komponenten	<i>PfuUltra</i> (Stratagene)
PCR Puffer	1 x
10 mM dNTP Mix	jeweils $250 \mu\text{M}$
MgCl_2	im Puffer enthalten (2mM)
Primer	jeweils $0,5 \mu\text{M}$ (10pmol)
Template DNA	$50 - 100 \text{ng}$
Polymerase	$2,5 \text{U}$
Dimethylsulfoxid	$1 - 10 \%$
ddH ₂ O	auf $50 \mu\text{l}$ auffüllen

Tab. M16: StandardPCR Protokoll

Zyklen	<i>PfuUltra</i> (Stratagene)
1. Initiale Denaturierung	95°C , 3 Min.
2. Denaturierung*	95°C , 30 Sek.
3. Annealing*	$T_m - 5^\circ\text{C}$, 30 Sek.
4. Elongation*	72°C , 1 Min/Kb
5. Finale Elongation	72°C , 10 Min.

*Die Zyklen (Segment 2-4) wurden 30-35-mal wiederholt.

3.4.5 Gerichtete Mutagenese via PCR

Punktmutanten von DcuS wurde nach der Anleitung des Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene hergestellt. Die DNA-Sequenz wurde in jedem Schritt so mutiert, dass in einer Mutagenesereaktion immer eine einzelne Aminosäure durch eine andere ersetzt wurde. Zur Konstruktion von Mehrfachmutanten wurden mehrere Mutagenesen nacheinander durchgeführt. Die verwendeten Mutageneseprimer sowie die eingeführten Aminosäureaustausche sind in der Tabelle M8 dargestellt. Die Punktmutationen im *dcuS* Gen wurden vorwiegend in dem Plasmid pMW181 (Abb. M4) eingeführt, das den Genbereich von *dcuS* mit dessen eigenem Promotor enthält. Die Mutanten wurden durch Sequenzierung mit den Sequenzierungsprimern aus Tabelle M13 überprüft.

Tab. M17: Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für den gerichtete Mutagenese-Ansatz (50 µl)

Komponenten	Gerichtete Mutagenese
PCR Puffer	1 x
10 mM dNTP Mix	jeweils 250 µM
Primer-for	125 ng
Primer-rev	125 ng
dsDNA	50 - 100 ng
Polymerase	2,5 U
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Tab. 18: PCR Protokolle für die gerichtete Mutagenese.

Zyklen	Gerichtete Mutagenese		
	<i>PfuUltra</i> (Stratagene)	<i>PfuUltrall</i> (Stratagene)	<i>Pfu</i> (Fermentas)
1. Initiale Denaturierung	95°C, 3 Min.	95°C, 2 Min.	95°C, 2 Min.
2. Denaturierung*	95°C, 30 Sek.	95°C, 20 Sek.	95°C, 30 Sek.
3. Annealing*	T _m - 5°C, 30 Sek.	T _m - 5°C, 20 Sek.	T _m - 5°C, 30 Sek.
4. Elongation*	72°C, 1 Min./Kb	72°C, 15 Sek./Kb	72°C, 2 Min./Kb
5. Ende	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

*Die Zyklen (Segment 2-4) wurden 16-mal wiederholt.

3.4.6 Ungerichtete Mutagenese via PCR (Cadwell & Joyce, 1992)

Zur Herstellung von *dcuS* Punktmutanten, die die Expression von *dcuB*'-*lacZ* konstitutiv induzieren (ON-Mutante) oder nicht induzieren (OFF-Mutante), wurde eine ungerichtete Mutagenese via PCR mit der *Taq*-Polymerase (Abgene) nach Cadwell & Joyce (1992) durchgeführt.

Die *Taq*-Polymerase hat von Natur aus eine hohe Fehlerrate von 0,025% bei der Replikation. Bei der ungerichteten Mutagenese mit dem modifizierten Protokoll (Tab. M19 und M20) kommt es zu einer erhöhten Fehlerrate von 0,66%.

Die Primer für die ungerichtete Mutagenese sind in der Tabelle M9 dargestellt. Die Punktmutationen im *dcuS* Gen wurden in dem Plasmid pMW181 eingeführt, das den Genbereich von *dcuS* mit dessen eigenem Promotor enthält. Nach der Amplifikation der gewünschten *DcuS*-Fragmente erfolgte anschließend die Restriktion des Fragmentes und des Ursprungsvektors pMW181. Das mutierte *DcuS*-Fragment wurde in den Ursprungsvektor pMW181 kloniert. Für das Screening wurden die mutierte Derivate von pMW181 in den *E. coli* Stamm IMW260 transformiert. Nach Abklatsch eines ausplattierten Transformationsansatzes von einer LB-Platte auf X-Gal-eM9-Agarplatten mit und ohne Fumarat, wurden die Platten unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Das Screening der Kolonien auf den gewünschten Phänotypen erfolgte nach Vergleich der Platten mit und ohne Fumarat (Abb. M12). Gesucht wurde zum einen nach dem Phänotyp ON, die einen konstitutive Aktivierung auf die *dcuB*'-*lacZ*-Expression hat. Das künstliche Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) wird durch das Enzym β -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Luftsauerstoff oxidiert 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, der dann in den *dcuB*'-*lacZ*-positiven Klonen zu einer Blaufärbung der Kolonien oder ihrer Umgebung führt. Der zweite gewünschte Phänotyp war der OFF-Phänotyp. Dieser zeigt keine *dcuB* Expression und die Kolonien blieben weiß. Stille- oder Wildtyp-Kolonien zeigten auf Fumarat eine Blaufärbung und ohne Effektor keine Färbung der Kolonien. Der Ablauf der ungerichteten Mutagenese ist in Abbildung M12 dargestellt. Die Mutanten wurden durch Sequenzierung mit den Sequenzierungsprimern aus Tabelle M13 überprüft.

Tab. M19: Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für den ungerichteten Mutagenese-Ansatz (50 µl)

Komponenten	Ungerichtete Mutagenese Taq (Abgene)
10x PCR Puffer	1 x
dNTP (10 mM)	0,2 mM
TTP (10 mM)	0,8 mM
CTP (10 mM)	0,8 mM
MgCl ₂ oder MnCl ₂	0,5 – 9 mM
Primer-for	0,5 pmol/µl
Primer-rev	0,5 pmol/µl
Template DNA	50-100 ng
Polymerase	2,5 U
Dimethylsulfoxid	1 – 10%
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Tab. M20: PCR Protokoll für die ungerichtete Mutagenese

Zyklen	Taq (Abgene)
1. Initiale Denaturierung	94°C, 4 Min.
2. Denaturierung*	94°C, 30 Sek.
3. Annealing*	T _m - 5°C, 30 Sek.
4. Elongation*	72°C, 1 Min./Kb
5. Finale Elongation	72°C, 10 Min.

*Die Zyklen (Segment 2-4) wurden 30-35-mal wiederholt.

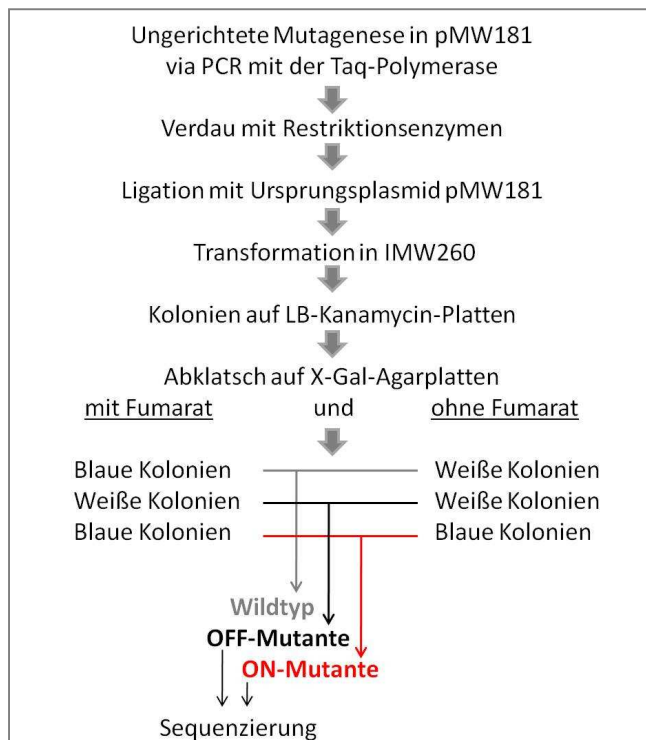


Abb. M12: Selektionsschema zur Identifizierung der gewünschten *dcuS* Punktmutanten nach ungerichteter Mutagenese von pMW181 via PCR. Kolonien, die auf Indikatorplatten mit X-Gal mit und ohne Fumarat den gewünschten Phänotyp aufwiesen, wurden mittels Sequenzierung identifiziert.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Überproduktion des verkürzten DcuS- Konstrukts

Für die Überproduktion des verkürzten DcuS-Konstrukts DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C) für die Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde pMW309 (Abb. M6) in *E. coli* C43(DE3) transformiert. Die markierte Zucht erfolgte in M9 Medium (ohne ¹⁴N-NH₄Cl) mit ¹⁵N-NH₄Cl, ¹³C-Glucose und mit den Zusätzen CaCl₂ und MgSO₄. Zusätzlich wurden dem Medium unmarkierte Aminosäuren (F, I, L, R, K, V) hinzugefügt.

Für die Hauptkulturen wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 400 ml LB Medium mit 2 % Inokulum einer LB-Vorkultur plus Antibiotikum beimpft. Die aerobe Zucht erfolgte unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG und nach weiteren 4 - 5 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckman Avanti JE, JA10 Rotor, 6.000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet und anschließend das Pellet in Puffer P1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Überproduktion von DcuS und DcuS-Derivaten

Für die Überproduktion von His₆-DcuS und His₆-DcuS-Derivaten wurde im *E. coli* Stamm C43(DE3) mit pMW151, pMW670, pMW740 oder pMW733 in *E. coli* C43(DE3) transformiert. Die Zucht erfolgte in LB Medium mit Glukose Für die Hauptkulturen wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 400 ml LB Medium mit 2 % Inokulum einer LB-Vorkultur plus Antibiotikum beimpft. Die aerobe Zucht erfolgte unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8. Die Induktion erfolgte mit 1 mM IPTG und nach weiteren 4 - 5 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckman Avanti JE, JA10 Rotor, 6.000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet und anschließend das Pellet in Puffer P1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

Zellaufschluss

Die Pellets wurde in je 20 ml Puffer P1 resuspendiert und mit der French Press in 3 Durchgängen bei 1200 Psi aufgeschlossen. Nichtaufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (FiberLite F21B Rotor, 10.000 Upm 10 min, 4°C) von den aufgeschlossenen Zellen abgetrennt. Die Membranfraktion wurde durch Ultrazentrifugation (Beckman Coulter Optima LE-80K, Kontron TFT70.38 Rotor, 200.000 x g, 65 min, 4°C) erhalten. Diese

Fractionen wurden in zwei Durchgängen mit Puffer P2 gewaschen (Kontron TFT70.38 Rotor, 200.000 x g, 20 min). Zum Homogenisieren im Potter S (Braun, Melsungen) wurde das Nassgewicht der Pellets bestimmt und pro mg Membran 10 ml Puffer P3 verwendet.

Homogenisieren, Solubilisieren und Affinitätschromatographie

Die Solubilisierung der membranständigen Proteine erfolgte im Potter durch langsame Zugabe des Detergenz Empigen BB (35%, Fluka) bis zur Endkonzentration von 2 %. Die Solubilisierung erfolgte weiterhin für 30 Minuten unter Rühren auf Eis. Anschließend wurden die Membranen bei 300.000 x g in der Ultrazentrifuge für 50 Minuten abgetrennt. Der Überstand enthielt die aus den Membranen gelösten Proteine und wurde sofort mit flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Die Reinigung von DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C) erfolgte per Affinitätschromatographie über eine Ni²⁺-NTA-Matrix (Qiagen) mit einem Säulenvolumen von 2 ml und einer Bindekapazität von 5-20 mg His₆-Protein pro ml Matrix. Proteine mit His₆-Label binden hierbei nicht-kovalent an die Ni²⁺-Ionen und Proteine ohne His₆-tag laufen durch die stationäre Phase. Das Spülen mit Puffer wurde per Schwerkraft bei 4°C im Kühlschrank durchgeführt. Zunächst wurde die Säulenmatrix mit 30 Volumen Puffer P5 equilibriert und anschließend mit dem Protein beladen. Die Säule wurde mit 20 Volumen Puffer P5 gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer P6 und wurde meistens in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Zur Bestimmung der Konzentrationen per Bradford mit Roti^R-Quant (Roth) und der Reinheit mittels SDS-PAGE wurden jeweils 50 µl von jedem Probenschritt separat gesammelt.

Rekonstitution von DcuS

DcuS wurde in *E. coli* Phospholipiden rekonstituiert. Dazu wurden 100 mg Phospholipide (20 mg/ml, *E. coli* Polar Lipid Extract, Avanti Polar Lipids) im Rotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) mit 80 mg N-Octyl-U-D-Glucopyranosid (Gerbu) gelöst. Um das Detergenz zu entfernen und die Bildung von Liposomen aus den Phospholipiden zu ermöglichen, wurde die Lösung über Nacht gegen 3 x 1 Liter 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) dialysiert. Die daraus resultierende Liposomensuspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut, um unilamellare Vesikel zu erhalten. Die Destabilisation der Phospholipide erfolgte mit dem Detergenz Triton X-100. Zur Untersuchung des verkürzten DcuS-Konstrukts DcuS-PD-PAS_C wurde ein effektives Detergenz:Lipid Verhältnis von 2,5 benutzt (Rigaud *et al.*, 1988; Rigaud *et al.*, 1995). Daraus resultierten komplett detergenzgesättigte und

destabilisierte Phospholipide. Die verwendete totale Detergenzkonzentration (DT) ergab sich nach Paternostre *et al.* (1988).

$$DT = DW + \text{Reff} [\text{Lipid}]$$

DT = totale Detergenzkonzentration

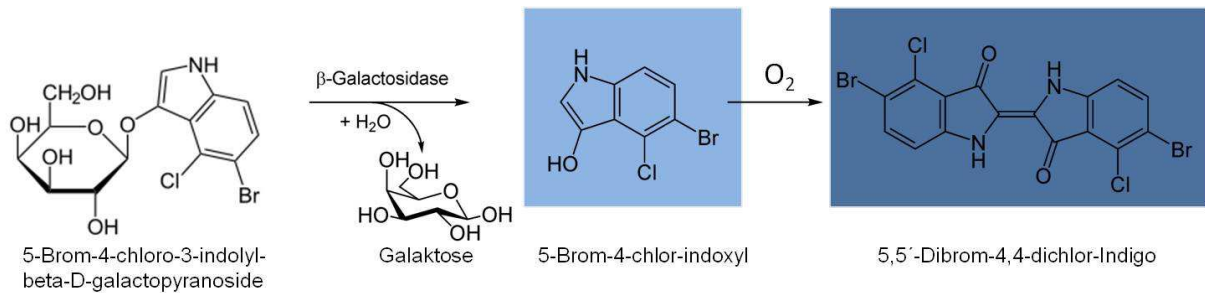
DW = Konzentration des monomeren Detergenz in der wässrigen Phase (0,18 mM für Triton X-100)

Reff = (2,5), molares Verhältnis Detergenz / Lipid ($\text{Reff} = D_{\text{total}} - D_{\text{water}} / [\text{Lipid}]$); $[\text{Lipid}]$ = Lipidkonzentration (21 mM)

Zu den destabilisierten Lipiden wurden 5 - 10 mg Proteinlösung zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert. Das Lipid:Protein-Verhältnis (w/w) betrug 7,5:1 oder 10:1. Das Detergenz wurde mittels Bio-Beads (Bio-Rad) entfernt (Holloway, 1973). Um die verbleibenden Luftblasen zu entfernen wurden die nicht-polaren Polystyrol Beads in 50 mM TrisHCl pH 7,7 aufgenommen und unter Rühren für 60 Minuten anaerobisiert. Pro mg Triton X-100 wurden 5 mg Bio-Beads zugegeben und die Suspension für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge an frischen Bio-Beads zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Taumelschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gleiche Menge an frischen Bio-Beads zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand der rekonstituierten Probe wurde mit Hilfe einer 5 ml Glaspipette von den Bio-Beads abgenommen und in Ultrazentrifugenröhrchen mit 50 mM TrisHCl Puffer (pH 7,7) auf mindestens 20 ml aufgefüllt. Die Proteoliposomen wurden in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Kontron TFT70.38 Rotor, 300.000 x g, 50 min, 4°C) und zweimal gewaschen (300.000 x g, 15 min, 4°C). Die Pellets wurden in 50 mM TrisHCl Puffer (pH 7,7) zu der gewünschten Konzentration aufgenommen und in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

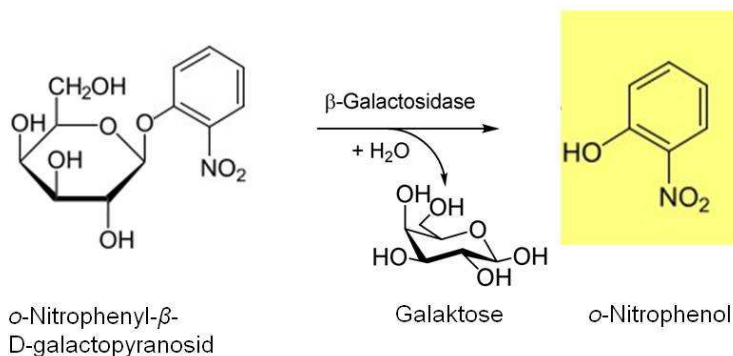
3.5.2 Qualitative Bestimmung der β -Galactosidase

Der qualitative Nachweis für die Interaktion im BACTH-System und der *dcuB*'-*lacZ* Aktivität erfolgte mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal). Dieses wird von der β -Galaktosidase in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. In Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt eine Umwandlung in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo.



3.5.3 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase

Der quantitative Nachweis für die Interaktion im BACTH-System und die *dcuB*'-*lacZ* Aktivität erfolgte mit dem chromogenen Substrat ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG). Dieses wird von der β -Galaktosidase in Galaktose und ortho-Nitrophenol hydrolysiert und kann anschließend bei einer Extinktion von 420 nm gemessen werden.



3.5.4 Kalkulation der LacZ Aktivität (Miller, 1972)

Aktivitäten der Reporterproteine wurden in Miller-Units [MU], wie in der folgenden mathematischen Gleichung kalkuliert:

$$\beta - \text{Galaktosidaseaktivität } \textbf{Miller Units} [MU] = \frac{1000 \times \Delta E_{420}}{t[\text{min}] \times V[\text{ml}] \times \Delta OD_{578}}$$

3.5.5 Immunoblotting (semi-dry)

Um DcuS spezifisch nachzuweisen, wurden Immunblots mit Anti-DcuS-Antikörper gegen die periplasmatische Domäne hergestellt. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Drei Lagen Chromatographiepapier (Whatman®)

Paper) wurden in Transferpuffer getränkt und auf die Kathode platziert. Darauf wurde das SDS-Gel gelegt und anschließend mit einer Nitrocellulosemembran bedeckt. Den Abschluss bildet drei weitere Lagen von in Transferpuffer getränktem Whatman-Papier. Dann wurde die Anode vorsichtig auf die oberste Filterlage gesetzt und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte 2 Stunden bei konstanter Stromstärke (mA). Diese wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$I[\text{mA}] = \text{Fläche der Membran} [\text{cm}^2] \times 0,8$$

Nach dem Transfer der Proteine auf den Blot wurde dieser über Nacht bei 4°C auf dem Taumelschüttler in Blocking Puffer A oder B inkubiert. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper auf die Membran gegeben und für 2 Stunden bei 20°C auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte à 5 Minuten in 20 ml Waschpuffer. Anschließend wurde der Blot für 2,5 Stunden mit dem sekundären Antikörper unter Schütteln bei 20°C auf dem Taumelschüttler inkubiert und nach zwei weiteren Waschschrten entwickeln. Die Entwicklung erfolgte entweder mit der Chemilumineszenz- oder der 30 minütigen Chlornaphtol-Entwicklung.

3.5.6 *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Die *in vivo* fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit Fusionen des enhanced „yellow fluorescent protein“ (eYFP), einem Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), durchgeführt. Es strahlt nach Anregung durch blaues Licht. Diese Variante von GFP besitzt ein Absorptionsmaximum bei 513 nm und emittiert maximal bei 527 nm (Ormö *et al.*, 1996).

Der *E. coli* Stamm JM109 wurde für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie mit Varianten des Plasmids pMW407, welche eine *dcuS-yfp*-Fusion tragen, transformiert. Die Zucht erfolgte in LB-Medium mit dem Induktor L-Arabinose mit und ohne die Effektoren Fumarat, Malat, Glutarat und Tricarbamoyllat bis ΔOD_{578} von 0,7 – 0,8. Im Anschluss wurde 1 ml Kultur steril entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1xPBS (+/- Effektoren) resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Zellen (5 µl) wurden auf einen Objektträger getropft und durch die 1%ige PBS-Agarose-Schicht auf dem Objektträger immobilisiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Biozero BZ-8000; KEYENCE) analysiert.

3.5.7 *In vivo* Crosslinking

Die *in vivo* Crosslinking Untersuchungen wurden mit stabilen Crosslinker DSS (Disuccinimidyl suberate) durchgeführt. Der *E. coli* Stamm JM109 wurde für die *in vivo* Crosslinking Untersuchungen mit Varianten des Plasmids pMW967 (Abb. M8), welche für cysteinefreies *dcuS* codiert, transformiert. Cysteinefreies *dcuS* wird unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren P_{BAD} Promotors exprimiert.

Die Zucht erfolgte in LB-Medium mit dem Induktor 300 μ M L-Arabinose bei 30°C bis ΔOD_{578} von 0,5 – 0,7. Im Anschluss wurde 1 ml Kultur steril entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1xPBS gewaschen und dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 50 μ l 1xPBS resuspendiert und auf Eis gelagert. DSS muss für jede Untersuchung frisch angesetzt werden. Dafür wird 2 mg DSS in 217 μ l DMSO gelöst und auf 25 mM verdünnt. Von den 50 μ l Probe wurden 19 μ l für das Crosslinking eingesetzt und mit 1 μ l DSS (Endkonzentration 30 μ M) gecrosslinkt. Die Reaktion erfolgte unter Inkubation bei 20°C für 15 Minuten im Thermoschüttler bei 450 rpm. Die Reaktion wurde anschließend mit 2 μ l 1 M TrisHCl (Endkonzentration 100 mM) gestoppt. Die gecrosslinkten Proben wurde dann mit 22 μ l 2xSDS-Auftragspuffer mit 1 M DTT versetzt. Anschließend konnte die Probe bei 99°C für 5 Minuten aufgekocht werden. Mit SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben aufgetrennt und mit Anti-DcuS-pd Antikörpern mittels semi-dry Immunoblotting nachgewiesen und mit Chemilumineszenz- oder Chlornaphtol-Entwicklung analysiert.

3.6 Datenbanken, Programme und Weblinks

Literatursuche

NCBI, PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Proteininformationen

Uniprot (Swiss-Prot) und assoziierte Links: <http://us.expasy.org/sprot/>

Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen

Programm PSIPRED Protein Struktur: <http://www.psipred.net/psiform.html>

Programm Swiss Model Protein Struktur: <http://swissmodel.expasy.org/>

Proteinstrukturmodelle

PyMOL: <http://www.pymol.org/>

Chimera: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Protein Struktur Datenbank

RCSB Protein Data Bank: <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

Primärsequenzvergleiche

Alignmentprogramme:

NCBI/BLAST/Blastn: Basic local alignment Search Tool

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>

Sequenzvergleiche:

BLAST, align two sequences: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Protein Bioinformatik

ExPASy Proteomic tools: <http://us.expasy.org/tools/>

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: <http://www.genome.jp/kegg/>

Oligonucleotid-Eigenschaften Kalkulierer

Primerdesign (OligoCalc): <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

VirtuellesClonieren

Clone Manager 5.0 (Sci-Ed Software)

4. Ergebnisse

Das fakultativ anaerobe Enterobakterium *Escherichia coli* ist unter anaeroben Bedingungen in der Lage C₄-Dicarboxylate zur Energiekonservierung zu nutzen. So kann *E. coli* das Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor in der Fumaratatmung einsetzen. Zur Induktion des Fumaratstoffwechsels wird Fumarat über die periplasmatische Sensordomäne (PAS_P) von DcuS des Zweikomponentensystems DcuSR erkannt. Nach Signalweiterleitung über die Membran werden die Zielgene (*dcuB*, *fumB*, *frdABCD*) der Fumaratatmung induziert (Golby *et al.*, 1999; Zientz *et al.*, 1998). Die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) des Sensors DcuS befindet sich zwischen der periplasmatischen Sensordomäne von DcuS und der cytoplasmatischen Kinase. PAS_C umfasst den Bereich von Aminosäure 212 bis 323 (Etzkorn *et al.*, 2008).

Es gibt drei Klassen von PAS-Domänen. Zum einen die gut untersuchten Cofaktorbindenden PAS-Domänen, die den Redoxstatus der Zelle erkennen, wie der Redoxsensor Aer oder NifL (Repik *et al.*, 2000, Key *et al.*, 2007). Zum anderen die signalerkennenden PAS-Domänen, die reversibel einen Effektor binden (PAS_P von DcuS). Die dritte Klasse der PAS-Domänen ist noch schlecht untersucht. Sie binden keinen Cofaktor und dienen nicht der Signalerkennung. Bis jetzt war ungeklärt, welche Aufgabe die PAS_C-Domäne von DcuS ausübt. Bekannt ist, dass PAS_C keine prosthetische Gruppe bindet und nicht an der Modifikation von DcuS in Abhängigkeit des Redoxstatus oder von C₄-Dicarboxylaten beteiligt zu sein scheint (Abo-Amer *et al.*, 2005).

Um die Funktion der PAS_C-Domäne von DcuS zu klären, wurde folgende Strategie verfolgt. Zum einen wurde die komplette PAS_C-Domäne deletiert. Des Weiteren konnten durch gerichtete und ungerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren der PAS_C-Domäne funktionell wichtige Reste identifiziert werden. Die Bedeutung der mutierten Aminosäurereste wurde durch funktionelle Untersuchung der entsprechenden Mutanten charakterisiert. Zur funktionellen Charakterisierung wurde die Rolle der Mutation in der Regulation, der Interaktion und der Lokalisation von DcuS in der Zelle untersucht. Die Transkriptionsregulation wurde anhand der DcuSR abhängigen *dcuB*-Expression bestimmt. Die Proteininteraktion wurde mit Interaktionsmutanten durch das bakterielle Two-Hybrid-System untersucht. DcuS zeigt eine polare Lokalisierung in der Zelle. Diese wurde mit verschiedenen Lokalisationsmutanten durch *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Oligomerisierung von DcuS konnte mit *in vivo* Crosslinking Experimenten bestätigt werden.

4.1 Funktionsuntersuchungen von DcuS: Expression von *dcuB*

Unter anaeroben Bedingungen und in Abwesenheit elektropositiverer Elektronenakzeptoren werden Fumarat und andere C₄-Dicarboxylate wie Malat, nachdem sie in Fumarat umgewandelt wurden, als terminale Elektronenakzeptoren in der anaeroben Atmung verstoffwechselt (Janausch *et al.*, 2002). Die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten im Medium wird von der Sensor-Histidinkinase DcuS übernommen, die Teil des Zweikomponentensystems DcuSR ist (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999). Dieses sorgt für die Anpassung des Stoffwechsels, indem es die Zielgene der anaeroben Fumaratatmung induziert. Diese Induktion kann für Funktionstests genutzt werden, da die Expression des Fumarat/Succinat-Antiporters DcuB unter anaeroben Bedingungen vom DcuSR-System abhängt. Auf Grund dessen lässt sich der Funktionszustand von DcuS mit Hilfe einer chromosomalen *dcuB*-Reporterfusion in Form der β -Galaktosidase-Aktivität ermitteln. Die β -Galaktosidase-Tests wurden in dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 durchgeführt. In diesem Stamm ist das *dcuS* Gen durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette ausgeschaltet (Zientz *et al.*, 1998). Das Plasmid pMW181 enthält das komplette *dcuS* Gen mit eigenem Promoter. Das Plasmid und Derivate davon können somit zur Komplementation von IMW260 verwendet werden.

Die Zucht der Bakterien für die Expressionsmessungen erfolgte anaerob im angereicherten Minimalmedium eM9 in An- und Abwesenheit eines Induktors. Dabei diente Glycerin als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator und DMSO als Elektronenakzeptor, um einerseits Glukoserepression zu vermeiden und andererseits das Wachstum der Stämme zu gewährleisten. Die Aktivität der β -Galaktosidase als Produkt der *dcuB*-Reporterfusion ist somit ein direktes Maß für die Aktivität des Sensors DcuS.

Der *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 zeigte mit und ohne den Induktor Fumarat wie erwartet keine Expression der *dcuB*-Reporterfusion (Abb. E1). Nach Komplementation mit plasmidkodiertem *dcuS* (DcuS_{wt}) wurde die Expression von *dcuB* mit dem Effektor Fumarat um den Faktor 23 im Vergleich zur Zucht ohne Effektor gesteigert. Die Induktion mit Fumarat konnte bei DcuS_{wt} um den Faktor 19,6 gesteigert werden. Somit kann in Anwesenheit von Fumarat eine deutliche Steigerung der Induktion der *dcuB*-Reporterfusion nachgewiesen werden. Im Wildtyp ist die Expression mit chromosomalem *dcuS* höher als in dem komplementierten Stamm, aber das Expressionsmuster ist in beiden Stämmen ähnlich. Somit kann das Plasmid pMW181 das DcuS_{wt}-Protein im Stamm IMW260 komplementieren und das Fehlen des intakten *dcuS* Gens ausgleichen.

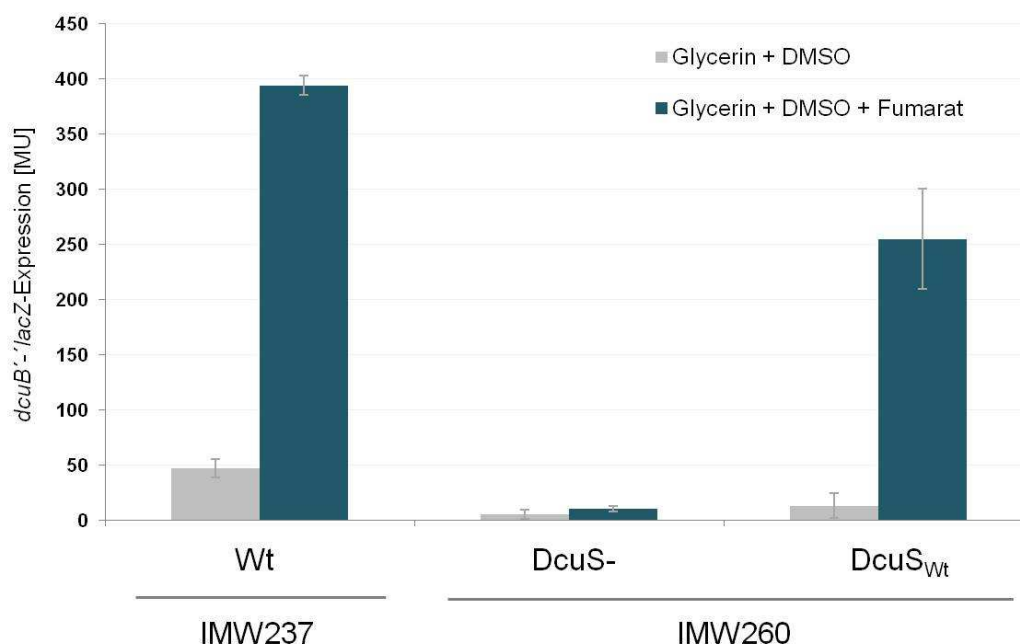


Abb. E1: Nachweis des Funktionszustandes von DcuS bei anaerober Zucht durch Expression von *dcuB* [MU]. Die Messungen erfolgte mit dem Wildtypstamm IMW237, dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

4.2 Bedeutung von PAS_C für die Funktion von DcuS: Deletion der cytoplasmatischen PAS-Domäne

Die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) von DcuS zeichnet sich durch eine konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur aus (Etzkorn *et al.*, 2008), die mit anderen untersuchten PAS-Domänen z.B. der PAS-Domäne von NifL aus *A. vinelandii* (Key *et al.*, 2007, Slavny *et al.*, 2010) verglichen werden kann. PAS_C von DcuS umfasst den Bereich von Aminosäure 212 bis 323 und kann in 4 Regionen unterteilt werden: die N-terminale Kappe, den PAS-Kern, den helikale Linker und die β -Faltblätter des C-terminalen β -Faltblatt-Gerüsts (Abb. E2).

Um die Funktion der PAS_C-Domäne zu untersuchen, wurden die komplette PAS_C-Domäne und Teilbereiche von PAS_C aus DcuS deletiert und die Expressionsaktivität der PAS_C-Deletionsmutanten (Δ PAS_C-EX) getestet. Die Abbildung E2 zeigt die verwendeten Schnittstellen zum Herstellen der Δ PAS_C-EX Varianten. Durch unterschiedliche Kombinationen der Schnittstellen konnten verschiedene Deletionen der Subdomänen generiert werden (Abb. E3).

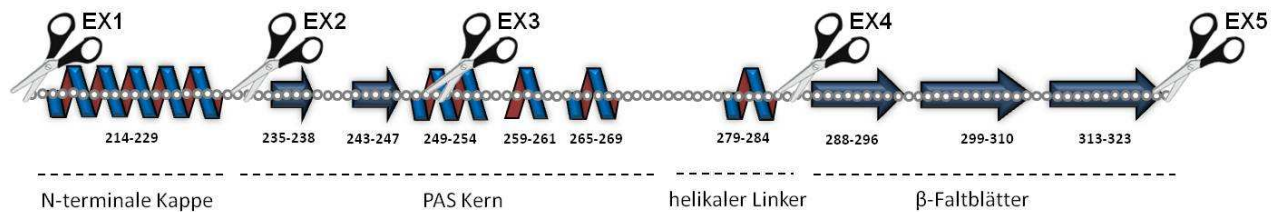


Abb. E2: Schnittstellen zur Herstellung von Δ PAS_C-EX Varianten. Die Kreise stellen die einzelnen Aminosäuren dar. Die Scheren zeigen die Schnittstellen für die Δ PAS_C-Ex Varianten an: EX1 (AS L209), EX2 (AS E233), EX3 (AS E253) EX4 (AS D285) und EX5 (AS K324). Aus den verschiedenen Schnittstellen-Kombinationen ergeben sich die Δ PAS_C-EX Varianten.

Die Funktionsuntersuchungen wurden im *E. coli* *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 durchgeführt, der mit Δ PAS_C-EX Varianten komplementiert wurde. Die Zucht erfolgte anaerob im angereicherten Minimalmedium eM9 in An- und Abwesenheit des Induktors Fumarat.

Den *DcuS*-Varianten Δ PAS_C-EX₁₋₂ bis Δ PAS_C-EX₁₋₅ fehlt jeweils die N-terminale Kappe, und in den *DcuS*-Varianten Δ PAS_C-EX₁₋₅ bis Δ PAS_C-EX₄₋₅ wurden die β -Faltblätter deletiert. In Abhängigkeit der Varianten fehlten diesen zusätzlich der Anfangsteil des PAS-Kerns und der restliche PAS-Kern mit dem helikalen Linker. Alle Δ PAS_C-EX Varianten induzierten eine starke Expression von *dcuB* (Abb. E3), die deutlich über der von *DcuS*_{Wt} lag.

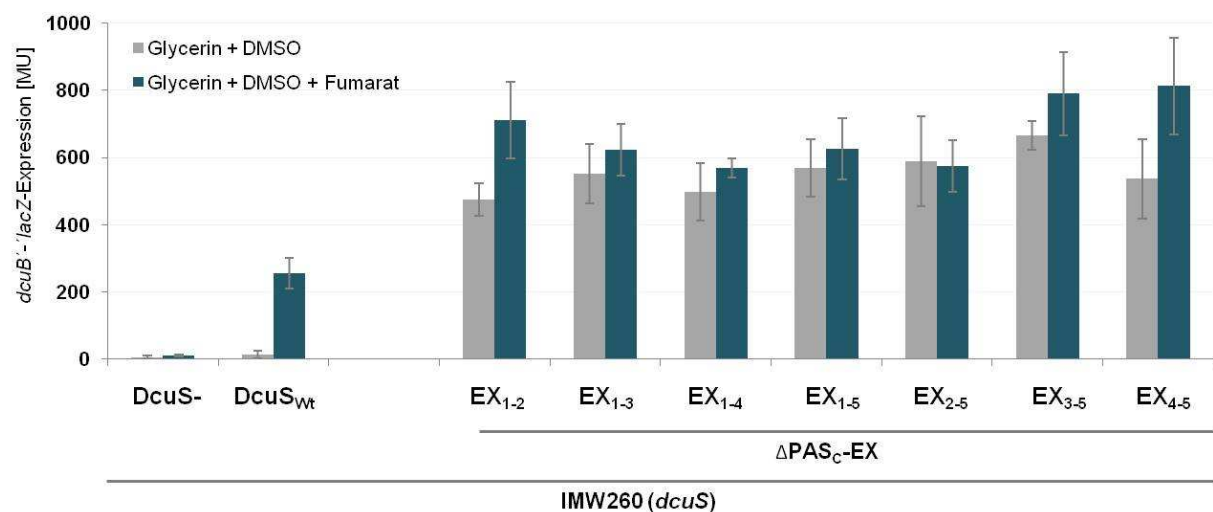


Abb. E3: Expression von *dcuB* durch *DcuS* und Δ PAS_C-EX Varianten. Die Messungen erfolgten im *dcuS*-Insertionsstamm IMW260, der mit plasmidkodiertem Wildtyp-*DcuS* (pMW181) oder Δ PAS_C-EX Varianten von *DcuS* mit teildeletierter PAS_C-Domäne komplementiert wurde. Verwendete Varianten von *DcuS* und Plasmide: *DcuS*_{Wt}, Δ PAS_C-EX₁₋₂ (AS L209-E233), Δ PAS_C-EX₁₋₃(AS L209-E253), Δ PAS_C-EX₁₋₄ (AS L209-D285), Δ PAS_C-EX₁₋₅ (AS L209-K324), Δ PAS_C-EX₂₋₅ (AS E233-K324), Δ PAS_C-EX₃₋₅ (AS E253-K324) und Δ PAS_C-EX₄₋₅ (AS D285-K324). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

In Anwesenheit von Fumarat lag die maximale Expression der Δ PAS_C-EX Varianten im Bereich von 600 bis 800 MU und war damit um den Faktor 2,2 bis 3,2 höher als mit DcuS_{Wt}. Die Fumaratinduktion betrug Faktor 1,0 bis 1,5, während im Wildtyp die Induktion durch Fumarat Faktor 19,6 ausmachte. Im Vergleich zu DcuS_{Wt} lag die maximale Expression ohne Fumarat bei 480 bis 670 MU.

Des Weiteren wurde die Aktivität von DcuS nach Deletion der kompletten PAS_C-Domäne (Δ PAS_C-EX₁₋₅) mit der Aktivität der isolierten Kinase-Domäne und der isolierten PAS_C-Kinase-Domäne verglichen (Abb. E4). Δ PAS_C-EX₁₋₅ zeigte den Expressionsphänotyp wie die anderen sechs Δ PAS_C-EX Varianten, eine konstitutive, fumaratunabhängige Expression von *dcuB* mit einem Fumarat-Induktionsfaktor von 1,09. Die isolierte Kinase-Domäne zeigte eine konstitutive *dcuB*-Expression und eine Aktivität in Abwesenheit von Fumarat, vergleichbar mit der Aktivität von DcuS_{Wt} mit Fumarat. Der Fumarat-Induktionsfaktor lag bei 0,76 und hatte somit eine fumaratunabhängige *dcuB*-Expression zur Folge. Die *dcuB*-Expression konnte in Anwesenheit des Effektors nicht weiter gesteigert werden. Das isolierte Konstrukt PAS_C-Kinase wiederum zeigte keine *dcuB*-Expression in An- und Abwesenheit des Effektors.

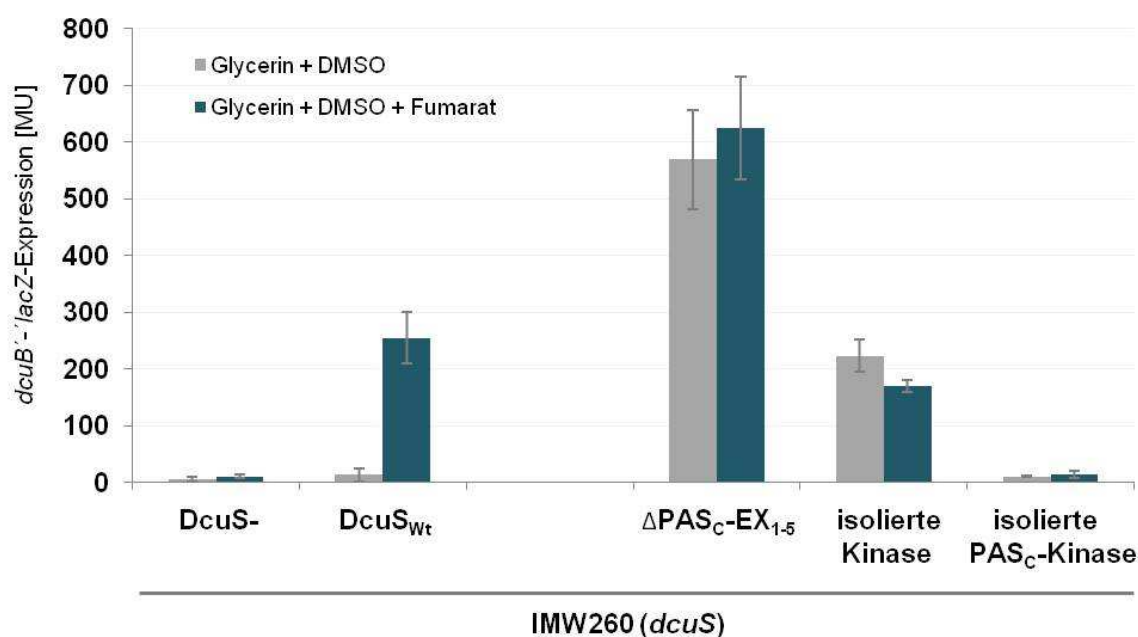


Abb. E4: Induktion von *dcuB'*-*lacZ* durch DcuS, Δ PAS_C-EX₁₋₅ und der isolierten Kinase- und PAS_C-Kinase-Domäne. Die Messungen erfolgten im *dcuS*-Insertionsstamm IMW260, der mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}) oder Varianten von DcuS mit deletierter PAS_C-Domäne, isolierten Kinase-Domäne und isolierter PAS_C-Kinase-Domäne komplementiert wurde. Verwendete Varianten von DcuS und Plasmide: DcuS_{Wt} (pMW181), Δ PAS_C-EX₁₋₅ (pMW1302), isolierten Kinase-Domäne (pMW955) und isolierten PAS_C-Kinase-Domäne (pMW1075). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

Zusammenfassend kann man sagen, dass DcuS ohne PAS_C-Domäne die Expression von *dcuB* konstitutiv stimuliert, und DcuS permanent aktiv ist. Die Deletionen führten unabhängig von der Art und dem Umfang der Deletion zu einer sehr starken Expression von *dcuB*. Nur die vollständige PAS_C-Domäne hatte einen regulierenden Effekt auf die Kinase-Domäne. Die isolierte Kinase-Domäne war ebenso konstitutiv aktiv und nicht durch Fumarat regulierbar. Die Kombination der isolierten Kinase mit PAS_C führte zur Ruhigstellung der Kinase, die auch durch Fumarat nicht wiederherstellbar war.

4.3 Funktionsmutanten von PAS_C: Einfluss auf die Expression von *dcuB*

4.3.1 Gerichtete und ungerichtete Mutagenese der PAS_C-Domäne

Durch die Identifizierung von funktionell wichtigen Aminosäuren der PAS_C-Domäne sollte die Funktion der cytoplasmatischen PAS-Domäne genauer untersucht werden. Mittels verschiedener Aminosäuresequenzen- und Sekundärstrukturvergleiche konnten interessante Aminosäurereste der PAS_C-Domäne gefunden und durch gerichtete Mutagenese funktionell analysiert werden. Die Auswahl der Aminosäurereste für die Mutagenese erfolgte nach verschiedenen Aspekten. Ausgangspunkt war das Vielfach-Alignment von über 300 cytoplasmatischen PAS-Domänen aus dem Reich der Bacteria, Archaea und Eukarya von Taylor und Zhulin (1999). Im Durchschnitt setzen sich PAS-Domänen aus 111 Aminosäuren zusammen. PAS_C umfasst den Bereich von Aminosäure 212 bis 323 (Etzkorn *et al.*, 2008) und kann in 4 Regionen unterteilt werden: die N-terminale Kappe, der PAS-Kern, der helikale Linker und die β -Faltblätter des C-terminale β -Faltblatt-Gerüsts (Abb. E5). In diesen PAS_C-Regionen sollten Funktionsmutanten von DcuS identifiziert werden.

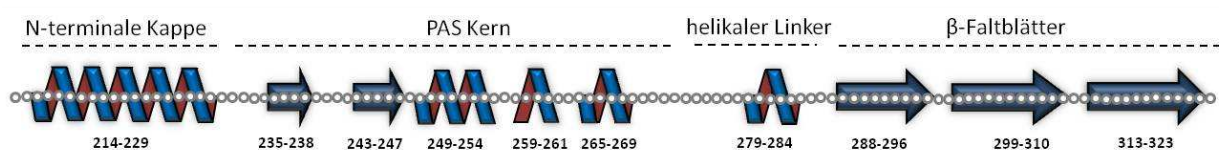


Abb. E5: PAS_C-Sekundärstruktur (nach Etzkorn *et al.* 2008). PAS_C ist in vier Regionen unterteilt: N-terminale Kappe (α 1; AS L212 - Q229), PAS Kern (β 1, β 2, α 2, α 3, α 4; AS S230 - S272), helikaler Linker (α 5; AS W273 - G286), β -Faltblatt-Gerüst (β 3, β 4, β 5; AS T287 - D323). Die Kreise stehen für die einzelnen Aminosäuren der PAS_C-Domäne.

Trotz guter Konservierung der Sekundärstrukturelemente ist die Sequenzvariabilität in den PAS-Domänen groß. Nur neun der ca. 110 Aminosäuren sind in PAS-Domänen gut konserviert (Taylor & Zhulin, 1999). Drei dieser Reste sind in *E. coli* DcuS zu finden.

In Abbildung E6 sind die entsprechenden Reste D239, N248 und D323 hervorgehoben. Die Aminosäure N248 zeigt die höchste Konservierung durch alle Reiche (Taylor & Zhulin, 1999; Golby *et al.*, 1999). Aufgrund der schlechten Konservierung auf Aminosäuresequenz-Ebene ist es schwer, mit Hilfe von Alignments potentiell interessante Aminosäuren zu identifizieren. Anhand von Sequenzalignments kann man aber funktionell wichtige Aminosäurereste, die in anderen PAS-Domänen identifiziert wurden, die korrespondierenden Reste aus PAS_C von DcuS zuordnen.

Die PAS-Domäne von NifL aus *A. vinelandii* (Slavny *et al.* 2010) ist funktionell gut untersucht. Alle Aminosäure-Reste von NifL, die in einer veränderten Funktion des Proteins resultierten, waren Grundlage für die Auswahl der entsprechenden Reste in PAS_C von DcuS. Abbildung E5 zeigt funktionell wichtige Aminosäuren dieser PAS-Domäne, die ausgewählten Aminosäuresubstitutionen und die korrespondierenden Reste von PAS_C aus DcuS. Identifiziert werden konnten insgesamt neun PAS_C-Reste: R224, L228, A237, L246, N248, S270, L300, V313 und I318.

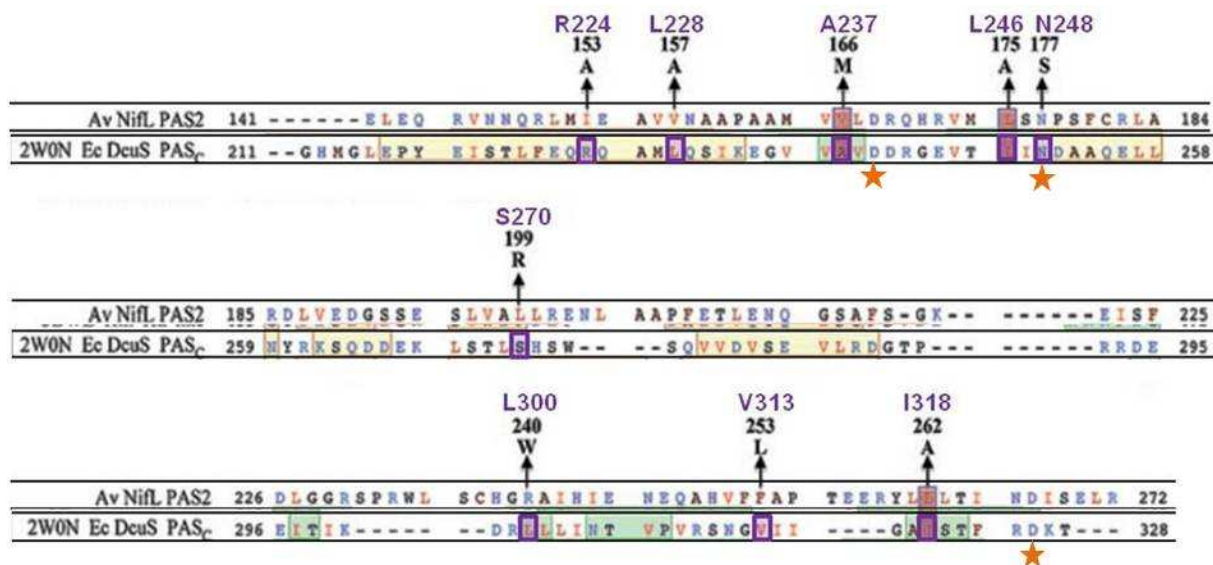


Abb. E6: Sequenzalignment von NifL und DcuS PAS_C-Domänen (Slavny *et al.*, 2010). Vergleich wichtiger Aminosäuren der PAS_C-Domänen des Proteins NifL (AS 147 bis 272) aus *A. vinelandii* und *E. coli* DcuS (AS 213 bis 325). α -Helices sind in Gelb und β -Faltblätter in Grün markiert. Lila hervorgehoben sind die Aminosäure-Reste von PAS_C die sich aus dem Sequenzvergleich zu NifL ergeben haben. Ausgewählte Aminosäuresubstitutionen von NifL sind in schwarz dargestellt. Konservierte Reste von DcuS sind durch einen Stern (orange) markiert.

Die Reste von DcuS wurden durch Mutagenese gegen Alanin, bzw. Cystein ausgetauscht. Durch Transformation und Komplementation des *dcuS*-Insertionsstammes IMW260 mit den mutierten Derivaten von pMW181, konnte der Funktionszustand der DcuS-Varianten anhand der β -Galaktosidase-Aktivität mit DcuS_{Wt} verglichen werden. Durch gerichtete Mutagenese konnten 14 ON-Varianten, vier OFF-Varianten und 44 stille-Varianten generiert werden.

In einem alternativen Ansatz zur Gewinnung von PAS_C-Punktmutanten wurde eine modifizierte PCR mit erhöhter Fehlerrate eingesetzt. Die Kombination eines angepassten PCR-Protokolls mit erhöhter Zyklenzahl, hoher Magnesiumkonzentration, unterschiedlicher dNTP-Variationen und der natürlichen Fehlerrate von 0,025% der Taq-Polymerase ergaben eine hohen Fehlerrate der PCR (Cadwell und Joyce 1992). Nach ungerichteter Mutagenese des PAS_C-Fragmentes mit einer Länge von 340 Basen und Restriktion des Fragmentes und des Ursprungsvektors pMW181, wurde das mutierte PAS_C-Fragment in den Ursprungsvektor kloniert. Für das Screening wurden die mutierten Derivate von pMW181 in *E. coli* IMW260 transformiert. Nach Abklatsch eines ausplattierten Transformationsansatzes von einer LB-Platte auf X-Gal-eM9-Agarplatten mit und ohne Fumarat, wurden die Platten unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Das Screening der Kolonien auf den gewünschten Phänotyp erfolgte nach Vergleich der Platten mit und ohne Fumarat (Abb. E7).

Gesucht wurde zum einen nach dem Phänotyp ON, der eine konstitutive Aktivierung der *dcuB*-Expression zeigt. Das künstliche Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) wird durch das Enzym β -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Luftsauerstoff oxidiert 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, der dann in den *dcuB*-Expression-positiven Klonen zu einer Blaufärbung der Kolonien oder ihrer Umgebung führt.

Der zweite gewünschte Phänotyp war der OFF-Phänotyp. Dieser zeigt keine *dcuB*-Expression und die Kolonien blieben auch mit Fumarat weiß. Stille- oder Wildtyp-Kolonien zeigten auf Fumarat eine Blaufärbung und ohne Effektor keine Färbung der Kolonien.

Man kann sagen, dass die ungerichtete Mutagenese via PCR essentiell ist, um nicht vorhergesagte DcuS-Varianten gewinnen zu können.

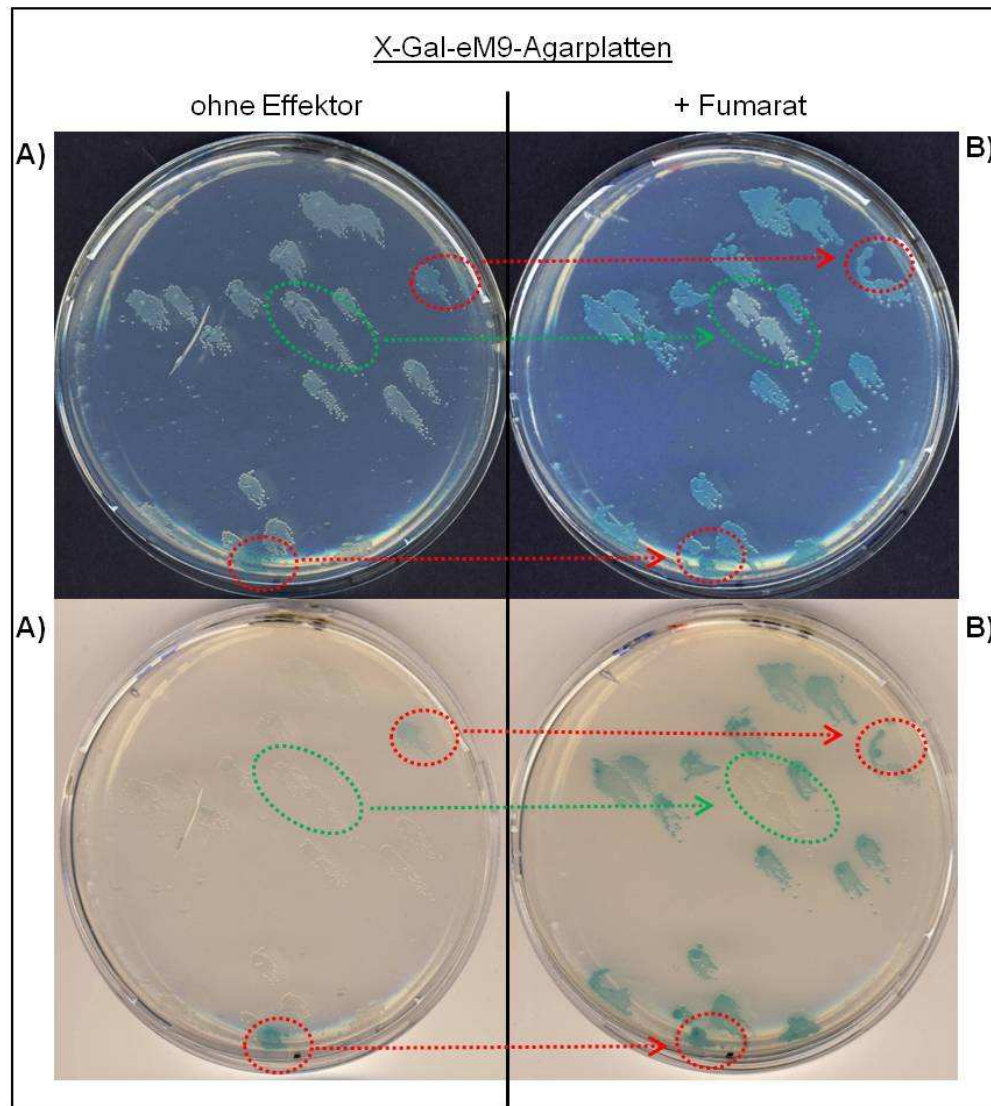


Abb. E7: Screening von PAS_c-Varianten nach ungerichteter Mutagenese. Das Screening erfolgte nach Abklatsch von einer LB-Platte mit ungerichteten DcuS-Varianten auf X-Gal-eM9-Indikatorplatten ohne (A) und mit Fumarat (B). Die Zucht erfolgte anaerob über Nacht. In Rot sind potentielle Signal-ON und in Grün Signal-OFF PAS_c-Varianten hervorgehoben.

4.3.2 Qualitativer Nachweis der Funktion von DcuS

Zum qualitativen Nachweis der Expression von *dcuB* von DcuS-Varianten wurde der *dcuS* Insertionstamm IMW260 mit plasmidkodierten DcuS-Varianten von pMW181 auf eM9-Indikatorplatten mit X-Gal, Antibiotika mit oder ohne Fumarat ausgestrichen (Tab. E1). Anschließend wurden die Platten unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Das Screening auf den gewünschten Phänotypen erfolgte nach Vergleich der Platten mit und ohne Induktor Fumarat. Die Aktivität der β -Galaktosidase als Produkt der *dcuB*-Reporterfusion ist ein direktes Maß für die Aktivität von DcuS.






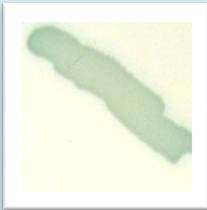


Das künstliche Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) wird durch die β -Galaktosidase zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Luftsauerstoff oxidiert 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, der zu einer Blaufärbung der Kolonien führt.

Die Tabelle E1 zeigt den qualitativen Nachweis der Funktion von DcuS-Varianten im Plattentest am Beispiel von wildtypischen DcuS (DcuS_{wt}), der ON-Variante DcuS-N248D und der OFF-Variante DcuS-L300A. Der *dcuS*-Insertionsstamm zeigte auf beiden Indikatorplatten keine Blaufärbung, somit wurde die Reporterinsertion nicht induziert. Wenn Fumarat vorliegt, exprimiert der mit DcuS_{wt} komplementierte Insertionsstamm *dcuB*, was an der blauen Farbe der Kolonien erkennbar ist. DcuS_{wt} zeigte ohne Fumarat dagegen keine Blaufärbung.

ON-Varianten, z. B. wie DcuS-N248D, zeigten in An- und Abwesenheit von Fumarat eine Blaufärbung, dies ist ein Hinweis auf eine konstitutive Expression von *dcuB*. Im Gegensatz zu ON-Varianten zeigten OFF-Varianten, z. B. DcuS-L300A, mit und ohne Fumarat in den eM9-Indikatorplatten keine Blaufärbung und damit auch keine *dcuB*-Expression. Im Anhang ist das Verhalten der restlichen ON- und OFF-Varianten der PAS_C-Domäne von DcuS im Plattentest abgebildet.

Man kann festhalten, dass der qualitative Nachweis eine gute Hilfe bei der Vorauswahl von DcuS-Varianten darstellt und das Screening nach geeigneten Varianten erleichtert.

Tab. E1: Qualitativer Nachweis der *dcuB*-Expression der Signal-ON und Signal-OFF PAS_C-Varianten. Die Zucht für den qualitativen Nachweis der *dcuB*-Expression erfolgte anaerob, auf eM9-Indikatorplatten mit X-Gal (0,5 mM), Kanamycin (50 μ g/ml), mit und ohne Fumarat (20 mM).

Protein (Plasmid)	IMW260 (<i>dcuS</i>)			
	nur Reporter	DcuS _{wt} (pMW181)	DcuS-N248D (pMW421)	DcuS-L300A (pMW922)
ohne Fumarat				
mit Fumarat				

4.3.3 Drei Klassen von DcuS-Varianten

Insgesamt wurden 70 verschiedene PAS_C-Varianten mittels gerichteter und ungerichteter Mutagenese generiert. Der Funktionszustand der Varianten wurde *in vivo* anhand der β -Galaktosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*-Reportergenfusion im *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 untersucht. Die verschiedenen DcuS-Varianten zeigten drei charakteristische Muster der *dcuB*-Expression. Aufgrund dessen wurde eine Einteilung der DcuS-Varianten in drei Klassen vorgenommen:

Die Abbildung E8 zeigt die verschiedenen Klassen von DcuS-Varianten. In die Klasse 1 werden ON-Varianten eingeordnet. ON-Varianten, wie DcuS-N248D und DcuS-A317D weisen eine sehr starke *dcuB*-Expression bereits in Abwesenheit von Fumarat (> 50 MU) auf. Die *dcuB*-Expression ohne Fumarat ist somit mindestens um Faktor 4 im Vergleich zu DcuS_{Wt} erhöht. Die Klasse 1 kann auf 2 Subklassen verteilt werden. Klasse 1a zeichnet sich durch einen Fumarat-Induktionsfaktor von $\leq 1,2$ aus. Diese ON-Varianten, wie DcuS-N248D zeigen eine fumaratunabhängige Expression von *dcuB*. Das bedeutet, dass die *dcuB*-Expression in Anwesenheit des Effektors nicht weiter gesteigert werden konnte. ON-Varianten der Klasse 1b, wie DcuS-A317D sind durch Fumarat weiter induzierbar (> 1,2). Je größer der Fumaratinduktion-Faktor, desto stärker stimuliert Fumarat die Expression der Reportergenfusion.

OFF-Varianten, wie DcuS-L300A sind in der Klasse 2 eingestuft. OFF-Varianten zeichnen sich durch eine sehr geringe *dcuB*-Expression in An- und Abwesenheit von Fumarat aus (≤ 50 MU), vergleichbar mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260. Stille-Varianten sind in Klasse 3 eingeordnet. Diese zeigen eine wildtypische *dcuB*-Expression, vergleichbar mit DcuS_{Wt}.

Durch die gerichtete Mutagenese wurden 14 ON-Varianten, vier OFF-Varianten und 45 stille-Varianten generiert. Durch die ungerichtete Mutagenese wurden 24 unterschiedliche Varianten von DcuS gefunden. Von diesen waren nur 17 PAS_C-Varianten. Unter diesen wurden 7 neue PAS_C-Varianten identifiziert. Davon sind vier ON-Varianten (DcuS-L246R, -N248T, -S319P, F321A), eine OFF-Variante (DcuS-L300A) und zwei stille-Varianten (DcuS-R224A, -I237C) der PAS_C-Domäne.

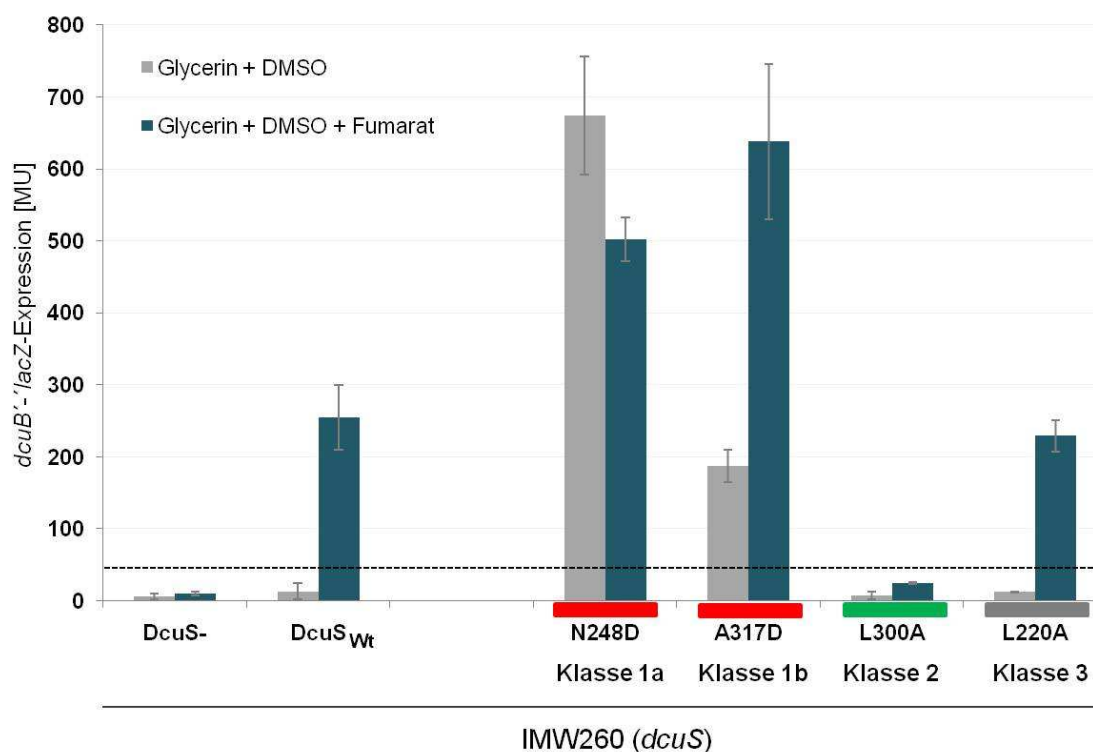


Abb. E8: Induktion von *dcuB* durch DcuS und DcuS-Varianten. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}) und den DcuS-Varianten. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die die ON-Varianten sind in Rot, die stille Variante in Grau und die OFF-Variante ist in Grün hervorgehoben. Die Balken geben die Standardabweichung an.

4.3.4 ON-Mutationen der PAS_C-Domäne

Die Abbildung E9 zeigt die 11 verschiedenen ON-Varianten von PAS_C. Diese sind über die komplette PAS_C-Domäne verteilt, jedoch vermehrt in dem β -Faltblatt-Gerüst am C-Terminus von PAS_C zu finden. Am Ende der N-terminalen Helix befindet sich eine ON-Variante DcuS-L228A, welche eine starke *dcuB*-Expression zeigte und einen Fumarat-Induktionsfaktor von 2,1 besitzt. Die *dcuB*-Expression in Abwesenheit von Fumarat zeigte eine Erhöhung um Faktor 16. Somit ist DcuS-L228A eine ON-Variante der Klasse 1b.

Am Ende des zweiten β -Faltblatts und zwischen dem zweiten β -Faltblatt und der zweiten α -Helix sind zwei ON-Varianten DcuS-L246R und DcuS-N248D lokalisiert. Der Rest L246 liegt in dem zweiten β -Faltblatt von PAS_C. DcuS-L246R stellt eine ON-Variante der Klasse 1a dar, die eine Fumaratunabhängigkeit mit einem Fumarat-Induktionsfaktor von 1,2 aufzeigte. Der Rest N248 liegt zwischen dem zweiten β -Faltblatt und der zweiten α -Helix. Dieser Rest ist in PAS-Domänen der verschiedenen Reiche hoch konserviert und stellt somit einen der wichtigsten Reste der PAS_C-Domäne dar. Die Substitution von Asparagin gegen Aspartat

(DcuS-N248D) resultierte in einer Induktion mit Fumarat um Faktor 0,8 und somit in eine stark fumaratunabhängige ON-Variante der Klasse 1a. Der Rest D291 wurde Asparagin ausgetauscht. Die Substitution resultierte in eine ON-Variante der Klasse 1b mit einem Fumarat-Induktionsfaktor von 3,7. Die *dcuB*-Expression mit Fumarat ist nur schwach um bis zu Faktor 1,5 erhöht. Die ON-Variante DcuS-N304D der Klasse 1a besitzt einen Fumarat-Induktionsfaktor von 1,0 und zeigte eine sehr starke Stimulierbarkeit der *dcuB*-Expression auf. In An- und Abwesenheit konnte eine Aktivität von knapp 700 MU erzielt werden. In Abwesenheit von Fumarat wurde eine Steigerung um Faktor 50 im Vergleich zum DcuS_{Wt} erreicht. Somit ist DcuS-N304D eine fumaratunabhängige ON-Variante mit stark erhöhter *dcuB*-Expression mit und ohne Fumarat.

Die ON-Varianten DcuS-I315A und DcuS-T320A zeichnen sich durch eine um Faktor 2 erhöhte *dcuB*-Expression in Anwesenheit von Fumarat und einen erhöhten Fumarat-Induktionsfaktor von 6 bis 7,3 aus. Der Rest A317 wurde gegen Aspartat (DcuS-A317D) und der Rest F321 gegen Alanin (DcuS-F321A) ausgetauscht. Es ergaben sich starke *dcuB*-Expressionen mit Fumarat von 569 MU bis zu 640 MU und eine um Faktor 14,5 erhöhte Expression von *dcuB* ohne Fumarat. Der Fumarat-Induktionsfaktor lag bei 3,4 bis 3,7 somit können DcuS-A317D und DcuS-F321A den ON-Varianten der Klasse 1b zugeordnet werden. Weitere zwei ON-Varianten der Klasse 1b (DcuS-S319P, DcuS-R322A) zeigten einen Induktionsfaktor mit Fumarat von 1,4 bis 1,6 und einen um Faktor 2 erhöhte *dcuB*-Expression in Anwesenheit von Fumarat.

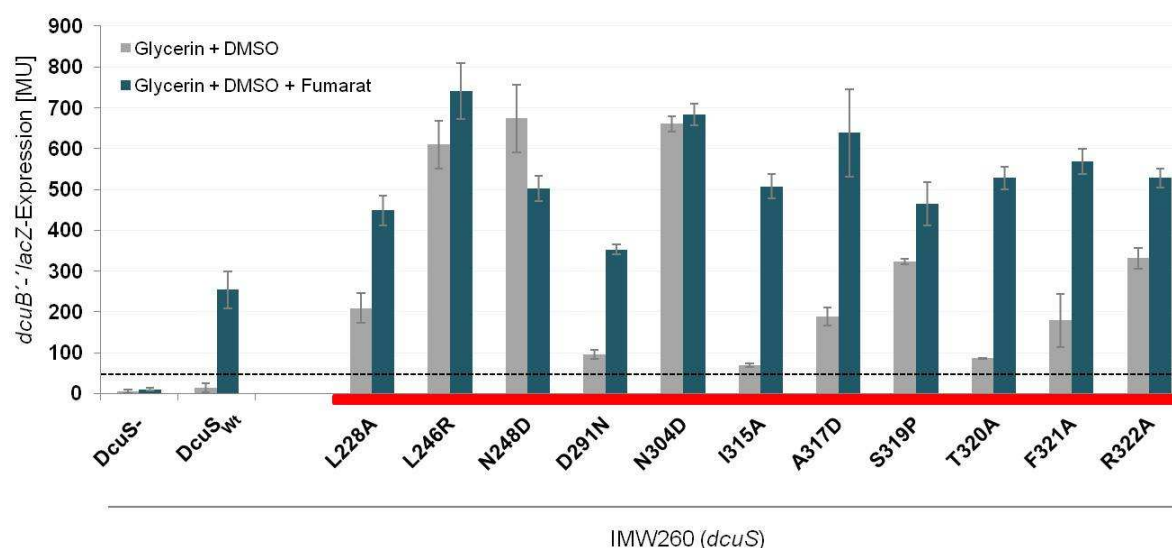


Abb. E9: Induktion von *dcuB* durch ON-Varianten der PAS_c-Domäne. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

Verschiedene Aminosäuresubstitutionen eines Restes können unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression von *dcuB* ausüben. Zur weiteren Charakterisierung verschiedener Reste wurde überprüft, welchen Effekt andere Substitutionen auf die *dcuB*-Expression ausüben (Abb. E10, E12, E13). Die Abb. E10 zeigt die erweiterte Mutagenese von vier verschiedener ON-Varianten (DcuS-L228R, -N248D, -D291N, A317D).

Die Substitution von Leucin gegen Arginin (DcuS-L246R) und gegen Alanin (DcuS-L246A) ergab in Anwesenheit von Fumarat eine starke *dcuB*-Expression und eine Steigerung der Expression um Faktor 2,9. Hydrophobe Aminosäuren sind wichtig für die korrekte Faltung des Proteins. Sie lagern sich im Inneren der Struktur zusammen und können dadurch große Teile des Proteins vor Wasser abschirmen. Der Austausch der hydrophoben Aminosäure Leucin gegen die basische Aminosäure Arginin resultierte in eine ON-Variante der Klasse 1a. Die Substitution von Leucin gegen die ebenso hydrophobe Aminosäure Alanin (DcuS-L246A) zeigte eine erhöhte *dcuB*-Expression mit Fumarat vergleichbar mit DcuS-L246R, der Induktionsfaktor mit Fumarat lag bei 13,1. Ohne Fumarat hingegen, zeigte DcuS-L246A nur eine leichte Erhöhung der *dcuB*-Expression (51 MU) und ist somit eine ON-Variante der Klasse 1b dar.

Der Rest N248 ist in PAS-Domänen der verschiedenen Reiche hoch konserviert und ist somit einer der wichtigsten Reste in PAS_C-Domänen. Dieser Rest ist zu 44% ein Asparagin, stellt aber vor allem in Eukaryoten einen Serin-Rest (31%) dar (Taylor & Zhulin, 1999). Asparagin ist eine polare, hydrophile Aminosäure. Der Rest N248 wurde gegen insgesamt sechs verschiedene Aminosäuren ausgetauscht. Die Substitution gegen die saure Aminosäure Aspartat (DcuS-N248D) resultierte in eine stark fumaratunabhängige ON-Variante. Auch die Substitutionen gegen die hydrophobe Aminosäure Alanin (DcuS-N248A) und der hydrophilen Aminosäure Threonin (DcuS-N248T) ergaben eine Induktion mit Fumarat um Faktor 0,7 bis 1,0 und somit in zwei weitere stark fumaratunabhängige ON-Varianten der Klasse 1a. DcuS-N248A zeigte sogar eine Steigerung der *dcuB*-Expression um Faktor 62 (800 MU) in Abwesenheit von Fumarat gegenüber DcuS_{Wt}. Die Substitution von Asparagin gegen die ebenso hydrophilen Aminosäuren Serin und Glycin und gegen die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin führte zu drei ON-Varianten der Klasse 1b mit einem Fumarat-Induktionsfaktor zwischen 1,7 und 4,8. Der Austausch gegen Serin bewirkte eine deutlich schwächere *dcuB*-Expression ohne Fumarat im Vergleich zu den restlichen Substitutionen. Möglicherweise ist Serin in der Lage die Wasserstoffbrückenbindungen wieder herzustellen. Somit ergaben sich aus allen sechs Aminosäureaustauschen des Restes N248 sechs ON-Varianten, das zeigt, dass der Rest N248 eine wichtige Aminosäure in der PAS_C-Domäne darstellt.

Der Rest D291 wurde gegen zwei Aminosäuren ausgetauscht. Die saure Aminosäure Aspartat wurde gegen die hydrophile Aminosäure Asparagin und die kleine hydrophobe Aminosäure Alanin ausgetauscht. Beide Substitutionen zeichnen sich durch eine um Faktor 1,5 bis 2 erhöhte *dcuB*-Expression in Anwesenheit von Fumarat und einen erhöhten Fumarat-Induktionsfaktor von 3,7 bis 6 bis aus. Es war kein großer Unterschied zwischen den zwei Substitutionen zu erkennen. Die Substitution von D291 ergaben zwei ON-Varianten (DcuS-D291N, DcuS-D291A) der Klasse 1b.

Der Rest A317 wurde gegen drei verschiedene Aminosäurereste ausgetauscht. Die Substitution der hydrophoben Aminosäure Alanin gegen die saure Aminosäure Aspartat (DcuS-A317D) zeigte eine starke *dcuB*-Expression mit und ohne Fumarat, somit kann DcuS-A317D den ON-Varianten der Klasse 1b zugeordnet werden. Die Substitution gegen die hydrophilen Aminosäuren Cystein und Tyrosin zeigten eine leichte Abschwächung *dcuB*-Expression mit Fumarat, doch im Ganzen hatten die zwei Substitutionen einen wildtypischen Phänotyp zur Folge.

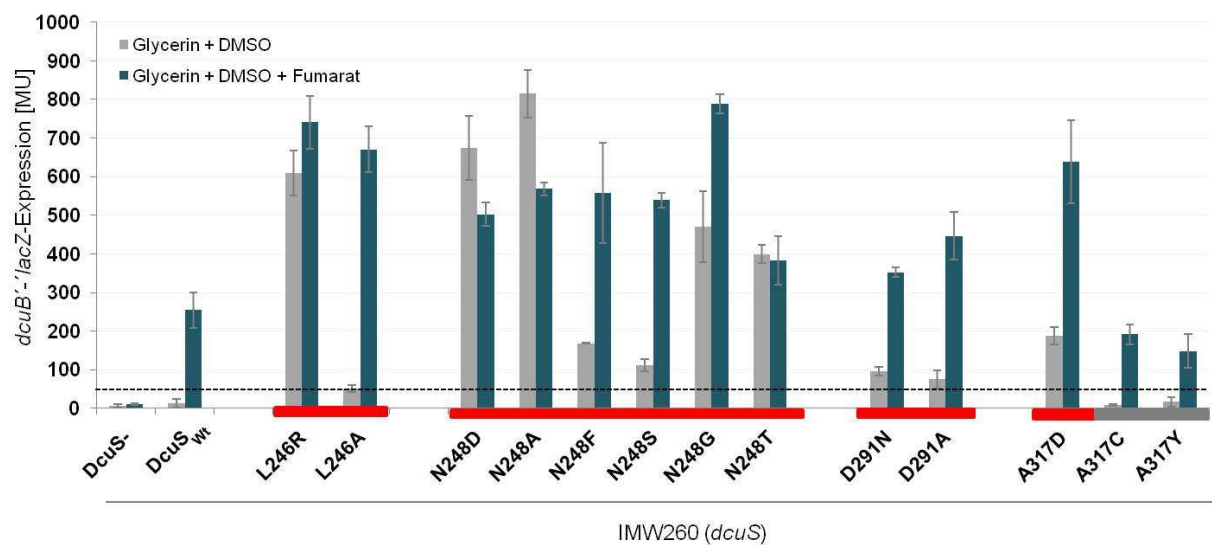


Abb. E10: Induktion von *dcuB*: Austausch von ON-Resten L246, N248, D291 und A317 gegen verschiedene Aminosäuren. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{wt}). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

4.3.5 OFF-Mutationen der PAS_C-Domäne

Die Abbildung E11 zeigt die fünf OFF-Varianten in der PAS_C-Domäne. Davon befinden sind drei am N-Terminus von PAS_C, eine im helikalen Linker und die fünfte mittig im β -Faltblatt-Gerüst. Die OFF-Varianten DcuS-E213A, DcuS-I217A und DcuS-F221A werden durch jeweils drei stille Varianten voneinander getrennt. Somit zeigen die OFF-Varianten in die gleiche Richtung in der ersten α -Helix. Die Substitution des Restes V276 gegen Alanin führte zu einer OFF-Variante (DcuS-V276A) mit einer geringen *dcuB*-Expression in An- und Abwesenheit von Fumarat, wie der *dcuS*-Insertionsstamm IMW260. Am Anfang des vierten β -Faltblatts konnte die fünfte OFF-Variante DcuS-L300A charakterisiert werden. Die Aktivität von DcuS-L300A in An- und Abwesenheit von Fumarat ist sehr gering und verbleibt somit auch unterhalb des Schwellenwertes von 50 MU.

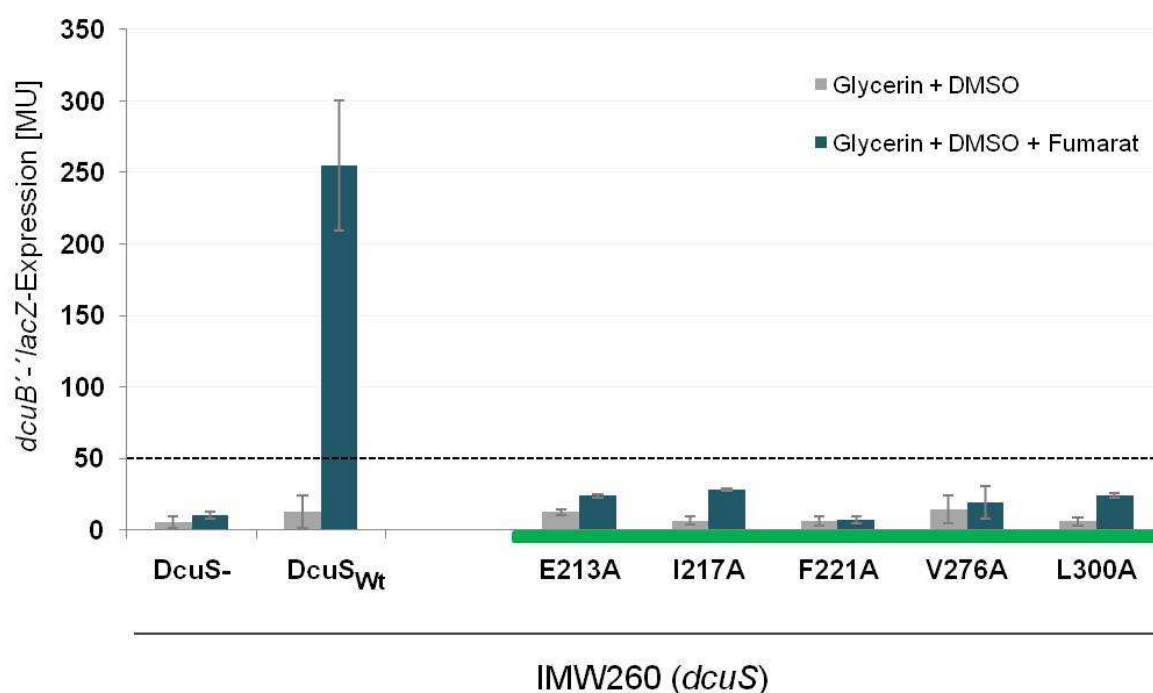


Abb. E11: Induktion von *dcuB* durch OFF-Varianten der PAS_C-Domäne. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an. Die OFF-Varianten sind in Grün markiert.

Die Abbildung E12 zeigt die erweiterte Mutagenese mit dem Rest V276. Der Rest V276 wurde gegen drei Aminosäuren ausgetauscht. Die Substitution von Valin, einer hydrophoben Aminosäure, gegen die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Alanin führte zu einer OFF-Variante. Die Substitution von Valin gegen die hydrophile Aminosäure Cystein und die saure

Aminosäure Aspartat führte zu einem wildtypischen Phänotyp mit leicht reduzierter β -Galaktosidase-Aktivität in Anwesenheit von Fumarat.

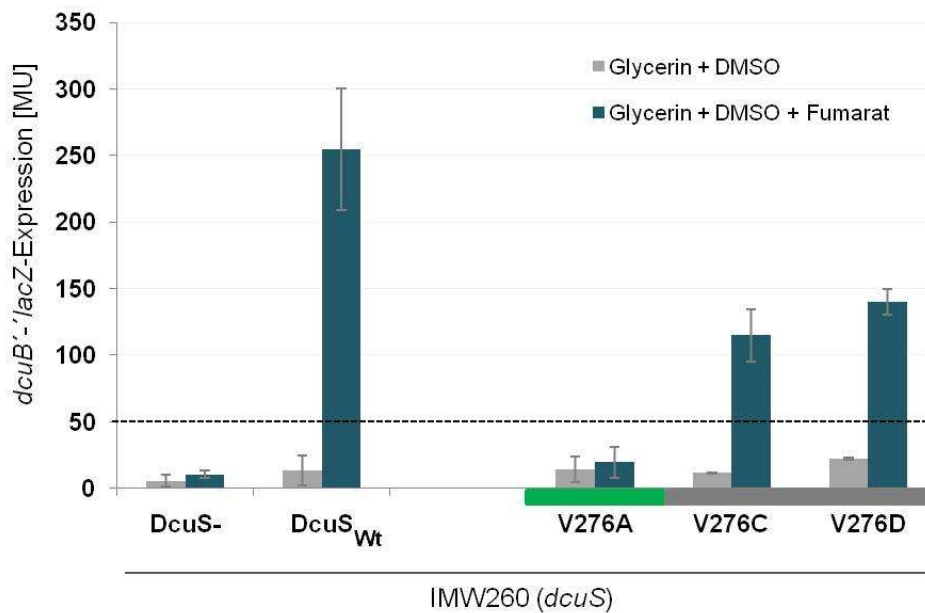


Abb. E12: Induktion von *dcuB*: Austausch von OFF-Rest V276 gegen verschiedene Aminosäuren. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

4.3.6 Stille Mutationen in PAS_C: Expression von *dcuB*

Die Abbildung E13 zeigt die 47 stillen DcuS-Varianten (Klasse 3) in der PAS_C-Domäne. Diese sind in jeder Region von PAS_C zu finden. In der N-terminalen Kappe wurden zehn, im PAS-Kern 17, im helikalen Linker vier und im β -Faltblatt-Gerüst 16 stille DcuS-Varianten generiert. Es konnten Unterschiede in der β -Galaktosidase-Aktivität in Anwesenheit von Fumarat zwischen den stillen DcuS-Varianten beobachtet werden, dabei verblieben alle *dcuB*-Expressionen der stillen Varianten ohne Fumarat unterhalb des Schwellenwertes (50 MU):

15 von 47 stillen Varianten zeigten eine wildtypische oder bis zu Faktor 1,5 stärkere oder schwächere Expression von *dcuB* im Vergleich zu DcuS_{Wt}: DcuS-E216A, -S218A, -L220A, D239N, -D249A,- K259A, -Q261A, -S270A, -S272A, -V277A, -R289A, -E293Q, -I296D, I318A, -D232N. Diese Varianten zeichnen sich aus, dass die *dcuB*-Expression ohne Fumarat unterhalb des Schwellenwertes (50 MU) verbleibt. Mit Fumarat zeigen diese stillen

Varianten eine gleiche oder bis zu Faktor 1,5 stärkere, schwächere Expression von *dcuB* im Vergleich zu $DcuS_{Wt}$.

Eine reduzierte *dcuB*-Expression mit Fumarat um bis zu Faktor 2, war bei 12 Varianten zu beobachten: $DcuS$ -P214A, -D239G, -D240A, -V276C, -V276D, -D278A, -R290A, -I296A, -I296C, -K297A, -A317C, -A317Y. Eine sehr stark reduzierte *dcuB*-Expression mit Fumarat zeigten zwei Varianten: $DcuS$ -Y215A und $DcuS$ -K232A. Beide Varianten $DcuS$ -Y215A (68 MU) und $DcuS$ -K232A (51 MU) zeigten eine höhere *dcuB*-Expression mit Fumarat als typische OFF-Varianten (< 50 MU). Somit wurden beide in die Klasse 3 eingeordnet.

Dagegen konnten bei 13 Varianten eine Erhöhung der *dcuB*-Expression mit Fumarat um bis Faktor 2 beobachtet werden: $DcuS$ -T219A, -R224A, -Q225A, -Q229A, -I231T, -A251C, -L254T, -H271A, -T287A, -T305A, -N311A, -N311D, -V313A. Zusätzlich zeigte $DcuS$ -I231T eine Erhöhung der Expression von *dcuB* in Abwesenheit von Fumarat um Faktor 2,3. Fünf stille Varianten zeigten eine starke Erhöhung der *dcuB*-Expression mit Fumarat ab Faktor 2: $DcuS$ -E222A, -A237C, -N256A, -N256D, -W273A. Somit sind die fünf stillen Varianten stark induzierbar mit Fumarat. Die zwei stillen Varianten $DcuS$ -E222A und $DcuS$ -W273A zeigten zusätzlich eine erhöhte *dcuB*-Expression ohne Fumarat um Faktor 3,7 verblieben aber unterhalb des Schwellenwertes von 50 MU.

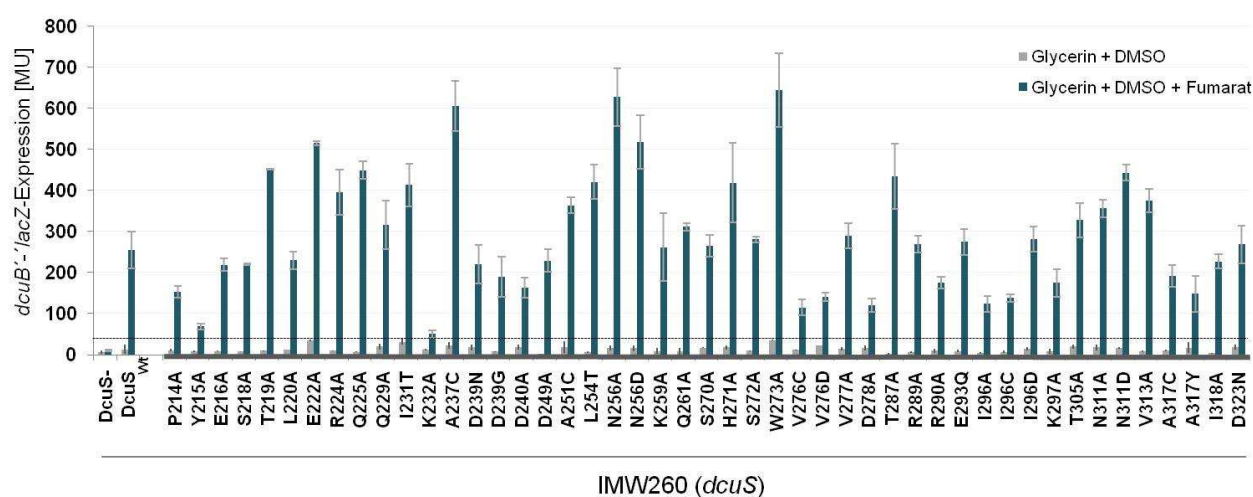


Abb. E13: Induktion von *dcuB* durch stille *DcuS*-Varianten der PAS_c -Domäne. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, $DcuS_{Wt}$). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die stillen *DcuS*-Varianten sind in Grau hervorgehoben. Die Balken geben die Standardabweichung an.

Mit vier stillen Resten wurde eine erweiterte Mutagenese durchgeführt und diese Reste gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht (Abb. E14). Die Substitution des sauren Restes D239 gegen Asparagin ($DcuS$ -D239N) hatte eine wildtypische und gegen die

hydrophile Aminosäure Glycin eine leicht reduzierte *dcuB*-Expression zur Folge. Somit scheint der Rest D239 keine Auswirkung auf die Struktur und Funktion von DcuS auszuüben. Der hydrophile Rest N256 befindet sich am Ende der zweiten α -Helix und wurde gegen die hydrophobe Aminosäure Alanin und saure Aminosäure Aspartat ausgetauscht. Mit beiden Substitutionen wurde eine über Faktor 2 erhöhte Expression von *dcuB* mit Fumarat erzielt. Der hydrophobe Rest I296 zeigte nach Austausch gegen die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Alanin und hydrophile Aminosäure Cystein in Anwesenheit von Fumarat eine verringerte *dcuB*-Expression um Faktor 2,5. Die Substitution gegen die saure Aminosäure Aspartat (DcuS-I296D) zeigte eine Aktivität wie DcuS_{Wt}. Beide Austausche des hydrophilen Restes N311 gegen die hydrophile Aminosäure Alanin und der sauren Aminosäure Aspartat führte zu einem um Faktor 1,5 verstärkte *dcuB*-Expression in Anwesenheit von Fumarat.

Bei allen vier Resten zeigte die Substitution gegen andere Aminosäuren nur leichte Auswirkungen auf die *dcuB*-Expression und somit hatten die stillen Varianten keine ausschlaggebenden Veränderungen der Struktur oder Funktion von DcuS zur Folge.

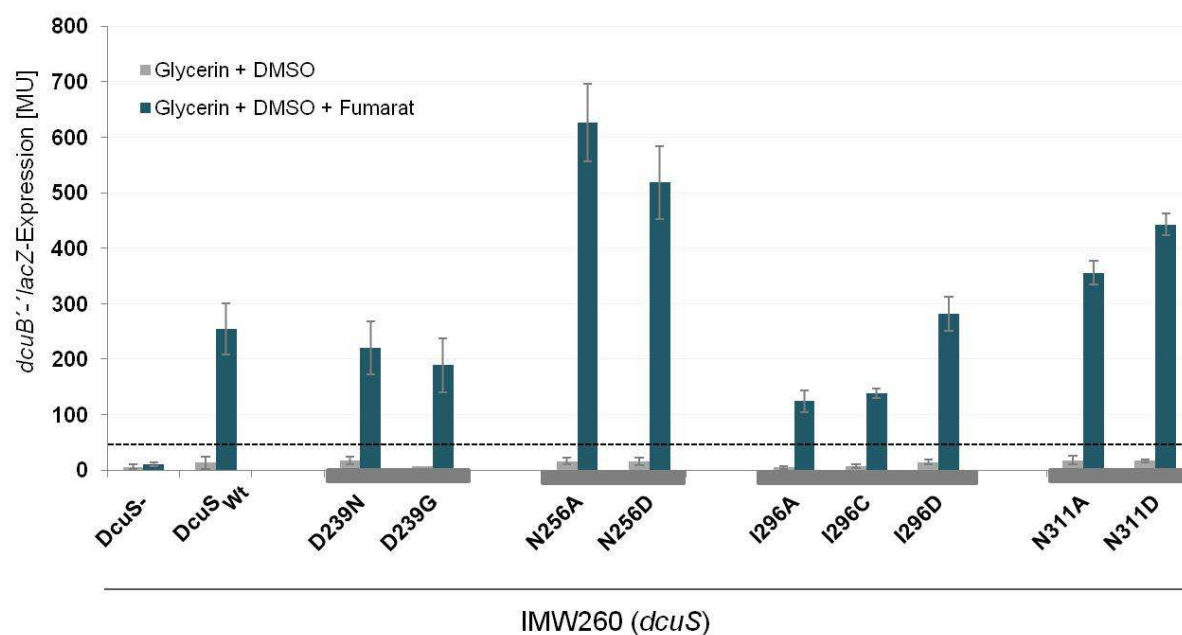


Abb. E14: Induktion von *dcuB*: Austausch von stillen Resten D239, N256, I296 und N311 gegen verschiedene Aminosäuren. Die Messungen erfolgte mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und dem komplementierten Stamm IMW260 mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS_{Wt}). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an.

4.3.7 Lage der PAS_C-Mutanten

Die Sekundärstruktur der N-terminalen Kappe besteht aus der ersten α -Helix der PAS_C-Domäne von Aminosäure L212 bis Q229. Der PAS-Kern umfasst Aminosäure S230 bis S272 und besteht aus den ersten zwei β -Faltblättern und drei darauffolgende α -Helices. Der helikale Linker von Aminosäure W273 bis G286 besteht im Wesentlichen aus einer fünften α -Helix. Die Sekundärstruktur des β -Faltblatt-Gerüsts umfasst Aminosäure T287 bis D323 und besteht aus den letzten drei β -Faltblättern der PAS_C-Domäne.

Insgesamt wurden 70 PAS_C-Varianten (Abb. E15) in den vier Regionen der PAS_C-Domäne generiert: Es konnten fünf ON-Varianten der Klasse 1a zugeordnet werden: DcuS-L246R, DcuS-N248A, DcuS-N248D, DcuS-N248T und DcuS-N304D. Diese zeigten einen Fumarat-Induktionsfaktor von $\leq 1,2$ und somit eine fumaratunabhängige Expression von *dcuB*. Zusätzlich hatten diese ON-Varianten eine Steigerung der *dcuB*-Expression um das 62-fache in Abwesenheit von Fumarat gegenüber DcuS_{WT} zur Folge. Die restlichen 13 ON-Varianten (DcuS-L228A, -L246A, -N248S, -N248G, -N248F, -D291A, -D291N, -A317D, -S319P, -T320A, -F321A, -R322A) wiesen in Anwesenheit von Fumarat eine starke Stimulierung der *dcuB*-Expression auf, und zeigten einen höheren Induktionsfaktor für Fumarat $> 1,2$. Somit wurden diese ON-Varianten der Klasse 1b zugeordnet. ON-Varianten findet man hauptsächlich in der vorderen und hinteren Region der PAS_C-Domäne. Drei Reste sind im vorderen Teil lokalisiert. Der Rest L228 befindet sich in der α 1-Helix der N-terminalen Kappe. Der Rest L246 liegt im β 2-Faltblatt, zwei Aminosäuren vor dem Rest N248. N248 liegt zwischen dem β 2-Faltblatt und der α 2-Helix in einem unstrukturierten Bereich. Beide Reste sind am Anfang des PAS-Kerns lokalisiert. Im β -Faltblatt-Gerüst (β 3 β 4 β 5) sind die restlichen ON-Mutanten zu finden. Der Rest D291 liegt zentral im β 3-Faltblatt. Der Rest N304 befindet sich mittig im β 4-Faltblatt. Im β 5-Faltblatt liegen sechs ON-Reste: I315, A317, S319, T320, F321 und R322.

In Klasse 2 konnten fünf OFF-Varianten eingeteilt werden: DcuS-E213A, DcuS-I217A, DcuS-F221A, DcuS-V276A und DcuS-L300A. Diese OFF-Varianten zeichnen sich durch die geringe *dcuB*-Expression in An- und Abwesenheit von Fumarat von ≤ 50 MU aus und somit verbleibt die *dcuB*-Expression unterhalb des Schwellenwertes. Drei OFF-Reste (E213, I217, F221) sind in der α 1-Helix der N-terminalen Kappe lokalisiert. Der Rest V276 befindet sich zwischen der α 4- und α 5-Helix in einem unstrukturierten Bereich. Der Rest L300 ist am Anfang des β 4-Faltblatts im β -Faltblatt-Gerüst zu finden.

Die restlichen 47 stillen DcuS-Varianten stellen die Klasse 3 dar. Diese zeigen eine wildtypische Expression von *dcuB*, somit hatten Aminosäuresubstitutionen keinen starken Einfluss auf die Aktivität und Stimulierbarkeit der Reporterfusion. Die stillen Reste verteilen sich über die gesamte PAS-Domäne.

Von den 47 stillen Varianten zeigten fünf (DcuS-Y215A, -E222A, -I231T, -K232A, -W273A) eine stärkere bzw. schwächere *dcuB*-Expression als die restlichen stillen Varianten. Die Reste Y215 und E222 befinden sich in der α 1-Helix. Die zwei Reste I231T und K232 liegen in einem unstrukturierten Bereich in dem N-terminalen Loop zwischen der α 1-Helix und dem β 1-Faltblatt. Der Rest W273 befindet sich auch in einem unstrukturierten Bereich zwischen der α 5-Helix und der α 5-Helix.

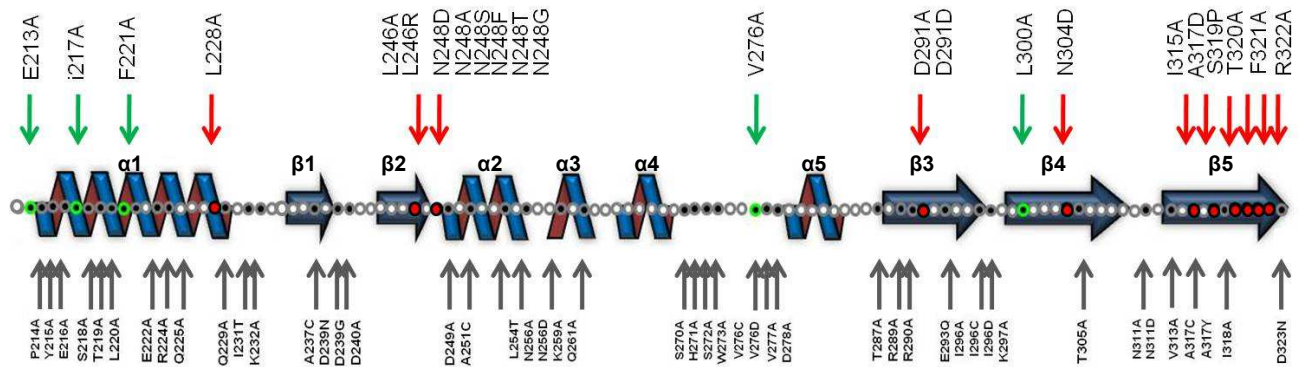


Abb. E15: Lage der PAS_C-Mutanten in der PAS_C-Domäne. Abgebildet ist die Sekundärstruktur der PAS_C-Domäne von Aminosäure L212 bis D323. Die 18 ON-Varianten (11 Positionen) sind in Rot, die 5 OFF-Varianten in Grün und die 47 stillen-Varianten in Schwarz dargestellt.

4.3.8 Effekt von Malat auf die Funktion von DcuS

In Anwesenheit des Effektors Fumarat werden die Gene der Fumaratatmung, so auch die Reporterfusion mit *dcuB* induziert. Die Sensorkinase DcuS erkennt unter anderem auch das C₄-Dicarboxylat L-Malat, das einen Effektor für das DcuSR-Systems darstellt (Zientz *et al.*, 1998). Die periplasmatische Sensordomäne von DcuS wurde mit gebundenem Malat kristallisiert (Cheung & Hendrickson, 2008). Untersucht werden sollte, ob sich Malat in seiner Wirkung auf ON- und OFF-Varianten von Fumarat unterscheidet.

Die Abbildung E16 zeigt den Effekt von Fumarat und Malat auf die *dcuB*-Expression der ausgewählten fünf OFF- und elf ON-Varianten der PAS_C-Domäne. Mit dem Fumarat-Malat-Induktionsquotienten kann man die Differenz zwischen der Expression von Fumarat und Malat bestimmen. Je größer der Quotient, desto größer ist die Stimulierbarkeit durch Malat im Vergleich zu Fumarat. Somit ergeben sich drei verschiedene Fumarat-Malat-Induktionsvarianten. In Anwesenheit von Fumarat zeigte DcuS_{Wt} eine Expression der Reporterfusion von 255 MU. Mit Malat im Medium stieg die Expression von *dcuB* um weitere 17,5% auf 300 MU an. Somit zeigt DcuS_{Wt} einen Fumarat-Induktionsfaktor von 19,6 und einen Malat-Induktionsfaktor von 23. Der wildtypische Fumarat-Malat-Induktionsquotient

liegt somit bei 1,2 und zeigt, dass Malat im Wildtyp unter diesen Bedingungen den stärkeren Induktor darstellt. Wie erwartet, zeigten die fünf OFF-Varianten (DcuS-E213A, -I217A, -F221A, -V276A, -L300A) mit Fumarat bzw. Malat keine oder geringe *dcuB*-Expression. Die Anwesenheit von Malat hatte bei fünf ON-Varianten (DcuS-L228A, -I315A, -S319P, -T320A, -R322A) ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die Expression, wie bei DcuS_{Wt}. Der Fumarat-Malat-Induktionsquotient lag zwischen 1,2 und 1,4 und war somit ähnlich wie DcuS_{Wt}. Den größten Fumarat-Malat-Induktionsquotient zeigte die ON-Variante DcuS-N248D von 1,8. Die *dcuB*-Expression von DcuS-N248D ist mit Malat weiter stimulierbar. Somit ist DcuS-N248D zwar fumaratunabhängig, zeigte aber weiterhin eine gewisse Malatabhängigkeit. Im Gegensatz dazu zeigten die zwei ON-Varianten DcuS-A317D und DcuS-F321A einen Fumarat-Malat-Induktionsquotient von 0,7 bis 1,0. Bei diesen ON-Varianten stellte Fumarat den stärkeren Induktor von *dcuB* im Vergleich zu DcuS_{Wt} dar. Auch DcuS-L246R zeigte einen Fumarat-Malat-Induktionsquotient < 1, und zwar von 0,74. Doch ist diese ON-Variante durch Malat nicht weiter stimulierbar, da in Abwesenheit von Effektoren die *dcuB*-Expression höher war, als in Anwesenheit von Malat. Die ON-Variante DcuS-N304D hatte einen Fumarat-Malat-Induktionsquotient von 1,02 und ist durch beide Induktoren gleichermaßen stimulierbar. Somit ist DcuS-N304D fumarat- und malatunabhängig. Zusammenfassend kann man sagen, dass Malat einen guten Induktor der *dcuB*-Expression darstellt. Malat ist für viele DcuS-Varianten ein effektiverer Induktor als Fumarat. Die Unterschiede sind aber nur geringfügig und variieren für die verschiedenen DcuS-Varianten.

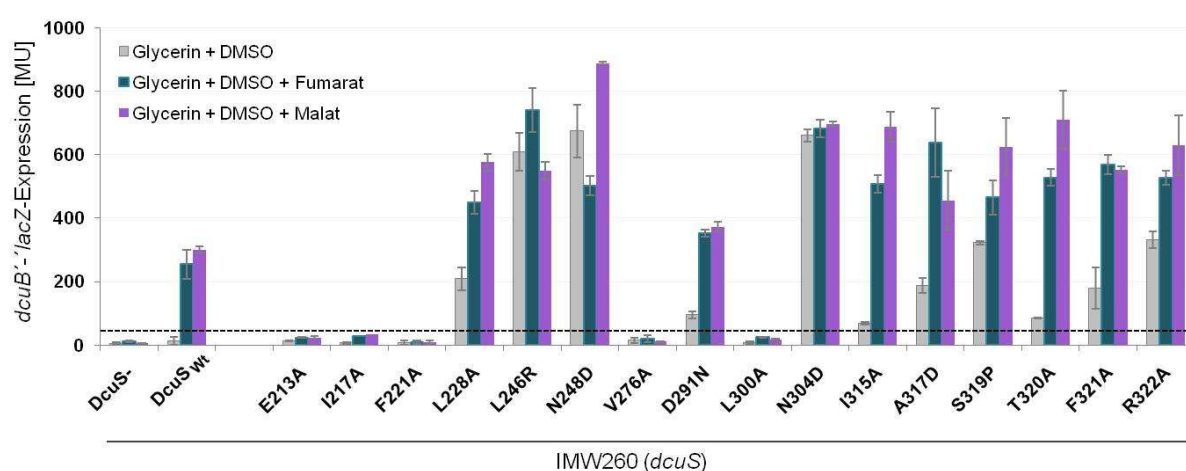


Abb. E16: Effekt von Fumarat oder Malat auf die Funktion von DcuS ON- und OFF-Varianten der PAS_C-Domäne. Die Messungen erfolgte im *dcuS*-Insertionsstamm IMW260 und mit komplementierten PAS_C-Varianten. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, entweder mit 20 mM Fumarat oder L-Malat als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an. Der Schwellenwert von 50 MU gibt die Signal-ON (>50 MU) und Signal-OFF (<50 MU) Grenze an.

4.3.9 Einfluss der ON-Mutation N248D auf andere Mutationen der PAS_c-Domäne

Es sollte überprüft werden, ob die ON-Mutation N248D einen Einfluss auf die Funktion anderer Mutationen ausübt (Abb. E17). Dafür wurden PAS_c-Varianten erstellt, die die Mutation N248D und eine weitere Mutation enthielten. Ausgesucht wurden Einzelmutationen, die bereits als stille-, ON- oder OFF-Varianten identifiziert worden waren.

Die erste Doppelvariante wurde mit der ON-Mutation N248D und der stillen-Mutation Q229A erstellt. Die ON-Variante DcuS-N248D ist fumaratunabhängig und zeigte einen Fumarat-Induktionsfaktor von 0,8. Die stille-Variante DcuS-Q229A wies eine wildtypische *dcuB*-Expression wie DcuS_{Wt} mit einem Fumarat-Induktionsfaktor von 16 auf. Die Doppelvariante DcuS-N248D-Q229A in Anwesenheit von Fumarat eine hohe Expression, vergleichbar mit der ON-Variante. In Abwesenheit von Fumarat lag die Expression von *dcuB* zwischen der Wildtyp- und der ON-Variante. Die Expression war durch Fumarat um den Faktor 2 stimulierbar.

Die zweite Doppelvariante wurde mit der ON-Mutation N248D und der ON-Mutation N304D erstellt. Die Doppelvariante DcuS-N248D-N304D zeigte im Vergleich zur ON-Variante DcuS-N304D eine etwas verringerte *dcuB*-Expression in Anwesenheit von Fumarat. Besonders deutlich nahm die Expression (Faktor 3,3) in Abwesenheit von Fumarat ab. Doppelvariante DcuS-N248D-N304D war im Vergleich zu den zwei ON-Varianten der Gruppe 1, DcuS-N248D und DcuS-N304D, nur noch teilweise fumaratunabhängig. Der Induktionsfaktor lag bei 2,3 und entspricht so einem ON-Charakter der Klasse 1b.

Die dritte Doppelvariante wurde durch Kombination mit der OFF-Mutation L300A erstellt. Die OFF-Variante DcuS-L300A zeigte in An- und Abwesenheit von Fumarat eine sehr geringe *dcuB*-Expression, vergleichbar mit einem DcuS-negativen Phänotyp. Die Doppelvariante DcuS-N248D-L300A wies eine deutliche Stimulierung der *dcuB*-Expression in Anwesenheit von Fumarat um Faktor 31,6 im Vergleich zu der OFF-Variante auf. Auch in Abwesenheit von Fumarat konnte eine Steigerung der *dcuB*-Expression um Faktor 23,3 erzielt werden. Der Fumarat-Induktionsfaktor liegt bei der Doppelvariante bei 4,7. Somit besitzt diese einen ON-Charakter der Klasse 1b.

Abschließend kann man sagen, dass die ON-Mutation N248D einen stimulierenden Effekt auf die *dcuB*-Expression der stillen- und OFF-Mutationen hatte. In den zwei Doppelvarianten konnte eine Stimulierbarkeit der *dcuB*-Expression in An- und Abwesenheit von Fumarat erzielt werden. Andererseits verlor DcuS-N248D in den Doppelmutanten einen guten Teil der Fumaratunabhängigkeit. Die ON-Doppelvariante DcuS-N248D-N304D verlor im Vergleich zu den ON-Einzelvarianten einen Teil der Fumaratunabhängigkeit. Alle Doppelvarianten zeigten somit einen ON-Charakter der Klasse 1b.

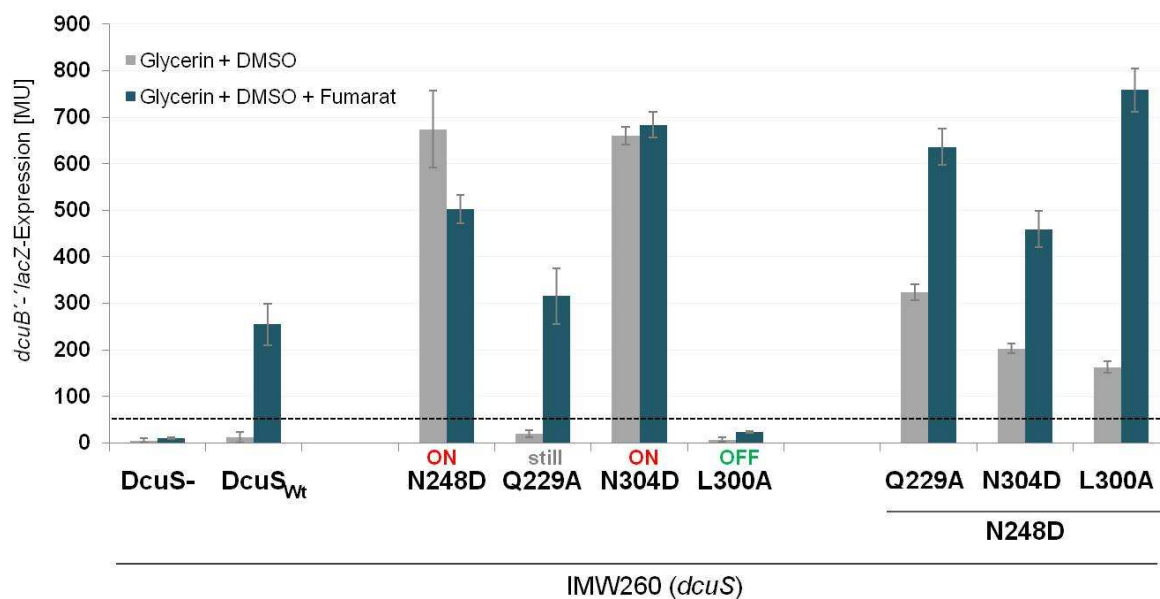


Abb. E17: Nachweis des Funktionszustandes von DcuS-Kombinationsvarianten der PAS_C-Domäne durch Expression von *dcuB* [MU]. Die Messungen erfolgte im *dcuS*- Deletionsstamm IMW260 und mit komplementierten PAS_C-Varianten und PAS_C-PAS_C-Kombinationsvarianten. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin, DMSO und mit 20 mM Fumarat als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an. In Rot sind die ON-Varianten, in Grau sind die stille-Variante und in Grün die OFF-Variante von PAS_C dargestellt.

4.3.10 Phänotyp von Kombinationsmutanten in PAS_P und PAS_C

Die Sensor-Histidinkinase DcuS erkennt durch die periplasmatische Sensordomäne (PAS_P) externe Substrate wie Fumarat oder Malat (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Kneuper *et al.*, 2005). Die Aminosäurereste der Substratbindestelle, die bei der Erkennung der externen Substrate eine entscheidende Rolle spielen, wurden identifiziert (Kneuper *et al.*, 2005, Krämer *et al.*, 2007, Cheung & Hendrickson, 2008). Die Struktur von PAS_P wurde mittels NMR-Spektroskopie und Kristallographie aufgeklärt (Pappalardo *et al.*, 2003; Cheung & Hendrickson, 2008). Mutationen in der Substratbindestelle führen zur vollständigen Inaktivierung von DcuS (Janausch *et al.*, 2002a, Kneuper *et al.*, 2005; Krämer *et al.*, 2007). Es wurde überprüft, wie sich eine Kombination einer OFF-Mutation in der PAS_P-Domäne mit Mutationen in PAS_C auf die Funktion von DcuS auswirkt.

Die Abbildung 18 zeigt den Funktionszustand der PAS_P-PAS_C-Kombinationsvarianten von DcuS. Für die Untersuchung wurde die OFF-Mutation der periplasmatischen Sensordomäne H110A ausgewählt. Diese wurde mit verschiedenen PAS_C-Mutationen, zwei ON-Mutationen N248D und N304D, drei stillen Mutationen (L220A, D240A, I318A) und zwei OFF-Mutationen V276A und L300A kombiniert.

Die OFF-Variante DcuS-H110A ist nicht mehr in der Lage, die Expression von *dcuB* in An- und Abwesenheit von Fumarat zu induzieren. Die stillen-Varianten von PAS_C (DcuS-L220A, -

D240A, -I318A) hatten eine wildtypische *dcuB*-Expression in An- und Abwesenheit des Effektors. Die drei PAS_P - PAS_C -Kombinationsvarianten DcuS-H110A-L220A, DcuS-H110A-D240A und DcuS-H110A-I318A waren mit und ohne Fumarat völlig inaktiv, vergleichbar mit der OFF-Variante DcuS-H110A. Die OFF-Varianten der PAS_C -Domäne DcuS-V276A und DcuS-L300A blieben bei Kombination mit der OFF-Mutation H110A mit und ohne Fumarat weiterhin inaktiv. Die Kombination von H110A mit den beiden ON-Mutationen der PAS_C -Domäne N248D und N304D zeigten in beiden Fällen eine klare Aktivität in Abwesenheit von Fumarat und eine leichte Stimulierbarkeit der *dcuB*-Expression durch Fumarat. Eine Expression von *dcuB* konnte somit wieder hergestellt werden, wenngleich die Aktivität im Vergleich zu den ON-Einzelvarianten deutlich reduziert ist. Diese PAS_P - PAS_C -Kombinationsmutanten zeigten einen Fumarat-Induktionsfaktor der ON-Klasse 1b.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die OFF-Mutation H110A die inaktivierende Auswirkung auf DcuS bei Kombination mit den stillen- und OFF-Mutationen der PAS_C -Domäne beibehält. Bei Kombinationen der OFF-Mutation H110A mit den beiden ON-Mutationen N248D und N304D waren die ON-Mutationen dominant, aber die Aktivität war schwächer als in den einzelnen ON-Varianten.

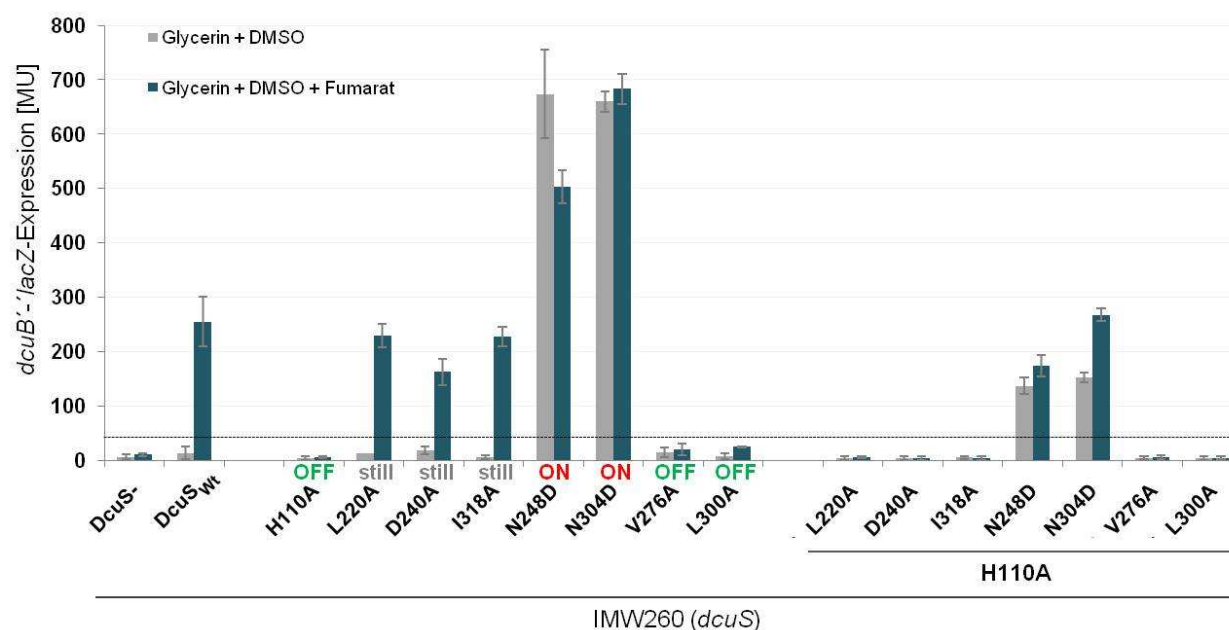


Abb. E18: Nachweis des Funktionszustandes von DcuS-Kombinationsvarianten der PAS_P - und PAS_C -Domäne durch Expression von *dcuB* [MU]. Die Messungen erfolgte im *dcuS*-Deletionsstamm IMW260 und mit komplementierten PAS_C -, PAS_P -Varianten und PAS_C - PAS_P -Kombinationsvarianten. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin, DMSO und mit 20 mM Fumarat als Effektor. Die Balken geben die Standardabweichung an. In Grün ist die OFF-Variante von PAS_P hervorgehoben. In Rot sind die ON-Varianten, in Grau sind die stillen-Varianten und in Grün die OFF-Varianten von PAS_C dargestellt.

4.4 Einfluss einer *dcuB*-Deletion und von *DcuB*-Varianten auf PAS_C -Varianten

DcuB ist der C_4 -Dicarboxylattransporter der Fumaratatmung und wird in Abwesenheit von Sauerstoff exprimiert (Six *et al.*; 1994, Zientz *et al.*, 1996; Golby *et al.*, 1998). *DcuB* ist ein bifunktionales Protein, welches neben der Transportfunktion zusätzlich als Co-Sensor von *DcuS* fungiert (Kleefeld *et al.*, 2009). Es dient der Aufnahme von C_4 -Dicarboxylaten sowie der Ausscheidung des Endproduktes Succinats der Fumaratatmung. Zusätzlich fungiert der Antiporter als weitere Signaleingangsstelle des *DcuSR*-Systems und beeinflusst die Regulation der *DcuSR*-abhängigen Genexpression (Kleefeld *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass *DcuB* in Abwesenheit von Substrat mit *DcuS* interagiert und dessen inaktive Form stabilisiert und somit die Aktivität hemmt. In Anwesenheit eines Substrats bindet *DcuB* dieses und steht dadurch nicht mehr zur Interaktion mit *DcuS* zur Verfügung. Dies führt zur vollständigen Aktivierung des Sensors (Bauer *et al.*, 2010).

Untersucht werden sollte der regulatorische Effekt von *DcuB* auf die ON-Varianten *DcuS*-N248D, *DcuS*-N304D und die OFF-Variante *DcuS*-V276A der PAS_C -Domäne. Die Induktion der *DcuSR*-abhängigen Gene wurde mittels *dcuB*-Reporterfusion untersucht. Dazu wurde der Doppelinsertionsstamm IMW536 (*dcuS dcuB*) verwendet. Bei diesem Stamm ist das *dcuS* Gen durch eine Spectinomycinresistenz und das *dcuB* Gen durch eine Chloramphenicolresistenz inaktiviert worden (Kleefeld *et al.*, 2009). Der Stamm wurde mit Varianten des Plasmids pMW181 (*DcuS_{wt}*) transformiert, die für ON- bzw. OFF-Varianten von PAS_C kodieren.

Der Stamm IMW536 zeigte nach Kombination mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181_t) schon in Abwesenheit von Fumarat eine maximale Expression von *dcuB* (Tab. E2) und somit eine fumaratunabhängige Aktivierung der Zielgene (Kleefeld *et al.*, 2009). Die Expression konnte in Anwesenheit von Fumarat nicht weiter stimuliert werden und zeigte sogar eine geringere Aktivität. Dieses Phänomen wird der *DcuB*-Effekt genannt. Der *DcuB*-Effekt fehlt, wenn zusätzlich *DcuS* inaktiv ist. Der Stamm IMW536 mit komplementiertem *dcuS* (pMW181) und *dcuB* (pMW228) zeigte wieder eine fumaratabhängige Expression von *dcuB*, vergleichbar mit dem Expressionsmuster des Wildtyp-Stamms IMW237 (Tab. E2).

Die beiden ON-Varianten *DcuS*-N248D (pMW421) und *DcuS*-N304D (pMW488) wiesen ein vergleichbares Expressionsmuster wie *DcuS_{wt}* (pMW181) auf. Die Expression war bereits ohne den Effektor Fumarat maximal. In Anwesenheit von Fumarat wurde eine geringere Stimulierung der *dcuB*-Expression beobachtet. Die OFF-Variante *DcuS*-V276A zeigte hingegen keine Expressionsaktivität, unabhängig vom Effektor, vergleichbar mit der Expression des Doppelinsertionsstamms.

Die regulatorischen DcuB-Varianten DcuB-D398N und DcuB-K353A weisen einen dem Wildtyp-DcuS ähnlichen DcuB-Effekt auf. Die ON-Variante DcuS-N248D zeigt in Kombination mit den zwei DcuB-Varianten eine um Faktor 1,8 bis 3 verstärkte Expressionsaktivität auf. Dabei bleibt das Expressionsmuster der jeweiligen DcuB-Einzelvariante im Vergleich zu den DcuS-DcuB-Doppelvarianten erhalten.

Tab. E2: Rolle von PAS_c-Varianten für die Fumarat-unabhängige Induktion von *dcuB* mit regulatorischen und transportdefizienten DcuB-Varianten im *dcuS dcuB* Deletionsstamm IMW536. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit oder ohne Fumarat (20mM) als Effektor.

IMW536 (<i>dcuS dcuB</i>)		<i>dcuB</i> -Expression [MU]	
Plasmid	Protein	ohne Effektor	+ Fumarat
nur Reportergen	-	9 ±2	11 ±1
pMW181	DcuS	100 ±10	52 ±12
pMW228	DcuB	2 ±1	3 ±1
pMW181 pMW228	DcuS, DcuB	5 ±2	36 ±8
pMW421	DcuS-N248D	281 ±29	91 ±10
pMW488	DcuS-N304D	210 ±13	92 ±10
pMW667	DcuS-V276A	10 ±6	8 ±3
pMW181 pMW405	DcuS, DcuB- D398N	89 ±27	41 ±9
pMW421 pMW405	DcuS-N248D, DcuB-D398N	148 ±14	109 ±6
pMW488 pMW405	DcuS-N304D, DcuB-D398N	47 ±2	65 ±8
pMW667 pMW405	DcuS-V276A, DcuB-D398N	5 ±1	6 ±1
pMW181 pMW508	DcuS, DcuB- K353A	61 ±6	50 ±3
pMW421 pMW508	DcuS-N248D, DcuB-K353A	189 ±9	110 ±9
pMW488 pMW508	DcuS-N304D, DcuB-K353A	69 ±11	60 ±1
pMW667 pMW508	DcuS-V276A, DcuB-K353A	13 ±2	8 ±1
pMW181 pMW397	DcuS, DcuB- T394I	29 ±2	43 ±3
pMW421 pMW397	DcuS-N248D, DcuB-T394I	54 ±7	111 ±10
pMW488 pMW397	DcuS-N304D, DcuB-T394I	34 ±1	49 ±3
pMW667 pMW397	DcuS-V276A, DcuB-T394I	6 ±2	4 ±1

Die ON-Variante DcuS-N304D zeigt in Kombination mit DcuB-K353A eine vergleichbare Expressionsaktivität wie die DcuB-Einzelvarianten. Bei DcuS-N304D in Kombination mit DcuB-D398N war die *dcuB*-Expression ohne Fumarat fast um das 2-fache geringer. Ist mit Fumarat war eine 1,5-fach erhöhte Expressionsaktivität im Vergleich zu DcuB-D398N messbar war. DcuB-T394I zeigt eine fumaratabhängige Aktivierung und eine erhöhte Expression ohne Fumarat. Diese Werte von DcuB-T394I sind nicht konform mit Kleefeld *et al.* (2009). Dort wird gezeigt, dass auch DcuB-T394I den DcuB-Effekt aufweist. Plasmid pMW397, das für DcuB-T394I kodiert, sollte deshalb überprüft werden. Alle drei DcuS-DcuB-Doppelvarianten mit der OFF-Variante DcuS-V276A zeigen durchgehend keine Expressionsaktivität, unabhängig vom Effektor, wie die DcuS-V276A Einzelvariante und der *dcuS dcuB* Insertionsstamm.

Man kann sagen, dass für eine DcuSR-vermittelte Expression eine aktive DcuS Sensorkinase benötigt wird. Sobald DcuS inaktiv vorliegt, erfolgt keine Signalweiterleitung zur Kinase und keine Stimulierung der Zielgene, wie man es bei der OFF-Variante DcuS-V276A sehen kann. Die *dcuB*-Deletion führte im wildtypischen DcuS-Hintergrund zu dem bekannten DcuB-Effekt mit einer fumaratunabhängigen *dcuB*-Expression. Die DcuS-Varianten verhalten sich deshalb gegenüber DcuB ähnlich wie DcuS_{Wt}. Die OFF-Variante ist auch im *dcuB*-negativen Hintergrund im OFF-Zustand.

4.5 Protein-Protein Interaktion

Protein-Protein Interaktionen spielen in biologischen Systemen, zum Beispiel bei der Signaltransduktion von Proteinen, eine große Rolle. Eine Protein-Protein Interaktion bezeichnet eine stabile oder fragile Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren Proteinen. Interaktionen beruhen oft auf Wasserstoffbrückenbindungen, nicht-kovalenter Wechselwirkungen oder elektrostatischen Wechselwirkungen von Aminosäure-Resten zwischen den interagierenden Proteinen. Mittels Interaktionsstudien können Funktionen und Interaktionspartner von Proteinen analysiert werden. Um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen, gibt es eine große Auswahl an *in vivo* oder *in vitro* Untersuchungsmöglichkeiten, z.B. NMR, Crosslinking, Co-Immunopräzipitation und Two-Hybrid-Systeme mit Fusionsproteinen. Mit der Hilfe des Bacterial Two-Hybrid-System und *in vivo* Crosslinking mit DSS (Disuccinimidyl suberat) wurde die Interaktionen und Oligomerisierung von DcuS und von DcuS-Varianten untersucht.

4.5.1 Interaktionsstudien mit dem Bacterial Two-Hybrid-System

Homo-Dimerisierung von DcuS: Bedeutung von PAS_c

Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen kann mittels des Bacterial Two-Hybrid-System (BACTH) untersucht werden. Das System basiert auf einer interaktionsvermittelten Rekonstitution der Adenylatcyclase-Aktivität im *cya*-negativen *E. coli* Stamm BTH101. Hierzu wird die Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* verwendet, die aus den Fragmenten T18 und T25 besteht. Die Fragmente wurden genetisch voneinander getrennt und haben so ihre katalytische Aktivität verloren. Fusioniert man T25 und T18 an zwei interagierende Proteine, werden die Fragmente über die Heterodimerisierung der entstehenden Fusionsproteine wieder zusammengeführt und gewinnen bei geeigneter räumlicher Anordnung die Aktivität zurück. Die wiederhergestellte Adenylatcyclase-Aktivität resultiert in der Synthese von cAMP. Zyklisches AMP bindet im nächsten Schritt an das „catabolite activator protein“, CAP. Der cAMP/CAP-Komplex aktiviert in *E. coli* als Transkriptionsfaktor die Expression des *lac* Reportergens. Die Expression der β -Galaktosidase kann somit als Maß für die Interaktion zweier Proteine benutzt werden. Als Positivkontrolle für Protein-Protein Interaktion dienen Fusionen der Adenylatcyclase-Fragmente T25 und T18 mit Leucinzipper-Proteinen, deren Dimerisierung *in vivo* untersucht ist (Karimova *et al.*, 1998). Die Homodimerisierung von DcuS kann durch das BACTH-System nachgewiesen werden. (Scheu *et al.*, 2011). Zur Untersuchung der Homodimerisierung von DcuS und der beteiligten Domänen wurden qualitative und quantitative Interaktionsstudien mit unterschiedlichen DcuS-Varianten durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob DcuS-Varianten eine Auswirkung auf die Interaktion zwischen den DcuS-Proteinen zeigt. Dafür wurde der *cya*-negative *E. coli* Stamm BTH101 mit den zwei BACTH-Vektoren cotransformiert, die für die T18- und T25-DcuS Fusionsvarianten kodieren. Auf X-Gal-Platten wurden die qualitativen Untersuchungen der Kolonien mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) vorgenommen. Für die quantitativen Untersuchungen erfolgte die aerobe Zucht in LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin. Induziert wurden die T25- und T18-Fusionsproteine mit 0,5 mM IPTG. Mittels β -Galaktosidase-Tests wurde die hohe β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt, welche als Maß für die Stärke der Interaktion der Fusionsproteine angesehen werden kann.

Untersucht werden sollte die Interaktion von DcuS in verschiedenen Kombinationen des Proteins aus Vollängen-DcuS und von verkürzten DcuS-Konstrukten. Dabei sollte der Einfluss von DcuS-Varianten auf die Interaktion von DcuS und DcuS-Konstrukten analysiert werden. Die Abbildung E19 zeigt die Interaktion der Positiv- und Negativ-Kontrolle. Die Interaktion der ZiP-Fusionsproteine, die jeweils eine Leucinzipper-Domäne mit C-terminal

fusionierten T18- und T25-Fragmenten enthalten, führte zu einer Blaufärbung der *E. coli*-Kolonie und die quantitative Auswertung zeigte eine β -Galaktosidase-Aktivität von 1361 MU.

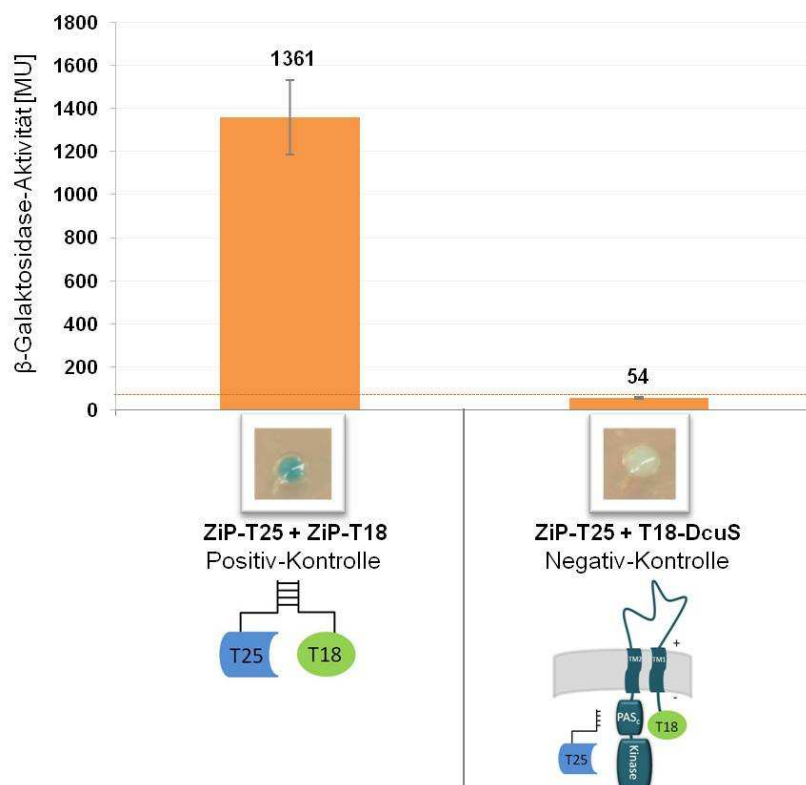


Abb. E19: Interaktion der positiv- und negativ-Kontrolle mit N- und C-terminalen fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Der *cya*-negative Stamm BTH101 wurde mit den jeweiligen Konstrukten cotransformiert. Die Zucht erfolgte bei 30°C, aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Die Abbildung zeigt die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die orange gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Interaktion zwischen den fusionierten T18- und T25-Fragmenten dar.

Die Negativ-Kontrolle setzt sich aus den Fusionsproteinen einer Leucinzipper-Domäne mit C-terminalem T25-Fragment und Vollängen-DcuS mit N-terminal fusioniertem T18-Fragment zusammen. Wie zu erwarten war, konnte keine Interaktion der Fusionsproteine festgestellt werden. Dies führte zu einer geringen β -Galaktosidase-Aktivität von 54 MU und einer weißen Kolonie (Abb. E18). Somit wurde ein Schwellenwert von 60 MU für die Interaktion der Fusionsproteine festgelegt.

Die Abbildung E20 zeigt die Interaktion homologer Konstrukte aus verschiedenen Domänen von DcuS und DcuR mit N- und C-terminalen fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Als positive Interaktionskontrolle wurde das Leucinzipper-Fusionsprotein verwendet. Vollängen-DcuS mit N-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten zeigte eine starke Interaktion der Proteine, vergleichbar mit dem Leucinzipper-Fusionsprotein. Ebenso wurden

Interaktionsstudien mit verkürzten Varianten von DcuS durchgeführt. In dem Konstrukt DcuS-PAS_C fehlt die Kinase-Domäne, in DcuS-TM2 die PAS_C- und die Kinase-Domäne. An jedes dieser verkürzten Konstrukte wurden C-terminal T25- und T18-Fragmenten fusioniert.

Beide homologen Konstrukte zeigten im homodimeren Zustand eine β -Galaktosidase-Aktivität, die 23% bis 25% der Interaktion von Vollängen-DcuS entsprach. Die isolierte PAS_C-Kinase bildete offensichtlich sehr effektiv Homodimere (1640 MU), während die isolierten PAS_C- und Kinase-Domänen alleine keine Interaktion zeigten. Dem Responseregulator DcuR, der als Transkriptionsfaktor im DcuSR-System fungiert, zeigte als Homodimer hohe β -Galaktosidase-Werte, und damit starke Dimerisierung, die 57% der Interaktion von Vollängen-DcuS entsprach.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die homologen Konstrukte von Vollängen-DcuS und DcuR eine starke Interaktion zeigten. Die verkürzten homologen Konstrukte DcuS-TM2 und DcuS-PAS_C zeigten eine schwächere, aber signifikante Interaktion als Vollängen-DcuS. Die cytoplasmatischen Domäne PAS_C und die Kinase-Domäne zeigten alleine keine Interaktion mehr.

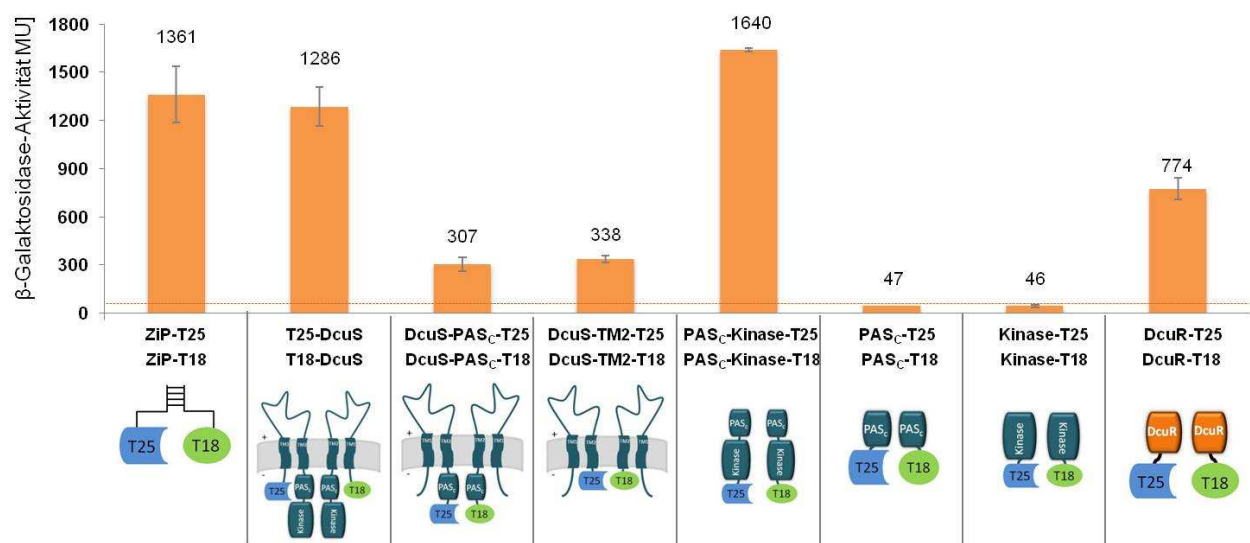
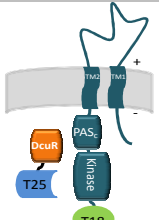

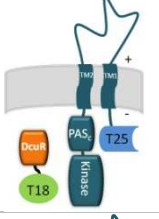

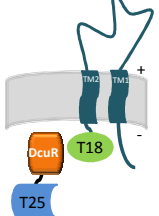



Abb. E20: Interaktion homologer Konstrukte aus verschiedenen Domänen von DcuS und DcuR mit N- und C-terminalen fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Der *cya* negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit den jeweiligen homologen Konstrukten cotransformiert. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Die orange gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Interaktion zwischen den fusionierten T18- und T25-Fragmenten dar.

Des Weiteren wurde die Interaktion verschiedenen heterologer Konstrukte aus verschiedenen Domänen von DcuS und DcuR untersucht. Die Tabelle E3 zeigt ein Schema des Proteinkonstrukts, die T25- und T18-Fragmente, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität. Es wurden zwei Kombinationen von Vollängen-DcuS und DcuR, mit C- und N-terminalen T25- oder T18-Fragmenten und einer negativ-Kontrolle mit dem verkürzten Konstrukt DcuS-TM2 untersucht. Eine deutliche Interaktion konnte für die Kombination DcuS + DcuR beobachtet werden. Die C- und N-terminalen Fusionen zeigten eine deutliche Blaufärbung, was für eine starke Interaktion spricht. Die Kombination DcuR-T25 + DcuS-T18 zeigte eine β -Galaktosidase-Aktivität von 83% im Vergleich zu homologen Vollängen-DcuS. Das ist eine deutliche höhere Interaktion als für T25-DcuS + DcuR-T18, die bei 45% der Interaktion liegt. Wie erwartet, wurde keine Interaktion der Fusionsproteine DcuR-T25 mit dem verkürzten Konstrukt DcuS-TM2 erzielt. Somit zeigten die Kolonien keine Blaufärbung.

Tab. E3: Interaktion verschiedener heterologer Konstrukte aus verschiedenen Domänen von DcuS und DcuR. Die Tabelle zeigt ein Schema der Proteinkonstrukte, die Fragmente, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin.

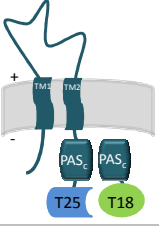

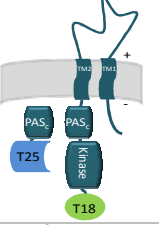

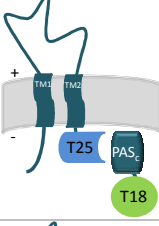

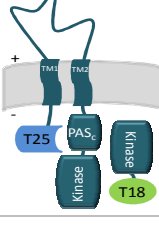

Schema Proteinkonstrukt	T25-Fragment T18-Fragment	Färbung der Kolonie	β -Gal [MU]
	DcuR-T25 DcuS-T18		1067 \pm 87
	T25-DcuS DcuR-T18		585 \pm 72
	DcuR-T25 DcuS-TM2-T18		58 \pm 4

Überprüft wurde weiterhin die Interaktion verschiedener heterologer Konstrukte aus verschiedenen Domänen und verkürzten Varianten von DcuS. Die Tabelle E4 zeigte eine Darstellung der Proteinkonstrukte, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -

Galaktosidase-Aktivität der jeweiligen heterologen Kombinationen. Vollängen-DcuS und das verkürzte DcuS-PAS_C zeigten keine Interaktion mit der isolierter PAS_C-Domäne. Die Fusionsproteine des verkürzten Konstrukts DcuS-TM2 und der isolierten PAS_C-Domäne zeigten, wie erwartet, ebenso keine Interaktion. Vollängen-DcuS zeigte weder bei C- noch bei N-terminaler Markierung deutliche Interaktion mit einzelnen cytoplasmatischen Domänen (PAS_C, Kinase). Lediglich eine schwache Interaktion konnte mit der isolierten PAS_C-Kinase Domäne beobachtet werden. Die schwache Interaktion konnte durch die leicht blaue Kolonienfarbe bestätigt werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass eine zusammenhängende PAS_C-Kinase-Domäne erforderlich ist für eine Interaktion in DcuS. Eine deutliche Interaktion ist feststellbar, wenn die PAS_C-Kinase an der Membran verankert ist.

Tab. E4: Interaktion verschiedenen heterologer Konstrukte aus verschiedenen Domänen von DcuS. Die Tabelle zeigt ein Schema der Proteinkonstrukte, die Fragmente, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Mutationen sind in rot markiert.

Schema Proteinkonstrukt	T25-Fragment T18-Fragment	Färbung der Kolonie	β -Gal [MU]
	DcuS-PAS _C -T25 PAS _C -T18		43 \pm 2
	PAS _C -T25 DcuS-T18		53 \pm 2
	DcuS-TM2-T25 PAS _C -T18		57 \pm 5
	T25-DcuS Kinase-T18		59 \pm 4

	DcuS-PAS _C -N248D-T25 T18-DcuS		55 ±2
	T25-DcuS PAS _C Kinase-T18		101 ±28

Darüber hinaus sollte geklärt werden, welchen Einfluss ON- und OFF-Mutationen der PAS_C-Domäne auf die Interaktion isolierter PAS_C-Domäne haben (Abb. E21). Die isolierten wildtypischen PAS_C-Domänen zeigten keine Interaktion, im Vergleich zum Leucizipper-Fusionsprotein. Auch die ON-Mutationen N248D und N304D und die OFF-Mutationen F221A und V276A führten zu keiner Interaktion der T25- und T18-Fusionsproteine.

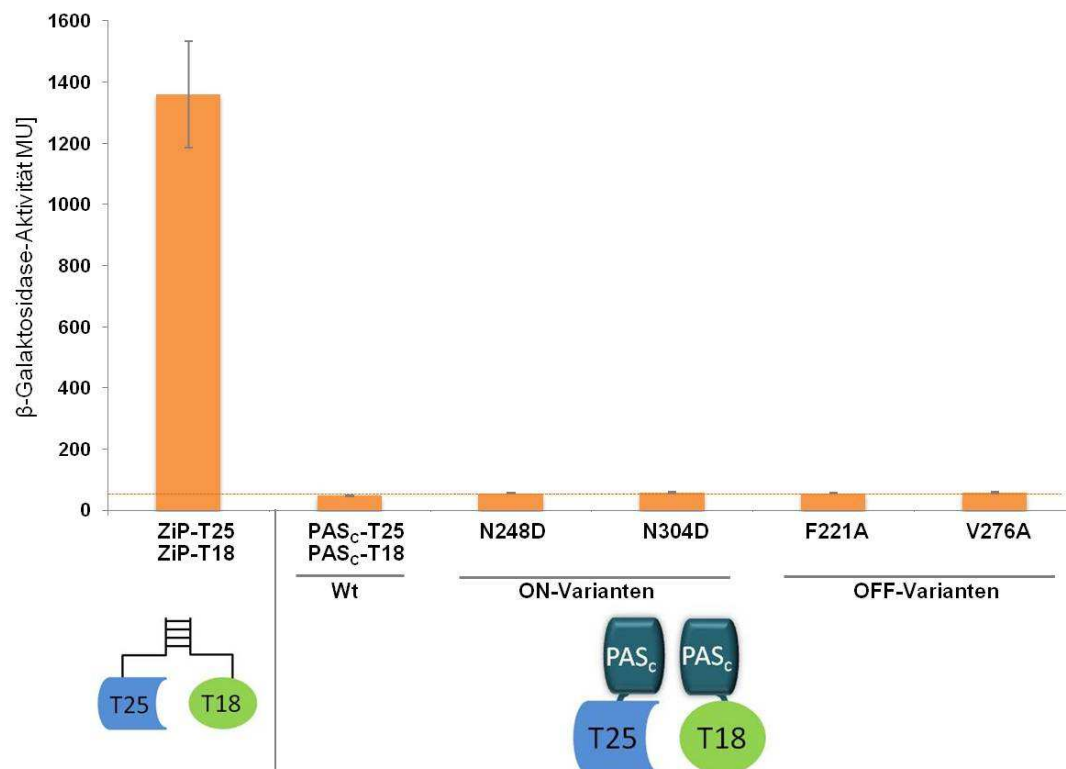


Abb. E21: Interaktion homologer Konstrukte der isolierten PAS_C-Domäne von DcuS mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Der *cya* negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit den jeweiligen PAS_C-Varianten cotransformiert. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin. Die orange gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Interaktion zwischen den fusionierten T18- und T25-Fragmenten dar.

Der Einfluss von OFF-Mutationen der PAS_p-Domäne auf die Interaktion homologer Konstrukte wurde in DcuS untersucht, das bis Transmembranhelix 2 (DcuS-TM2) verkürzt war (Abb. E22). Wildtypische Fusionsproteine der verkürzten DcuS-Variante DcuS-TM2 zeigten eine signifikante Interaktion. Alle Fusionsproteine der drei OFF-Varianten von DcuS-TM2 (-R107A, -H110A, -F120A) zeigten eine leicht verstärkte Interaktion. Die OFF-Mutationen R107A, H110A und F120A der PAS_p-Domäne haben deshalb möglicherweise eine leicht verstärkte Interaktion der homologen verkürzten DcuS-TM2-Konstrukte zu Folge.

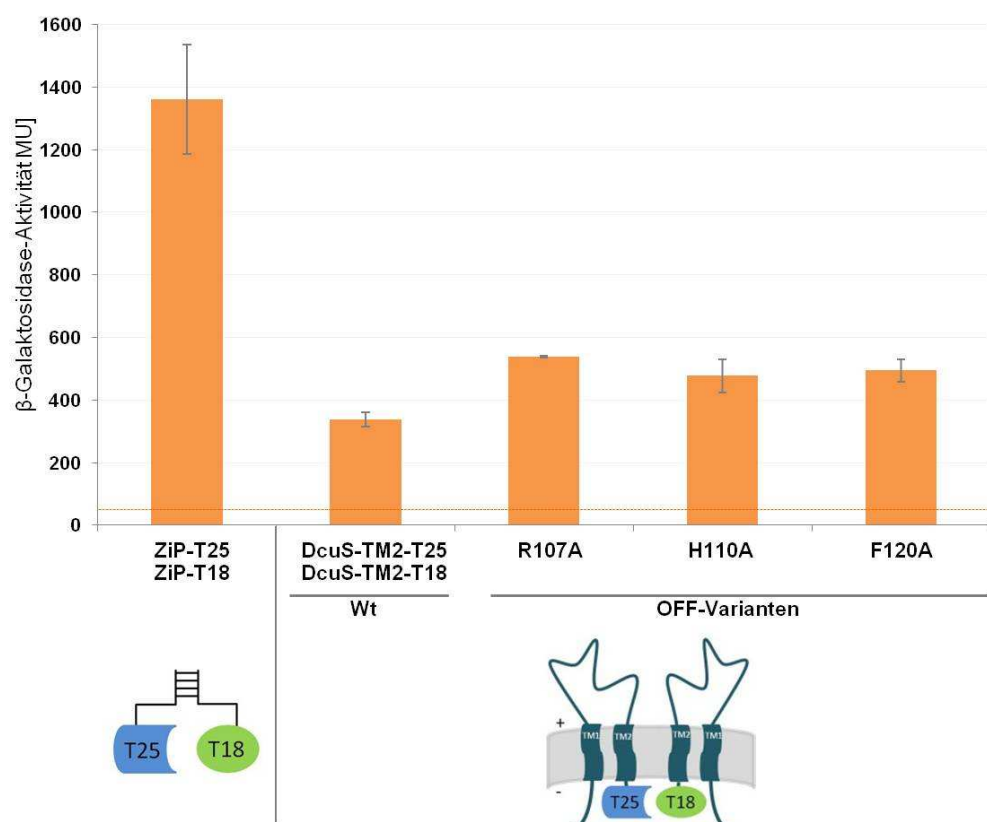


Abb. E22: Interaktion homologer Konstrukte von verkürztem DcuS bis Transmembranhelix 2 mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Der *cya* negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit den jeweiligen Varianten cotransformiert. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin. Die orange gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Interaktion zwischen den fusionierten T18- und T25-Fragmenten dar.

4.5.2 Einfluss von Effektoren auf die Interaktion von Vollängen- und verkürztem DcuS

Es sollte überprüft werden welchen Effekt ON- und OFF-Mutationen auf die Interaktion homologer Konstrukte von Vollängen-DcuS ausüben. Zusätzlich sollte der Effekt von Fumarat und Malat auf die Interaktion untersucht werden.

In Abbildung E23 ist der Einfluss der Effektoren Fumarat und Malat auf die Interaktion dargestellt. Ohne Effektoren zeigte wildtypischen Vollängen-DcuS eine starke Interaktion,

die durch Fumarat und Malat nur leicht reduziert wurde. Die stillen Varianten DcuS-L220A und DcuS-L240A zeigten eine etwas niedrigere β -Galaktosidase-Aktivität von 76% im Vergleich zu Volllängen-DcuS. Hier schien Malat eine deutliche Reduktion der Aktivität, bis Faktor 1,3 zu verursachen. Die OFF-Varianten DcuS-F221A, DcuS-V276A und DcuS-L300A zeigten, im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Interaktion. Die Anwesenheit von Malat im Medium reduzierte die Interaktion der Fusionsproteine weiter deutlich, bis zu Faktor 3. Die ON-Varianten DcuS-L228A, DcuS-N304D und DcuS-R322A zeigten eine geringere Interaktion von 44% im Vergleich zum Wildtyp. Die Anwesenheit der Effektoren hatte eine Reduzierung der Interaktion zur Folge. Mit Malat wurde eine weitere Verringerung der Interaktion um den Faktor 1,7 bis 2,6 erzielt. Die ON-Variante DcuS-N248D zeigte im Gegensatz zu den anderen Volllängen-DcuS-Varianten keine Interaktion in An- und Abwesenheit von Effektoren. Die β -Galaktosidase-Aktivität der ON-Varianten DcuS-N248D lag bei 4% im Vergleich zu wildtypischem Volllängen-DcuS und somit unterhalb des Schwellenwertes.

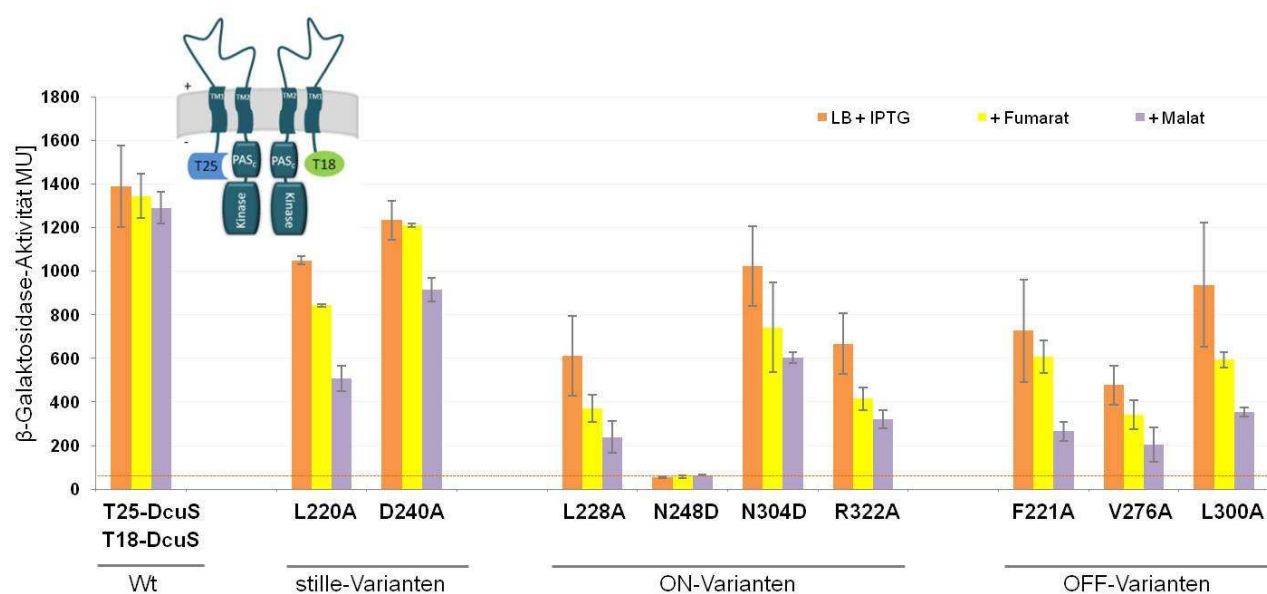


Abb. E23: Interaktion homologer Konstrukte von Volllängen-DcuS mit N-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Der *cya* negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit den jeweiligen Volllängen-DcuS-Varianten cotransformiert. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Dargestellt ist das komplette Wildtyp-DcuS und die stillen-, ON-, und OFF-Varianten der PAS_C-Domäne. Die orange gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Interaktion zwischen den fusionierten T18- und T25-Fragmenten dar. Oberhalb des Schwellenwertes von 60 MU kann man von einer Interaktion der Fusionsproteine ausgehen.

Man kann festhalten, dass im wildtypischen Volllängen-DcuS mit dem BACTH-System eine starke Interaktion zwischen den Monomeren des Dimers zu finden ist. Anwesenheit der Effektoren führte in den ON-, OFF- und den stillen Varianten, nicht aber im Wildtyp, zu einer deutlichen Abnahme der Interaktion. Malat reduzierte die Interaktion der Fusionsproteine

stärker als Fumarat. Die PAS_C-Mutation N248D hat eine starke Auswirkung auf die Interaktion und führte in An- und Abwesenheit der Effektoren zu einem vollständigen Verlust.

In Abbildung E24 ist der Einfluss verschiedener PAS_C-Mutationen und der Effektoren Fumarat und Malat auf die Interaktion von Homodimeren von verkürztem DcuS, ohne Kinase-Domäne gezeigt. Bis auf das Fehlen der Kinase, entsprechen die Experimente denen von Abbildung E23. Verkürztes DcuS mit wildtypischem DcuS-PAS_C zeigte die stärkste Interaktion in Abwesenheit von Effektoren im Medium. Beide Effektoren führten zu einer starken Abnahme der Interaktion (Faktor 4,7). Somit reduzierten beide Effektoren die Interaktion der Fusionsproteine gleichermaßen stark. Die stillen Varianten DcuS-L220A und DcuS-D240A zeigten eine niedrigere β -Galaktosidase-Aktivität von bis zu 51% im Vergleich zu wildtypischem DcuS-PAS_C. Mit Effektoren wurde eine schwache Reduzierung der Interaktion (Faktor 1,6) beobachtet.

Die OFF-Varianten von DcuS-PAS_C DcuS-V276A und DcuS-L300A zeigten in Abwesenheit der Effektoren eine β -Galaktosidase-Aktivität von bis zu 74% und DcuS-F221A von 36% im Vergleich zu wildtypischen DcuS-PAS_C. Die Anwesenheit von Fumarat führe bei DcuS-F221A zu keiner signifikanten Abschwächung der Interaktion. Mit Fumarat und Malat zeigte die OFF-Variante DcuS-V276A eine stärkere Reduktion der Interaktion (Faktor 3,1), während in die OFF-Variante DcuS-L300A Fumarat und Malat nur eine geringere Reduktion der Interaktion bewirkte.

Die ON-Varianten von DcuS-PAS_C DcuS-L228A und DcuS-R322A hatten eine vergleichbare Interaktion wie der Wildtyp zur Folge. Hier schien die Anwesenheit von Malat eine stärkere Reduktion der Aktivität als Fumarat zu bewirken. Die ON-Varianten DcuS-N248D und DcuS-N304D zeigten im Gegensatz zu den beiden anderen ON-Varianten mit und ohne Effektor keine Interaktion, und die β -Galaktosidase-Aktivität lag somit an der Grenze des Schwellenwertes.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Anwesenheit der Effektoren auf die wildtypischen DcuS-PAS_C-Fusionsproteine eine starke Verringerung der Interaktion zur Folge. In Anwesenheit von Effektoren wurde die Interaktion der mutierten Fusionsproteine nicht so stark reduziert wie im Wildtyp. Die PAS_C-Mutationen N248D und N304D hatten eine Unterbrechung der Interaktion der DcuS-PAS_C-Fusionsproteine zu Folge. Somit konnte in An- und Abwesenheit von Effektoren nur eine sehr schwache β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

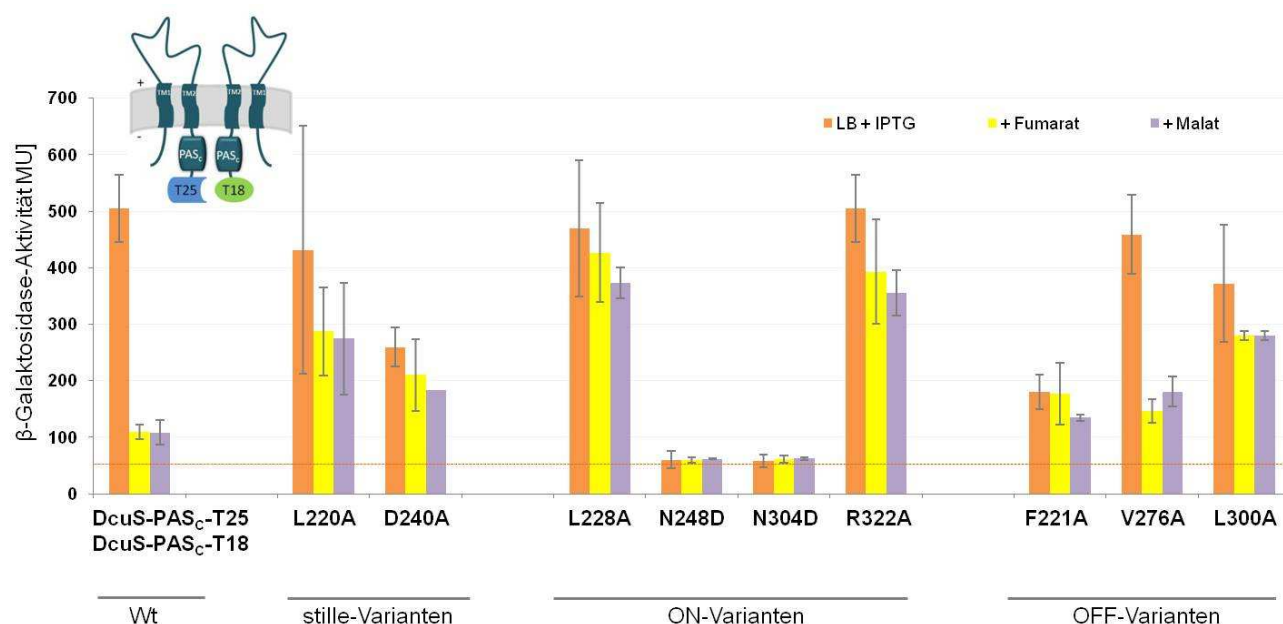


Abb. E24: Interaktion homologer Konstrukte von verkürztem DcuS bis zur PAS_C-Domäne mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Der *cya* negative *E. coli* Stamm BTH101 wurde mit den jeweiligen DcuS-PAS_C-Varianten cotransformiert. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin. Dargestellt ist das um die Kinase-Domäne verkürztes Wildtyp-DcuS und die stillen-, ON-, und OFF-Varianten der PAS_C-Domäne. Die orange gestrichelte Linie stellt den Schwellenwert für die Interaktion zwischen den fusionierten T18- und T25-Fragmenten dar. Oberhalb des Schwellenwertes von 60 MU kann man von einer Interaktion der Fusionsproteine ausgehen.

4.6. *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie

4.6.1 Lokalisation von DcuS und DcuS -Varianten in *E. coli*

Die Lokalisation von DcuS und verschiedener DcuS-Varianten wurde durch *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie in der Membran von *E. coli* untersucht. Dazu wurden Fusionen von DcuS mit dem „yellow fluorescent protein“ (YFP) verwendet. YFP ist ein Derivat des „green fluorescent protein“ (GFP), welches Licht der Wellenlänge 513 nm maximal absorbiert und ein Emissionsmaximum von 527 nm besitzt (Örmo *et al.*, 1996). Die Lokalisation der Fusionsproteine von YFP kann deshalb mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Das Plasmid pMW407 kodiert für eine *dcuS-yfp* Fusion (Abb. E25).

Durch gerichtete Mutagenese wurden auf dem Plasmid pMW407 DcuS-Varianten von *dcuS-yfp* erstellt. Die Plasmide wurden in *E. coli* JM109 transformiert. Nach Zucht und Induktion mit 133 µM L-Arabinose wurden Zellen aus der exponentiellen Phase auf PBS-Agarose-beschichtetem Objektträgern immobilisiert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Für die Expression wurde Vektor pBAD30 verwendet, um ein moderates Expressionslevel einzuhalten. DcuS-YFP besitzt Wildtyp-ähnliche Funktion von DcuS und wird in die Membran

von *E. coli* eingebaut. Dabei kommt es hauptsächlich zu einer Lokalisation von DcuS-YFP an den Zellpolen (Scheu *et al.*, 2008).

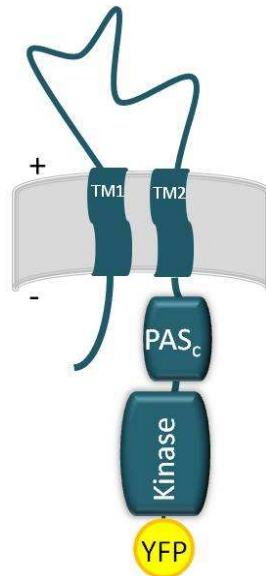


Abb. E25: Schematische Darstellung von DcuS-YFP.

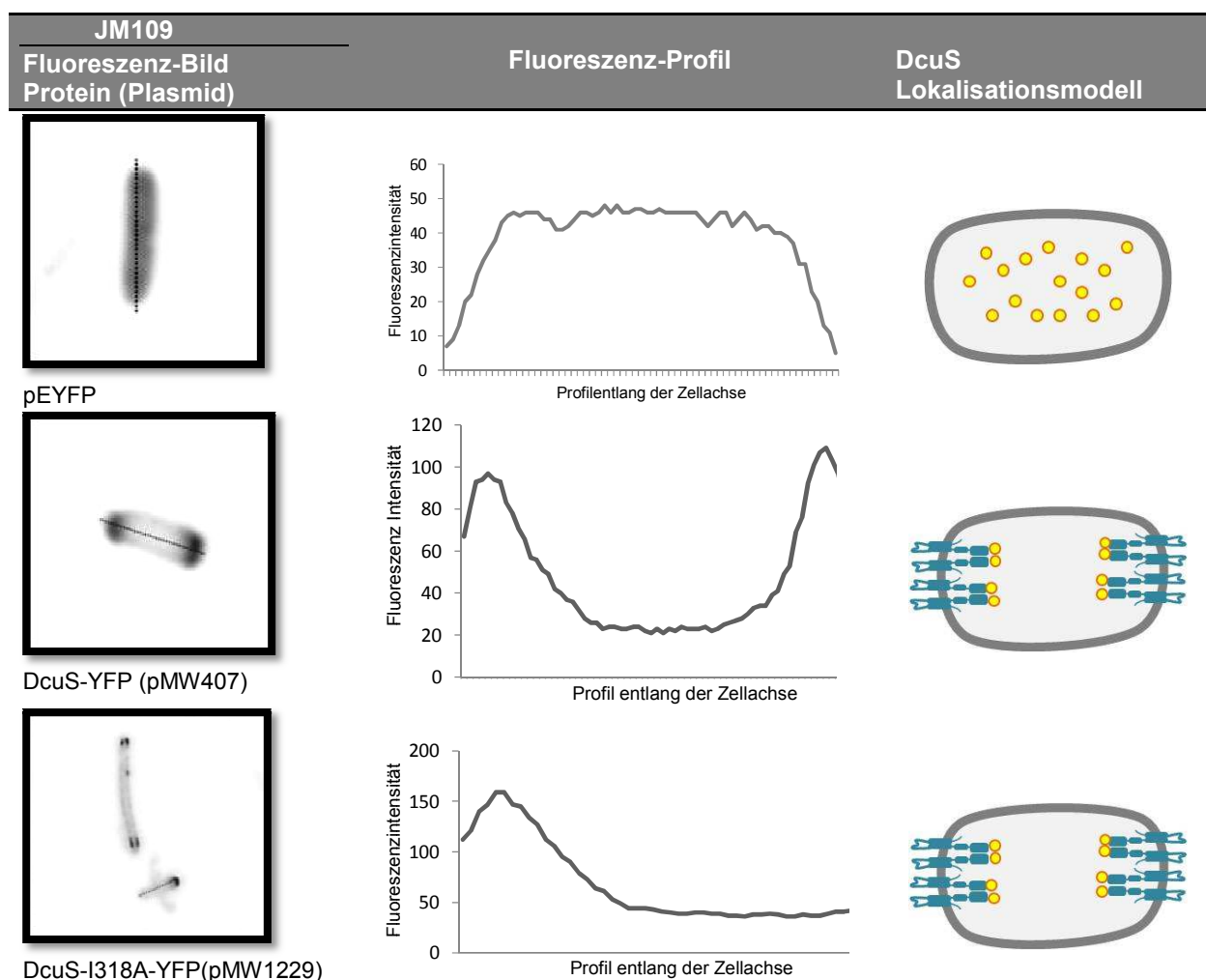
Dargestellt ist DcuS als Monomer mit C-terminal fusioniertem YFP.

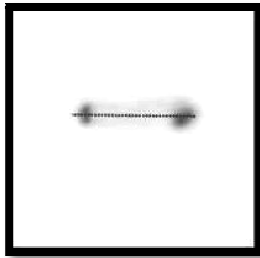
Es sollte überprüft werden, welche Auswirkungen Punktmutationen und PAS_c-Deletion in DcuS-YFP auf die Lokalisation in der Zelle haben. Die Tabelle E5 zeigt die Lokalisation von cytoplasmatischem YFP, wildtypischem DcuS-YFP und den DcuS-YFP Varianten in *E. coli* Einzelzellen. Für die quantitative Untersuchung der Fluoreszenzlokalisierung wurden Fluoreszenz-Profile entlang der Zellachse von *E. coli* aufgenommen. Die DcuS-Lokalisationsmodelle zeigen schematisch die Verteilung der jeweiligen Varianten in der *E. coli* Membran. Cytoplasmatisches YFP (pEYFP) hatte wie erwartet, eine homogene Verteilung im Cytoplasma, daraus resultierte ein Fluoreszenz-Profil mit gleichbleibender Intensität über das gesamte Profil der Zelle. Im Gegensatz dazu zeigte wildtypisches DcuS-YFP (pMW407) eine polare Anhäufung an beiden Zellpolen, aber auch eine einseitige Akkumulation war oft zu beobachten. Das Fluoreszenz-Profil wies zwei Maxima in der Zelle auf, entsprechend der Anhäufung an den Zellpolen. An den Polen nimmt die Fluoreszenzintensität um das 3-fache im Vergleich zum Cytoplasma zu.

Diese Ergebnisse sind mit bestehenden Ergebnissen von Scheu *et al.* von 2008 konform. Die zwei stillen DcuS-Varianten, DcuS-I318A-YFP und DcuS-D240A-YFP zeigten wie wildtypisches DcuS-YFP eine polare Lokalisation von DcuS. Die Fluoreszenz-Profile der Varianten waren mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Intensität der Fluoreszenz nahm an den Zellpolen gegenüber dem Cytoplasma um das 2,5 bis 3-fache zu. Somit haben die stillen Mutationen I318A und D240A keine Auswirkung auf die Verteilung von DcuS-YFP in der Membran und die Lokalisation ist mit der von wildtypischem DcuS-YFP vergleichbar.

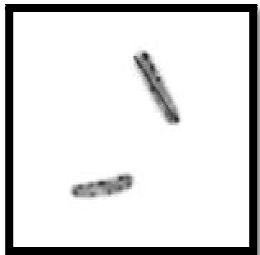
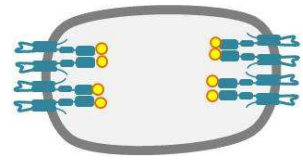
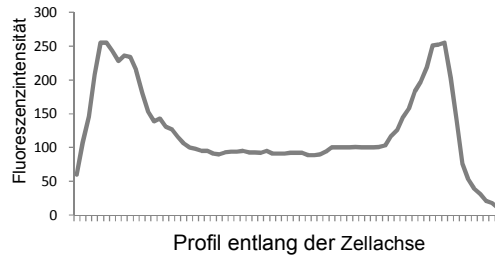
Im Gegensatz dazu zeigten die zwei ON-Varianten, DcuS-N248D-YFP und DcuS-N304D-YFP eine punktuelle Anhäufung in der Zellmembran von *E. coli*. Deutlich erkennbar war eine dicht gepackte Anhäufungen der ON-DcuS-YFP-Varianten entlang der Membran, das spiegelt sich auch im Fluoreszenz-Profil wieder. Im Vergleich zu wildtypischem DcuS-YFP zeigten beiden ON-DcuS-YFP-Varianten eine gezackte Fluoreszenzintensitäten entlang der kompletten Zellachse. Somit haben die beiden ON-Mutationen N248D und N304D einen Einfluss auf die Lokalisation von DcuS-YFP.

Tab. E5: Fluoreszenz-Profile und Lokalisation von verschiedenen Varianten von DcuS-YFP in *E. coli* Einzelzellen. Die Profile der Fluoreszenzintensität wurden nach Induktion mit 133 μ M Arabinose entlang der Zellachse von *E. coli* JM109 Einzelzellen aufgenommen. Die DcuS-Lokalisationsmodelle zeigen die Lokalisation der DcuS-YFP exprimierten Varianten in der Zelle. Die Einzelzellen exprimieren das cytoplasmatische YFP (pEYFP), wildtypische DcuS DcuS-YFP (pMW407), zwei stille Varianten DcuS-I318A-YFP (pMW1229) und DcuS-D240A-YFP (pMW1242), zwei ON-Varianten DcuS-N248D-YFP (pMW1202) und DcuS-N304D-YFP (pMW1228), zwei OFF-Varianten DcuS-V276A-YFP (pMW1230) und DcuS-L300A-YFP (pMW2141) und PAS_c-EX-YFP (pMW1302). Die *E. coli* Zellen wurden auf einem PBS-Agarose-beschichteten Objektträger immobilisiert und bei 513nm mit einem konfokalen Laserstrahl angeregt. Die gestrichelte Linie gibt die Zellachse für die Messung des Fluoreszenz-Profiles der Einzelzelle wieder. Die Zellen haben eine Länge von ca. 4 μ m.

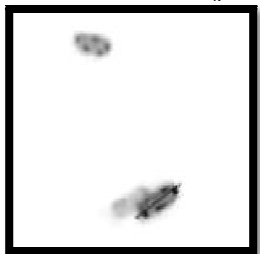
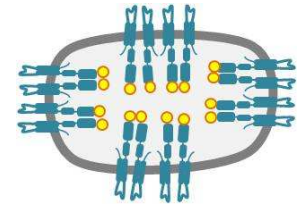
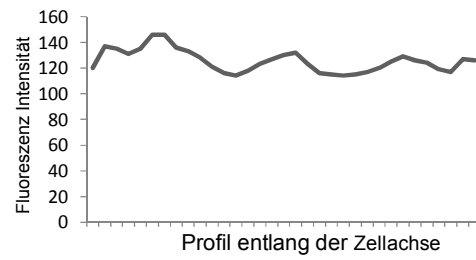




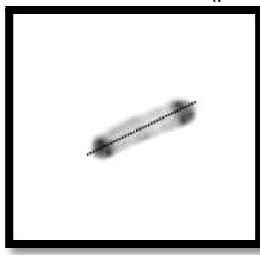
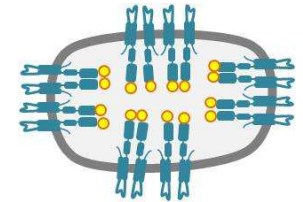
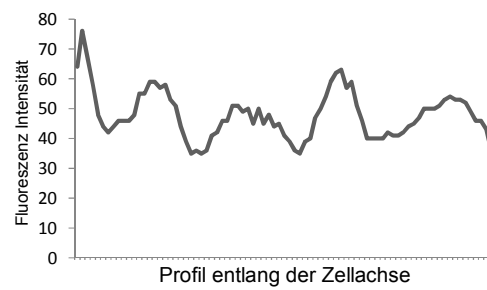
DcuS-D240A-YFP (pMW1242)



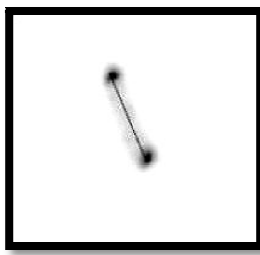
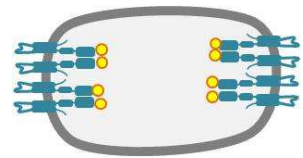
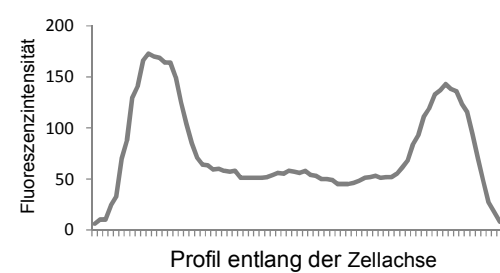
DcuS-N248D-YFP (pMW1202)



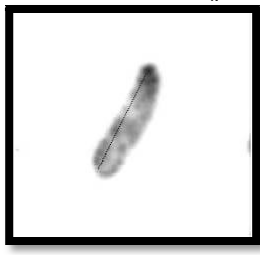
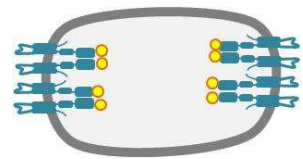
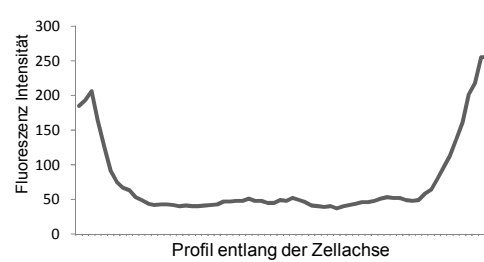
DcuS-N304D-YFP (pMW1228)



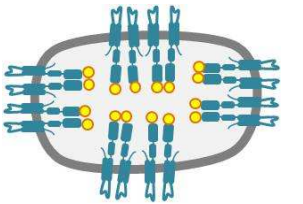
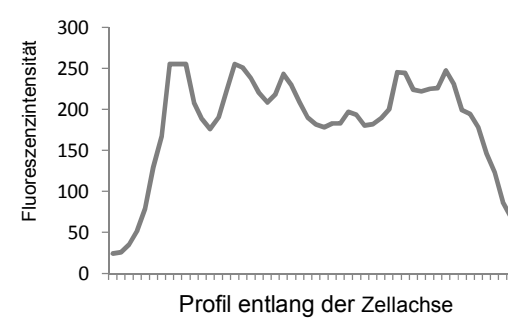
DcuS-L300A-YFP (pMW1241)



DcuS-V276A-YFP (pMW1230)



PAS_C-EX-YFP (pMW1302)



Die zwei OFF-Varianten, DcuS-L300A-YFP und DcuS-V276A-YFP zeigten eine polare Anhäufung von DcuS an den Zellpolen wie wildtypisches DcuS-YFP. Dies bestätigt sich auch in den Fluoreszenz-Profilen der beiden OFF-Varianten. Die Fluoreszenzintensität nimmt an den Polen im Vergleich zur Zellmitte um das 3- bis 4-fache zu. Somit hatten die OFF-Mutationen keine Auswirkung auf die Verteilung von DcuS-YFP in der Membran.

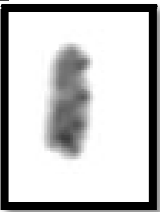
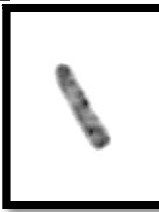
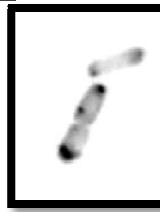
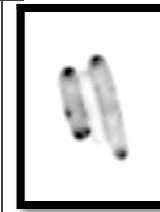

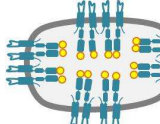
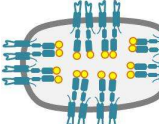
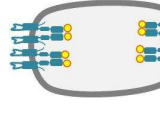
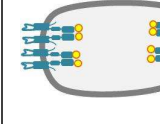
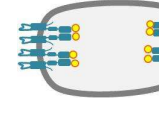
Die DcuS-Variante PAS_C-EX-YFP mit deletierter PAS_C-Domäne zeigte eine relativ gleichmäßige Verteilung in der Membran über die gesamte Zelle mit teilweise punktueller Anhäufung. Das Fluoreszenz-Profil von PAS_C-EX-YFP war mit dem von DcuS-N304D-YFP vergleichbar und lieferte eine gezackte Fluoreszenzintensität entlang der Zellachse. Somit hat die Deletion von PAS_C einen Einfluss auf die Lokalisation von DcuS-YFP in der Membran, vergleichbar mit den ON-Varianten von DcuS-YFP.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass stille und OFF-Mutationen von DcuS-YFP wie wildtypisches DcuS eine polare Lokalisation von DcuS an den Zellpolen aufweisen. Die ON-Mutationen N248D und N304D, sowie die Deletion der PAS_C-Domäne, hatten dagegen einen Einfluss auf die Verteilung von DcuS-YFP in der Membran und führten zu einer gleichmäßigen oder punktuell angehäuften Membranlokalisation.

4.6.2 Einfluss verschiedener Substrate auf die Lokalisation von DcuS-YFP

Untersucht werden sollte der Einfluss der Effektoren Fumarat und Malat auf die Lokalisation von DcuS-YFP. Als Kontrolle wurde die Lokalisation von DcuS-YFP in Anwesenheit von dem C₅-Tricarboxylat Glutarat und dem C₆-Tricarboxylaten Tricarballoylat getestet, welche nicht von der Sensordomäne erkannt werden (Krämer, 2008). In Anwesenheit der C₄-Dicarboxylate Fumarat und Malat wurde eine zum größten Teil gleichmäßige Verteilung von wildtypischen DcuS-YFP in der Membran beobachtet (Tab. E6). Diese Ergebnisse weichen von Befunden von Scheu *et al.* (2008) ab. Dort wurde eine verstärkte polare Anhäufung von DcuS mit Fumarat im Medium gezeigt. Im Gegensatz zu Fumarat und Malat, zeigte DcuS-YFP in Anwesenheit von Glutarat und Tricarballoylat eine starke polare Akkumulation an den Zellpolen von *E. coli*, die auch in Abwesenheit von Effektoren beobachtet wurde. Mit der C₆-Tricarboxylat Citrat (nicht gezeigt) konnte keine klare Aussage über die Lokalisation getroffen werden, da 50% der Zellen eine polare Anhäufung gezeigt hatten und 50% der Zellen eine Verteilung in der Membran aufwiesen. Zusammenfassend kann man sagen, dass Fumarat und Malat einen Einfluss auf die Verteilung von DcuS-YFP in der Zelle hatten. Glutarat und Tricarballoylat hatten keinen Einfluss auf die polare Lokalisation von DcuS.

Tab. E6: Lokalisierung von DcuS-YFP in *E. coli* Einzelzellen: Einfluss verschiedenen Effektoren. *E. coli* Zellen (JM109 pMW407) ohne und mit verschiedenen Effektoren wurden auf einem PBS-Agarose-beschichteten Objektträger immobilisiert und bei 513nm mit einem konfokalen Laserstrahl angeregt. Die DcuS-Lokalisationsmodelle zeigen die Lokalisation von DcuS-YFP in der Zelle. Die *E. coli* Zellen haben eine Länge von ca. 4 μm .

		DcuS-YFP				
		20 mM Effektor				kein Effektor
		Fumarat	Malat	Glutarat	Tricarballylat	
Bild						
Modell						

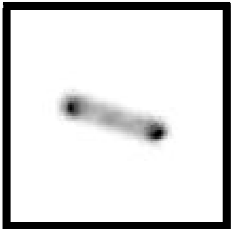

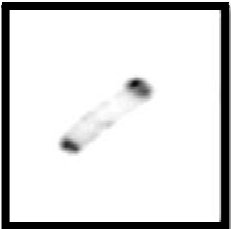
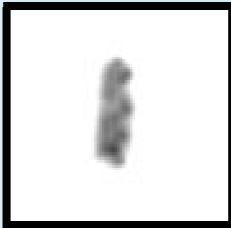
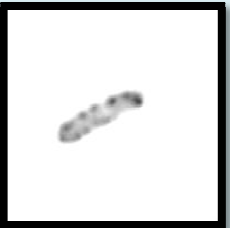

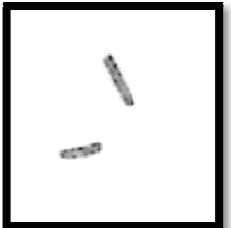
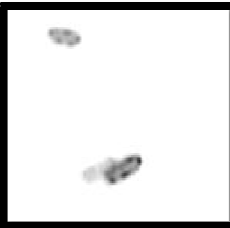
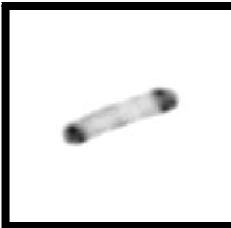
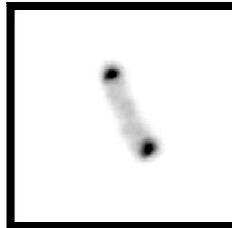

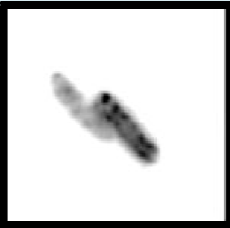
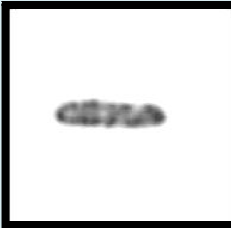
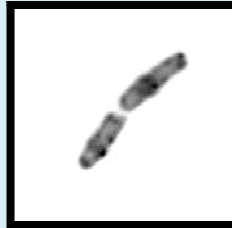
4.6.3 Einfluss von Fumarat auf die Lokalisation von DcuS-YFP-Varianten

Untersuchungen sollten klären, ob Fumarat auch einen Einfluss auf die Lokalisation von stillen, ON-, und OFF-Varianten von DcuS-YFP hat. In Tabelle E7 ist deutlich zu erkennen, dass die beiden stillen Varianten DcuS-I318A-YFP und DcuS-D240A-YFP ohne Fumarat eine polare Akkumulation aufweisen.

In Tabelle E7 ist deutlich zu erkennen, dass die beiden stillen Varianten DcuS-I318A-YFP und DcuS-D240A-YFP ohne Fumarat eine polare Akkumulation aufweisen. In Anwesenheit von Fumarat zeigte sich eine lockere Verteilung in der Membran. Ähnlich wurde auch für die beiden OFF-Varianten DcuS-L300A-YFP und DcuS-V276A-YFP beobachtet. Somit zeigten in Anwesenheit von Fumarat die stillen und die OFF-DcuS-YFP-Varianten, wie der Wildtyp eine Verteilung in der Membran. Wie in Tabelle E4 dargestellt, hatten die ON-Mutationen N248D und N304D in DcuS-YFP bereits ohne Effektor geclusterte Anhäufungen entlang der gesamten Zelle zur Folge. Die Anwesenheit von Fumarat hatte keinen Einfluss auf die Verteilung der beiden ON-DcuS-YFP-Varianten.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass Fumarat einen Einfluss auf die Lokalisation von stillen und OFF-Varianten von DcuS-YFP, vergleichbar mit wildtypischem DcuS-YFP aufweist. Die Anwesenheit von Fumarat führte zu einer Verteilung von DcuS-YFP entlang der ganzen Zellen. Fumarat hatte nur auf die ON-Varianten DcuS-N248D-YFP und DcuS-N304D-YFP keinen sichtbaren Effekt.

Tab. E7: Lokalisierung verschiedene DcuS-YFP Varianten in *E. coli* Einzelzellen: Effekt von Fumarat. Die Zucht erfolgte in LB mit 133 μ M Arabinose und 20 mM Fumarat. *E. coli* Zellen (JM109) wurden auf einem PBS-Agarose-beschichteten Objektträger immobilisiert und bei 513nm mit einem konfokalen Laserstrahl angeregt. Die Einzelzellen exprimieren das wildtypische DcuS-YFP (pMW407), zwei stille Varianten DcuS-I318A-YFP (pMW1229) und DcuS-D240A-YFP (pMW1242), zwei ON-Varianten DcuS-N248D-YFP (pMW1202) und DcuS-N304D-YFP (pMW1228) und zwei OFF-Varianten DcuS-V276A-YFP (pMW1230) und DcuS-L300A-YFP (pMW2141). Die *E. coli* Zellen haben eine Länge von ca. 4 μ m.

		Protein (Plasmid)			
		Fluoreszenz-Bild			
		DcuS-YFP (pMW407)	DcuS-I318A-YFP (pMW1229)	DcuS-D240A-YFP (pMW1242)	
Ohne Fumarat					
20 mM Fumarat					
		DcuS-N248D-YFP (pMW1202)	DcuS-N304D-YFP (pMW1228)	DcuS-L300A-YFP (pMW1241)	DcuS-V276A-YFP (pMW1230)
Ohne Fumarat					
20 mM Fumarat					

4.7 *In vivo* Crosslinking mit DSS

Durch Vernetzungs-Experimente können Interaktionen und oligomere Zustände eines Proteins *in vivo* analysiert werden. Die Methode basiert auf einer Vernetzung von Proteinen mit dem unspaltbaren, stabilen Crosslinker DSS (Disuccinimidyl Suberat). Da DSS membrangängig ist, sind intrazelluläre Untersuchungen möglich. Der Crosslinker besitzt einen N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester an jeder Seite seines Kohlenstoffarms. NHS-Ester sind aktive Carbonsäuren und reagieren leicht mit primären Aminen, dabei entstehen stabile Amidbindungen (Abb. E26).

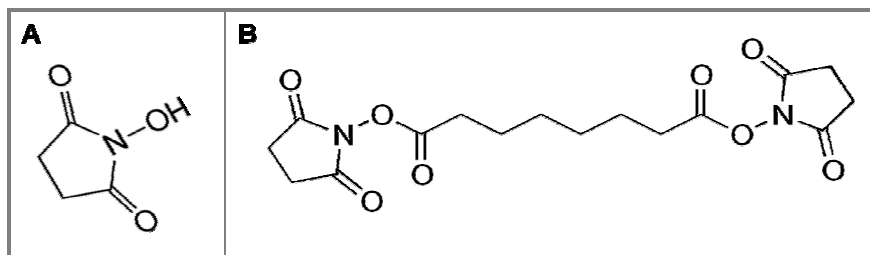


Abb. E26: Chemische Strukturen: A) N-Hydroxysuccinimid (NHS); B) homobifunktionaler Disuccinimidyl Suberat (DSS)-Crosslinker.

In Proteinen findet man primäre Amine in den Seitenketten von Lysin-Resten. DcuS besitzt 29 Lysin-Reste über das komplette Protein verteilt (Abb. E27). Auf Grund der Membrangängigkeit und der Möglichkeit zur Vernetzung der Lysin-Reste, ist DSS ein geeigneter Crosslinker für die *in vivo*-Untersuchung von DcuS.

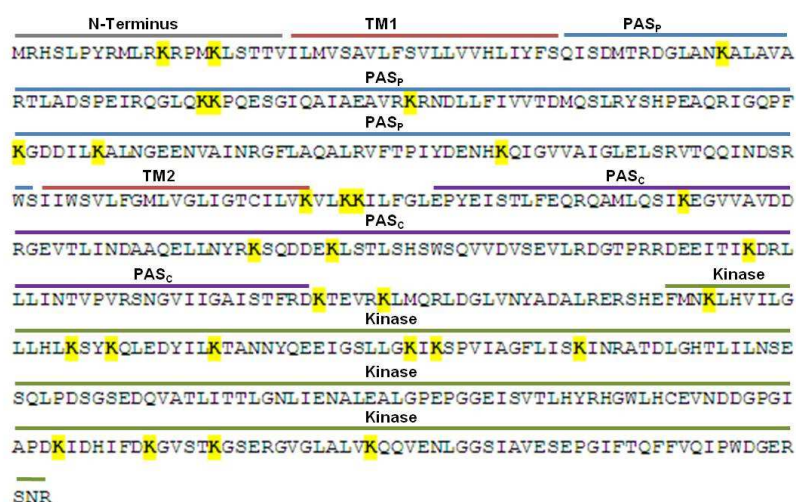


Abb. E27: Aminosäuresequenz des Sensorproteins DcuS aus *E. coli*. In Gelb hervorgehoben sind die 29 Lysin-Reste (K) in den verschiedenen Domänen von DcuS. Die einzelnen Domänen sind farblich hervorgehoben: der N-Terminus in Grau, die Transmembranhelices in Rot, die periplasmatische Sensordomäne in Blau, die cytoplasmatische PAS-Domäne in Lila und die Kinase-Domäne in Grün.

Bei bakteriellen membrangebundenen Sensor-Histidinkinasen wird vermutet, dass sie oligomere Zustände zeigen (Gao & Stock, 2009). Diese Vermutung konnte 2010 durch Scheu *et al.* für *E. coli* DcuS bestätigt werden. DcuS liegt als Dimer (120 kDa) und Tetramer (240 kDa) in der Membran von *E. coli* vor (Abb. E28). Es wurde zusätzlich festgestellt, dass der oligomere Zustand von DcuS ein wichtiger Parameter für die Funktionalität von DcuS darstellt (Scheu *et al.*, 2010).

Überprüft werden sollte, welche Oligomerisierungszustände für die DcuS-Varianten in der Membran aufzufinden sind. Dafür wurde eine DcuS-Variante ohne Cystein-Reste (DcuS*) und DcuS*-Varianten in dem *E. coli* Stamm JM109 überproduziert. Nach der Überproduktion von DcuS* wurden die intakten Zellen mit DSS inkubiert. Dadurch wurden die Proteine vernetzt, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und DcuS mit Antikörpern gegen die periplasmatische Domäne nachgewiesen.

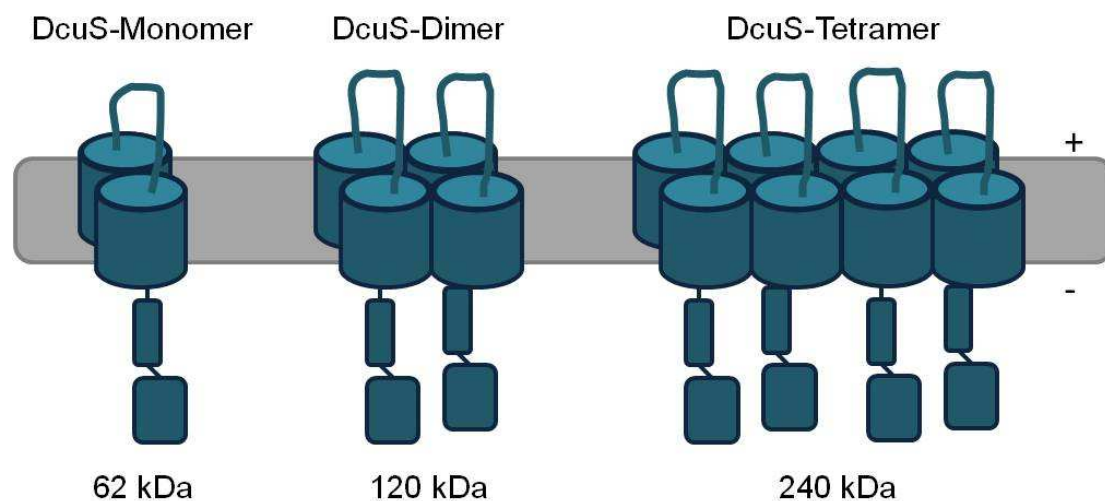


Abb. E28: Schematische Darstellung der Oligomerisierungszustände von DcuS in der Membran. Die Größe des DcuS-Monomers beträgt 62 kDa, des DcuS-Dimers 120 kDa und des DcuS-Tetramers 240 kDa.

Die Abbildung E29 zeigt *in vivo* Crosslinking-Experimente mit wildtypischen DcuS* und den DcuS*-Varianten, zwei ON-Varianten, DcuS*-N248D, DcuS*-N304D und eine OFF-Variante DcuS*-V276A. Als Kontrolle diente isoliertes, rekonstituiertes DcuS. Die Spuren 2, 4, 6 und 8 zeigten die nicht vernetzten Proben. Zu sehen ist, dass DcuS* und alle DcuS*-Varianten eine monomere Bande bei 62 kDa aufweisen. Die Spuren 3, 5, 7 und 9 zeigen die vernetzten Proben mit DSS. Wildtyp-DcuS* und die ON- und OFF-Varianten von DcuS* zeigen einheitlich oligomeren Zustände: eine schwache Bande des Dimers von 120 kDa und eine

deutlich erkennbare tetramere Bande von 240 kDa. Mit isolierten rekonstituierten DcuS wurden die gleichen Banden identifiziert.

Die ON- und OFF-Varianten von DcuS* hatten keine erkennbaren Auswirkung auf den Oligomerisierungszustand von DcuS*. Die Vernetzung durch DSS und Nachweis durch SDS-Page ist vermutlich nicht ausreichend sensitiv um kleine Änderungen im Oligomerisierungszustand, oder Auflösung der Oligomerisierung in bestimmten Domänen des Proteins nachzuweisen.

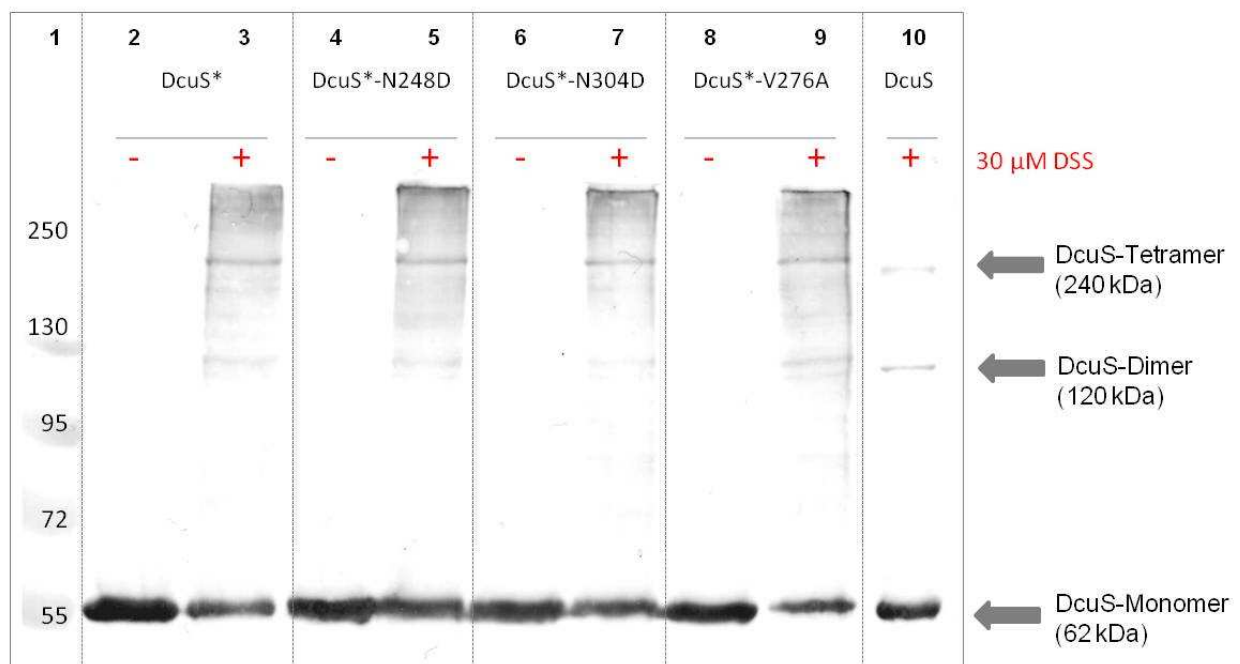


Abb. E29: *In vivo* Crosslinking mit DSS (Western-Blot mit Anti-DcuS-PAS_p). Überprüfung des oligomeren Zustandes von Wildtyp-DcuS* und DcuS*-Varianten. DcuS* wurde im *E. coli* Stamm JM109 überproduziert und mit 0,3 mM Arabinose induziert. Anschließend *in vivo* mit 30 μM Disuccinimidyl suberate (DSS) vernetzt. Die Proben wurden in Anwesenheit von DTT durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Anti-DcuS-pd Antikörpern nachgewiesen. Spur: 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, SM1811); 2+3: DcuS* (JM109 pMW967); 4+5: DcuS*-N248D (JM109 pMW1155); 6+7: DcuS*-N304D (JM109 pMW999); 8+9: DcuS*-V276A (JM109 pMW1154); 10: isoliertes und solubilisiertes Wildtyp-DcuS (C43(DE3) pMW151). DcuS*: DcuS ohne Cystein-Reste.

4.8 NMR-Strukturuntersuchungen von verkürztem DcuS

Strukturuntersuchungen der Sensor kinase DcuS mittels Festkörper-NMR (solid-state NMR, ssNMR) wurde an verkürztem DcuS ohne Kinase-Domäne [DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C)] durchgeführt (Etzkorn *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur herkömmlichen NMR-Methode können mit ssNMR Proteine in der Membran untersucht werden (de Groot, 2000). Die ssNMR ist noch nicht geeignet für Proteine wie DcuS mit einer Größe von 62 kDa, weshalb das verkürzte Konstrukt [DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C)] verwendet wurde. Dieses Konstrukt wurde überproduziert und in Liposomen rekonstituiert. Das Konstrukt umfasst den N-terminalen Bereich mit den beiden Transmembranhelices TM1 und TM2, die periplasmatische Sensordomäne (PAS_P) und die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) ohne Kinase-Domäne von Aminosäure 1 bis 333 (Abb. E30).

PAS_C ist in der Uniprot-Datenbank (Expasy) mit Aminosäurepositionen von 220 bis 291 nicht korrekt wiedergegeben und wurde nach Vergleich der Sequenz mit homologen PAS_C-Domänen auf die Aminosäurepositionen 212 bis 323 von DcuS korrigiert (Etzkorn *et al.*, 2008). Das verkürzte DcuS-Konstrukt von Aminosäuren 1 bis 333 wurde in pET28a kloniert und im Stamm C43(DE3) nach Induktion mit IPTG überproduziert. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine Ni₆-NTA-Säule.

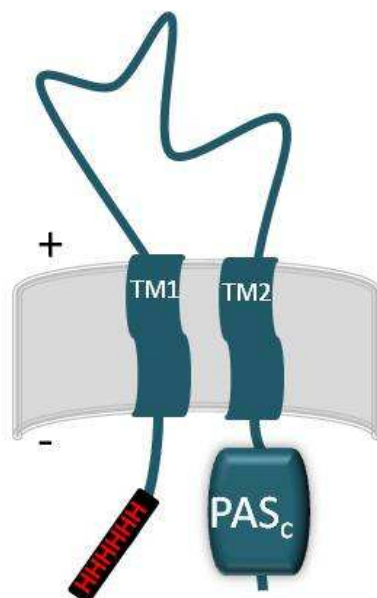


Abb. E30: Schematische Darstellung des C-terminal verkürzten [DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C)] Konstrukts für die ss-NMR. Das Konstrukt umfasst den N-terminalen Bereich mit His₆-tag, den beiden Transmembranhelices TM1 und TM2, die periplasmatische Sensordomäne (PAS_P) und die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) ohne Kinase Domäne von Aminosäure 1 bis 333.

Nach Induktion der Protein-Überexpression erschien eine Bande mit der erwarteten Masse von 39,6 kDa (Abb. E31). Die Proteinausbeute machte ungefähr 0,8 % des Gesamtproteins aus (Tab. E8).

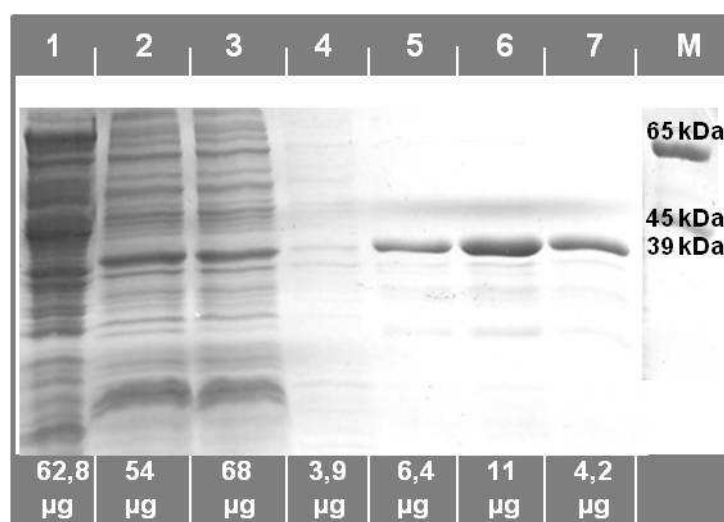


Abb. E31: Überexpression und Reinigung von DcuS-(PAS_p-TM1,2-PAS_c-N248D) aus *E. coli* C43(DE3) (pMW552). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Marker: Proteinstandard BSA (Mr 65), Ovalbumin (Mr 45), Lysozym (Mr 14) 1: Gesamtprotein nach Zellaufschluss; 2: 1. Durchlauf der Ni₆-NTA-Agarose-Säule; 3: 2. Durchlauf der Ni₆-NTA-Agarose-Säule; 4: Waschfraktion der Ni₆-NTA-Agarose-Säule. 5 - 7 Elution der Ni₆-NTA-Agarose-Säule: 7: Fraktion 1; 8: Fraktion 2; 9: Fraktion 3

Tab. E8: Ausbeute der Reinigung von [DcuS-(PAS_p-TM1,2-PAS_c-N248D)]

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ¹⁾
Gesamtprotein ²⁾	100	805
Gereinigtes Protein ³⁾	0,8	6,6

1) aus 2,4 l Kulturvolumen, Zucht mit *E. coli* C43 (pMW552) in M9 mit markierten ¹⁴NH₄Cl und ¹³C-Glucose

2) Überstand nach Zellaufschluss und Abtrennung der nicht-aufgeschlossenen Zellen

3) Gesammelte Fraktionen nach Ni₆-NTA-Elution

Für Untersuchungen durch Festkörper-NMR wurde das Protein in Liposomen aus *E. coli* Phospholipiden rekonstituiert. Die Liposomen wurden dafür mit Triton X-100 in einem effektiven Detergenz:Lipid-Quotient (Reff) von 2,5 destabilisiert. Unter diesen Bedingungen liegen die Liposomen vollständig solubilisiert in Form von gemischten Detergenz-Lipid-Mizellen vor. Die Rekonstitution erfolgte im Protein:Lipid-Verhältnis von 7,5:1. Die rekonstituierte Probe (Abb. E32) [DcuS-(PAS_p-TM1,2-PAS_c-N248D)] wurde anschließend durch Festkörper-NMR-Spektroskopie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen analysiert (Etzkorn *et al.*, 2008).

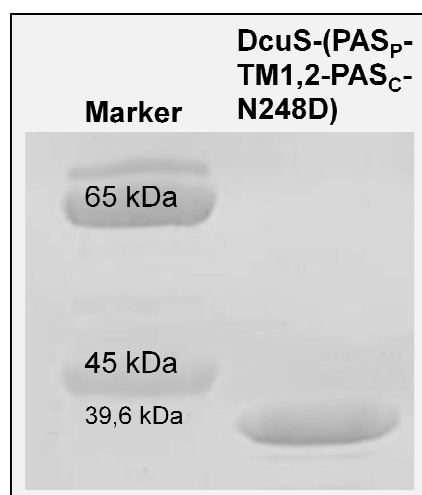


Abb. E32: Überprüfung der Reinheit der rekonstituierten [DcuS-(PAS_P-TM1,2-PAS_C-N248D)] NMR-Probe. Die Liposomen wurden mit Triton X-100 destabilisiert. Die Rekonstitution der Probe (pMW552) erfolgte im Protein:Lipid-Verhältnis von 7,5. Die Probe wurde durch SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie-Blau gefärbt und zeigt eine erwartete Masse von 39,6 kDa.

Cytoplasmatische PAS-Domänen sind in über 33% aller membrangebundenen Sensor-Histidinkinasen zu finden (Etzkorn *et al.*, 2008). Die Funktion cytoplasmatischer PAS-Domänen ist größtenteils nicht bekannt. Was PAS-Domänen vereint, ist die konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur. Die Abbildung E33A zeigt die PAS_C-Sekundärstruktur, die mit Hilfe von ssNMR-Untersuchungen und den Strukturvorhersagen durch den PSIPRED-Server erstellt wurde (Etzkorn *et al.*, 2008). PAS_C setzt sich aus fünf α -Helices und fünf β -Faltblättern, in der für PAS-Domänen charakteristischen Reihenfolge α 1- β 1- β 2- α 2- α 3- α 4- α 5- β 1- β 2- β 3 zusammen.

PAS_C ist in vier Regionen unterteilt (Abb. E33B): die N-terminale Kappe (Aminosäure 212 bis 229); den PAS-Kern (Aminosäure 230 bis 272); den helikalen Linker (Aminosäure 273 bis 286) und das β -Faltblatt-Gerüst (Aminosäure 287 bis 323).

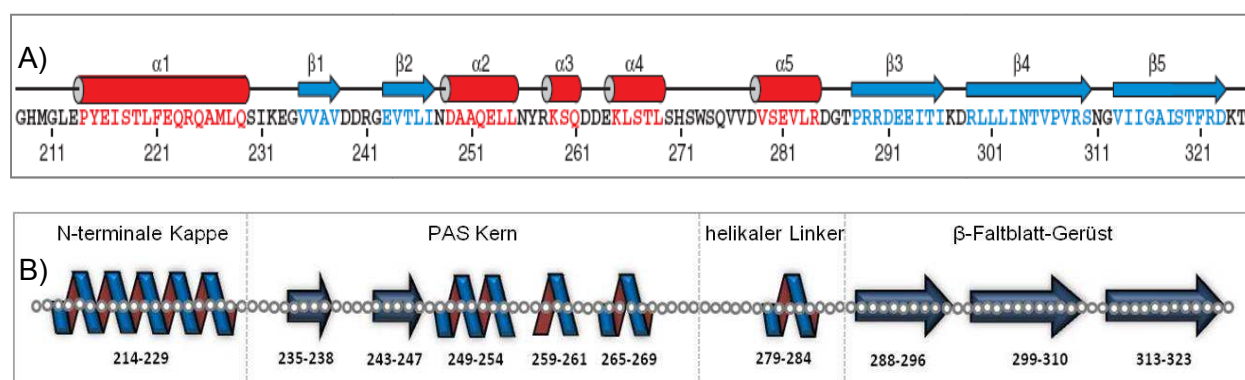


Abb. E33: PAS_C Sekundärstruktur nach Etzkorn *et al.* 2008. A) In Rot sind die fünf α -Helices und in Blau die fünf β -Faltblätter mit der Primärsequenz (AS 212-323) dargestellt. B) PAS_C ist in vier Regionen unterteilt: N-terminale Kappe (α 1; AS 212 - 229), PAS Kern (β 1, β 2, α 2, α 3, α 4; AS 230 - 272), helikaler Linker (α 1; AS 273 - 286), β -Faltblatt-Gerüst (β 1, β 2, β 3; AS 287 - 323) Die Kreise stehen für die einzelnen Aminosäuren der PAS_C-Domäne.

Anhand von Strukturmodellen, erstellt mit dem ROBETTA-Server, wurde in Anlehnung an die Kristallstruktur von NifL von *A. vinelandii* (Key *et al.*, 2007) eine Tertiärstruktur für DcuS erstellt werden. Somit sollten funktionale Effekte der Mutationen in der PAS_C-Domäne und ihrer potentiellen strukturellen Konsequenzen analysiert werden (Etzkorn *et al.*, 2008).

Abbildung E34A zeigt die zwei PAS_C-Versionen des ROBETTA-Modells in Blau und Grün, welche gegen die entsprechende dimere Kristallstruktur von NifL (gelb) aus *A. vinelandii* aligniert wurde. In Rot dargestellt sind die Mutationsorte mit den Resten N248 und N304, welche eine fumaratunabhängige Aktivierung zeigten. Die Abbildung E34B stellt dar, wie die Aminosäure N248 mit Q229 der N-terminalen Helix Wasserstoffbrückenbindungen formt. Die Aminosäure N304 befindet sich in enger Nähe zu einer Seitenkette eines Lysin-Restes K232 des anderen Monomers. Die Strukturvorhersage postuliert, dass diese beiden Aminosäuren interagieren (Abb. E34C).

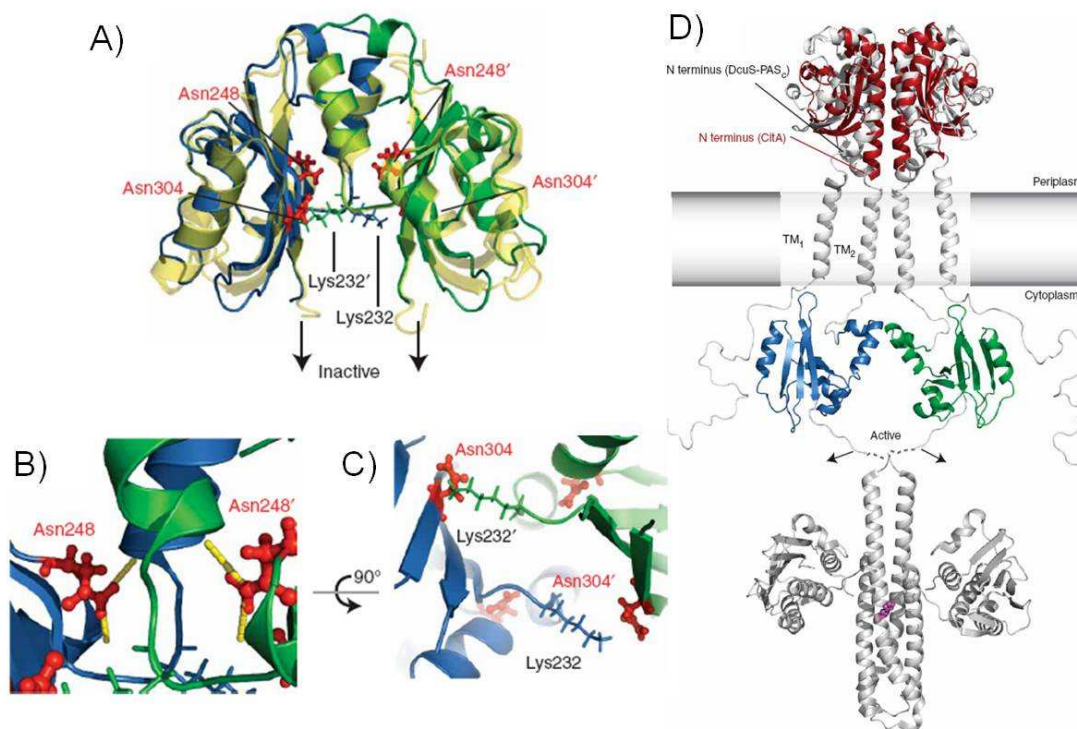


Abb. E34: Funktionale Effekte der Mutationen in der PAS_C-Domäne und ihrer potentiellen strukturellen Konsequenzen (Etzkorn *et al.*, 2008). A) Zwei PAS_C-Versionen des ROBETTA Modells (blau und grün) wurden gegen die entsprechende dimeren Kristallstruktur von NifL (gelb) aus *A. vinelandii* (Key *et al.*, 2007) aligniert. In Rot dargestellt sind die Mutationsorte (N248, N304), welche eine fumaratunabhängige Aktivierung zeigen. B) Aminosäure N248 formt Wasserstoffbrückenbindungen mit der Aminosäure Q229 der N-terminalen Helix. C) Die Aminosäure N304 befindet sich in enger Nähe zu Lysin232 des anderen Monomers. D) Das Model zeigt die PAS_C-vermittelte Signaltransduktion im Vollängen-DcuS. Die Abbildung zeigt zwei alignierte Strukturen der periplasmatische Signal-Domäne (PAS_P). Dargestellt in Weiß ist die ssNMR-Struktur von PAS_P (Pappalardo *et al.*, 2003) und in Rot die Kristallstruktur des dimeren Sensors CitA (Sevvana *et al.*, 2008). Das Auseinanderfallen des PAS_C-Dimers (grün, blau) nach Aktivierung oder Mutation, verändert die C-terminale Extension und aktiviert die anhängende Kinase-Domäne (modelliert nach Marina *et al.*, 2005)

Das Modell zeigt die PAS_C-vermittelte Signaltransduktion im Volllängen-DcuS (Abb. E34D). Die Abbildung zeigt zwei Strukturen der periplasmatische Signal-Domäne (PAS_P). In Weiß dargestellt ist die ssNMR-Struktur von PAS_P (Pappalardo *et al.*, 2003) und in Rot die Kristallstruktur des dimeren Sensors CitA (Sevvana *et al.*, 2008). Das Auseinanderfallen des PAS_C-Dimers (grün, blau) nach Aktivierung oder Mutation, verändert die C-terminale Ausdehnung und aktiviert die anhängende Kinase-Domäne (modelliert nach Marina *et al.*, 2005).

5. Diskussion

5.1 PAS-Domänen

Per-ARNT-Sim-(PAS) Domänen kommen in allen Reichen des Lebens vor. PAS-Domänen spielen eine wichtige Rolle als vielseitige Sensor- und Dimerisierungsdomänen in der Wahrnehmung von chemischen und physikalischen Reizen und für die Signalweiterleitung in Multidomänen-Proteinen (Taylor & Zhulin, 1999). Es gibt drei Klassen von PAS-Domänen. Klasse 1 umfasst die gut untersuchten Cofaktor-bindenden PAS-Domänen. In der Klasse 2 befinden sich die signalerkennenden PAS-Domänen, die reversibel einen Effektor binden können. Die dritte Klasse der PAS-Domänen ist noch schlecht untersucht. Sie binden keinen Cofaktor und dienen nicht der Signalerkennung.

Das Zweikomponentensystem DcuSR von *E. coli* besteht aus der membranständigen Sensor-Histidinkinase DcuS (543 Aminosäuren) und dem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR. DcuS stellt ein Homodimer dar und besitzt zwei Transmembranhelices und eine periplasmatische PAS-Domäne der Klasse 2 (PAS_P). Nach der Transmembranhelix 2 folgt die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) der Klasse 3, abschließend die cytoplasmatische Histidinkinase (Abb. D1).

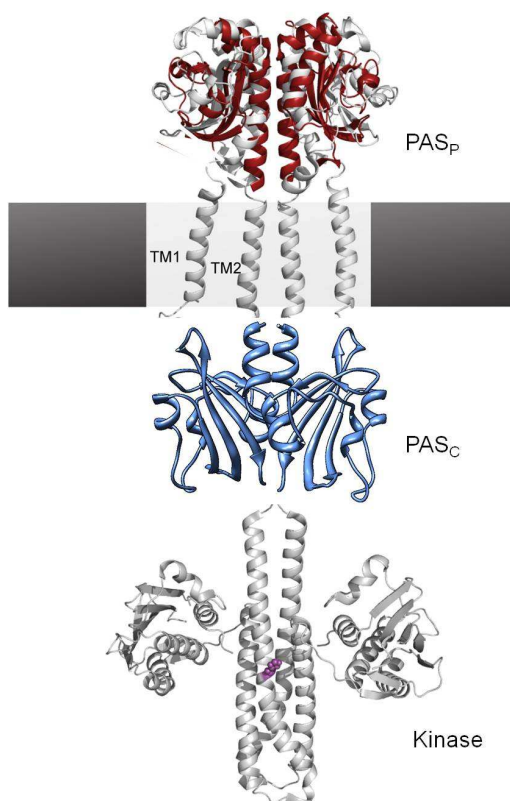


Abb. D1: Strukturmodell von DcuS (modelliert nach Etkorn *et al.*, 2008). Das Modell zeigt zwei alignierte Strukturen der periplasmatischen Sensor-Domäne (PAS_P). Dargestellt in Weiß ist die ssNMR-Struktur von PAS_P (Pappalardo *et al.*, 2003) und in Rot die Kristallstruktur des dimeren Sensors CitA (Sevvana *et al.*, 2008). Die Abbildung zeigt das PAS_C-Dimer in Blau (modelliert nach 2G3J, Key *et al.*, 2007) und die anhängende Kinase-Domäne (modelliert nach Marina *et al.*, 2005).

Die periplasmatische Domäne (PAS_P) fungiert als Sensor und erkennt externe C₄-Dicarboxylate oder Citrat über positiv geladene oder polare Aminosäurereste (Kneuper *et al.*,

2005; Krämer *et al.*, 2007). Die PAS_P-Struktur wurde durch NMR-Strukturanalyse und Röntgenkristallographie aufgeklärt (Pappalardo *et al.*, 2003; Cheung & Hendrickson, 2008). Keine der beiden PAS-Domänen von DcuS besitzt einen gebundenen Cofaktor (Abo-Amer *et al.*, 2004; Etzkorn *et al.*, 2008; Kneuper *et al.*, 2010). In Gegensatz zu chemischen, physikalischen und funktionalen Unterschieden zeigen periplasmatische und cytoplasmatische PAS-Domänen jeweils eine charakteristische Tertiärstruktur die stark konserviert ist (Kneuper *et al.*, 2010). Die periplasmatische PAS-Domäne besitzt drei N-terminale α -Helices (α 1, α 2, α 3), den Kern Bereich (β 1, β 2, α 4, α 5, β 3, β 4, β 5) und eine C-terminale α 6-Helix (Abb. D2A). Die Tertiärstruktur der cytoplasmatischen PAS-Domäne umfasst einen fünf-strängigen antiparallelen β -Faltblatt-Kern und fünf α -Helices in der Reihenfolge α 1- β 1- β 2- α 2- α 3- α 4- α 5- β 3- β 4- β 5 (Etzkorn *et al.*, 2008) (Abb. D2B). Die Struktur von PAS_C ist durch Festkörper-NMR analysiert worden (Etzkorn *et al.*, 2008)

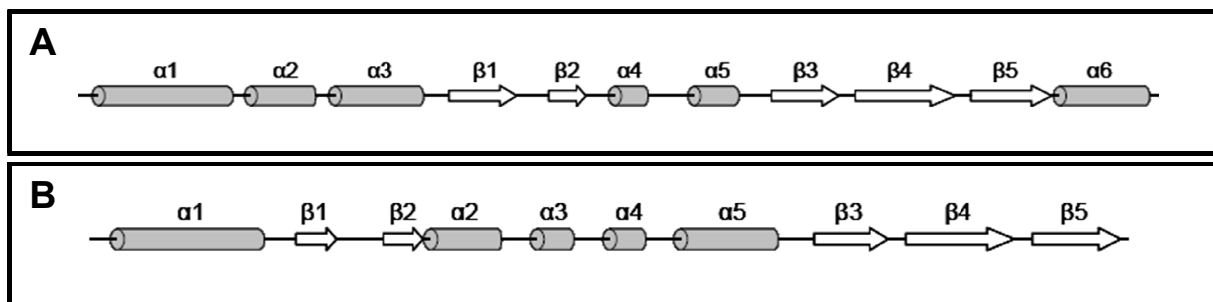


Abb. D2: Sekundärstrukturelemente von PAS_P und PAS_C von DcuS (Kneuper *et al.*, 2010). A) Sekundärstrukturelemente der periplasmatischen PAS-Domäne (PAS_P) von Aminosäure Y40 bis R180 (3 α , 2 β , 2 α , 3 β , 1 α). B) Sekundärstrukturelemente der cytoplasmatischen PAS-Domäne (PAS_C) von Aminosäure L212 bis D323 (1 α , 2 β , 4 α , 3 β).

Die Sensoren DcuS, Aer, NifL, FixL und KinA besitzen unterschiedliche Anordnung und Lokalisation der PAS-Domänen (Abb. D3). Die Proteine NifL, FixL und DcuS haben im Vergleich zu Aer zwei, KinA sogar drei PAS-Domänen.

Der Aer- (*aerotaxis receptor*) Sensor aus *Escherichia coli* gehört zu der MCP-Familie (methyl-accepting chemotaxis proteins). Aer ist membrangebunden und setzt sich aus 506 Aminosäuren zusammen. Er kontrolliert den internen Redox-Status mit Hilfe einer FAD-bindenden PAS-Domäne; diese befindet sich im Gegensatz zu DcuS am N-Terminus des Proteins (Campbell *et al.*, 2010). Das NifL- (*nitrogen fixation*) Protein aus *Azotobacter vinelandii* ist eine cytoplasmatische Redox-Sensor-Histidinkinase (354 Aminosäuren) und besitzt zwei PAS-Domänen, PAS1 und PAS2. Die PAS1-Domäne trägt FAD als gebundenen Cofaktor und erkennt so den Redox-Status der Zelle. Die zweite PAS2-Domäne hingegen besitzt keinen Cofaktor und fungiert als zwischengeschaltete signaltransduzierende Domäne des Proteins (Slavny *et al.*, 2010). FixL ist wie NifL eine cytoplasmatische Sensor-

Histidinkinase aus *Bradyrhizobium japonicum*, die für die Regulation der Stickstofffixierung zuständig ist. FixL setzt sich aus 505 Aminosäuren zusammen und besitzt zwei PAS-Domänen, wobei PAS2 einen Häm-Cofaktor besitzt, der Sauerstoff binden kann (Ayers & Moffat, 2008). Das KinA-Protein aus *Bacillus subtilis* ist eine cytoplasmatische Sensor-Histidinkinase aus 606 Aminosäuren, die in die Initiierung der Sporulation involviert ist. KinA besitzt drei PAS-Domänen ohne Cofaktor (Lee *et al.*, 2008).

Der Vergleich der PAS-Domänen zeigt, dass diese sensorische oder signalweiterleitende Funktionen, mit oder ohne Cofaktoren ausüben können. Die Lage der PAS-Domänen kann je nach Protein variieren. Gemeinsamkeiten der PAS-Domänen sind in der charakteristische Tertiärstruktur zu finden, die sich durch alle Reiche des Lebens durchzieht.

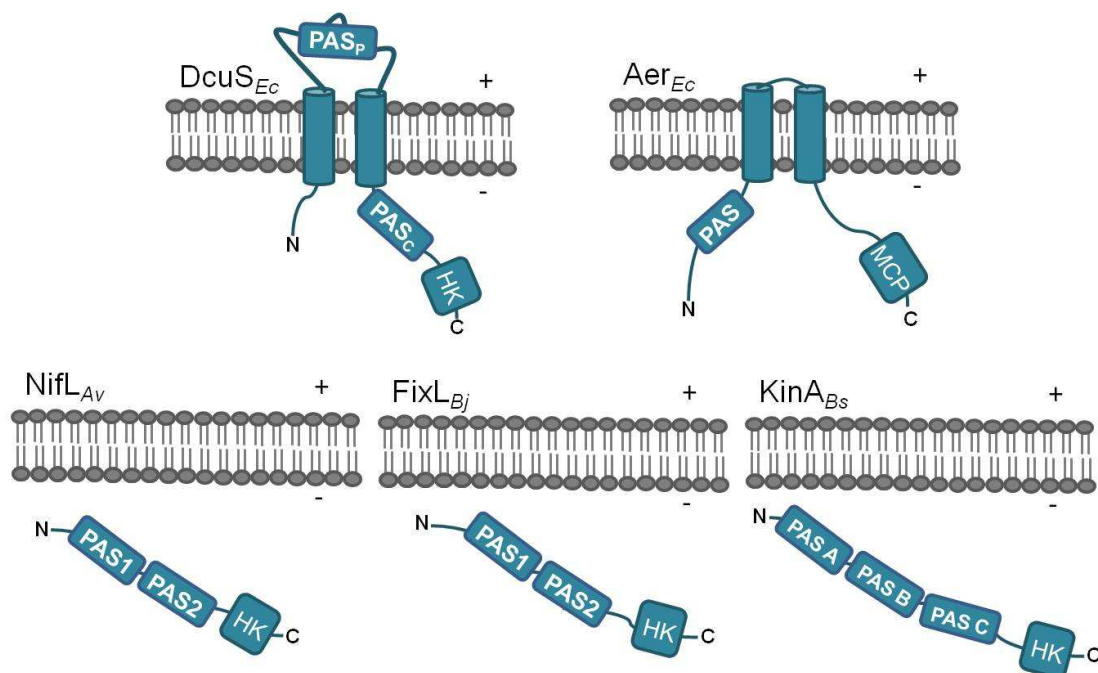


Abb. D3: Lage der PAS-Domänen in DcuS_{Ec}, Aer_{Ec}, NifL_{Av}, FixL_{Bj} und KinA_{Bs}. DcuS_{Ec} und Aer_{Ec} sind membrangebundene Sensoren. DcuS_{Ec} besitzt zwei PAS-Domänen. Eine periplasmatische (PAS_P) und einer cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C). Aer_{Ec} gehört zur MCP-Familie und die anderen vier Proteine sind Sensor-Histidinkinasen. Aer_{Ec} besitzt eine N-terminale FAD-gebundene PAS-Domäne. NifL_{Av}, FixL_{Bj} und KinA_{Bs} sind cytoplasmatische Sensoren. NifL_{Av} besitzt zwei PAS-Domänen, PAS1 und PAS2. Die PAS1-Domäne hat FAD als gebundenen Cofaktor. FixL_{Bj} besitzt zwei PAS-Domänen, wobei PAS2 einen Häm-Cofaktor besitzt. KinA_{Bs} hat drei PAS-Domänen ohne Cofaktor.

5.2 PAS_C ist die signalweiterleitende Domäne

Durch die Identifizierung von funktionell wichtigen Aminosäuren der PAS_C-Domäne wurde die Funktion der cytoplasmatischen PAS-Domäne genauer untersucht. Mittels verschiedener Aminosäuresequenz- und Sekundärstrukturvergleiche konnten interessante Aminosäurereste der PAS_C-Domäne identifiziert und durch gerichtete Mutagenese funktionell

analysiert werden. Die PAS_C-Domäne setzt sich aus 111 Aminosäuren zusammen, davon wurden 48% der Reste mutiert. Insgesamt wurden 70 verschiedene DcuS-Varianten der PAS_C-Domäne generiert. Von den 70 DcuS-Varianten zeigten 47 Varianten einen wildtypischen Phänotyp. Nach Substitution von 16 Resten konnten Veränderungen des Phänotyps festgestellt werden (Abb. D4). Daraus ergaben sich 18 verschiedene ON-Varianten in elf Positionen und 5 OFF-Varianten. Die Varianten wurden nach Vergleich mit wildtypischen DcuS in drei Klassen eingeteilt. Klasse 1 umfasste die ON-Varianten mit sehr starker *dcuB*-Expression bereits in Abwesenheit von Fumarat (> 50 MU). Es wurden fünf ON-Varianten der Klasse 1a zugeordnet: DcuS-L246R, DcuS-N248A, DcuS-N248D, DcuS-N248T und DcuS-N304D, diese zeigten eine fumaratunabhängige *dcuB*-Expression. Die restlichen 13 ON-Varianten der Klasse 1b (DcuS-L228A, -L246A, -N248S, -N248G, -N248F, -D291A, -D291N, -A317D, -S319P, -T320A, -F321A, -R322A) wiesen in Anwesenheit von Fumarat eine starke Stimulierung der *dcuB*-Expression auf, waren jedoch nicht fumaratunabhängig.

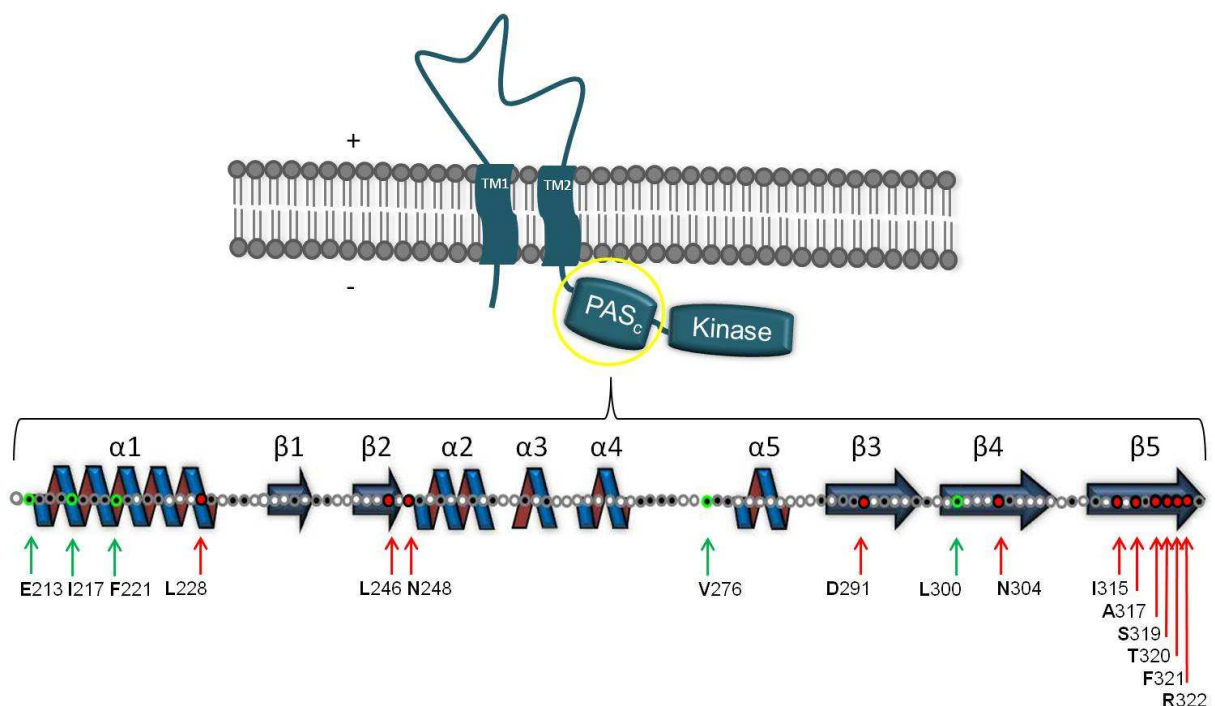


Abb. D4: PAS_C-Sekundärstruktur und Lage der funktionell interessanten Reste in der PAS_C-Domäne. Abgebildet ist die Sekundärstruktur der PAS_C-Domäne von Aminosäure L212 bis D323. Die ON-Varianten sind in Rot, die OFF-Varianten in Grün und die stillen Varianten in Schwarz dargestellt.

OFF-Varianten der Klasse 2 zeigten eine sehr geringe Expression von *dcuB* in An- und Abwesenheit von Fumarat (≤ 50 MU), vergleichbar mit dem *dcuS*-Insertionsstamm IMW260. Stille Varianten der Klasse 3 haben eine wildtypische *dcuB*-Expression, vergleichbar mit DcuS_{Wt} zur Folge. Vier interessante DcuS-Varianten befinden sich in der N-terminalen Kappe (α 1-Helix). Zwei funktionell wichtige ON-Varianten liegen am Anfang des PAS-Kerns.

Im helikalen Linker ist der OFF-Rest V276 lokalisiert, insgesamt acht funktionell interessante Reste liegen im β -Faltblatt-Gerüst.

5.2.1 OFF-Varianten stellen die Kinase ruhig

Die OFF-Varianten sind über die komplette PAS_C -Domäne verteilt und spielen eine wichtige strukturelle Rolle in PAS_C . Drei der fünf OFF-Reste liegen in der $\alpha 1$ -Helix. Die Abb. D5 zeigt die Lage des Restes F221 in der N-terminalen Kappe. Die Vorhersage der Struktur endet bei dieser Aminosäure. Aus diesem Grund sind die anderen beiden Reste E213 und I217 nicht darstellbar. Die drei Reste liegen jeweils vier Aminosäuren voneinander entfernt (Abb. D3). Somit befinden sie sich in der gleichen Orientierung in der Helix. Durch die Substitution einer der Reste wird die Helix möglicherweise in ihrer Struktur gestört und verliert die Fähigkeit um das Signal weiterzuleiten. Die OFF-Variante V276 liegt in einem flexiblen Bereich im helikalen Linker, einem Loop zwischen der $\alpha 4$ -Helix und der $\alpha 5$ -Helix. In diesem Bereich konnten ansonsten nur stille Varianten generiert werden. Dieser flexible Bereich wird in anderen PAS -Domänen als Bindestelle für Cofaktoren (Borgstahl *et al.*, 1998, Gong *et al.*, 1998) oder als Interaktionsstelle für die Kinase beschrieben (Amezcuca *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2006).

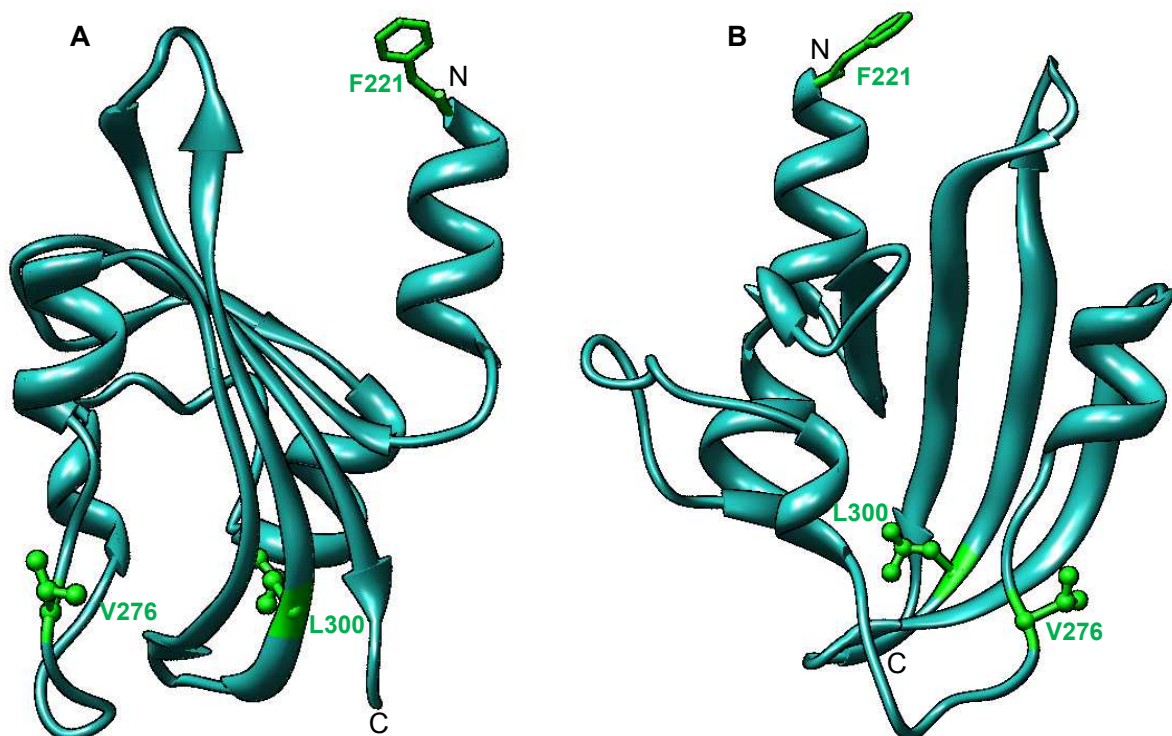


Abb. D5: Lokalisation der OFF-Reste im 3D-Modell von PAS_C . Das Modell wurde mit Swiss-Model erstellt und basiert auf den Koordinaten von PAS_1 von $NifL_{Av}$ (2GJ3; Key *et al.*, 2007). Die 3D-Modelle A und B zeigen ein PAS_C -Monomer aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. In Grün sind drei der fünf OFF-Reste hervorgehoben. Die Reste E213 und I217 können in der Struktur nicht wiedergegeben werden, da sie außerhalb des dargestellten Bereiches liegen.

Die Substitution von V276 gegen Alanin stört vermutlich die Signalweiterleitung an die Kinase. Die OFF-Variante L300A befindet sich im β 4-Faltblatt des β -Faltblatt-Gerüsts. In diesen β -Faltblättern sind ansonsten hauptsächlich ON-Varianten zu finden. Dieser Rest scheint auch eine negative Auswirkung auf die Signalweiterleitung zu haben. Die *in vivo* Crosslinking Experimente und die Fluoreszenz der entsprechenden Fusionsproteine zeigten, dass OFF-Varianten in die Membran eingebaut werden. Somit ist auszuschließen, dass der Aktivitätsverlust der OFF-Varianten durch einen Nichteinbau in die Membran verursacht wird. Man kann festhalten, dass alle OFF-Varianten eine sehr geringe Aktivität zeigen und somit nicht in der Lage sind, das Signal vom Periplasma kommend zur Kinase-Domäne weiterzuleiten. Dies spricht dafür, dass PAS_C durch die OFF-Mutationen in einer starren Konformation vorliegt und somit die Kinase permanent ruhiggestellt wird.

5.2.2 ON-Varianten führen zu einer permanent aktiven Sensorkinase

ON-Mutationen in der PAS_C-Domäne haben einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur und Funktionalität von DcuS. Die ON-Varianten beeinflussen die PAS_C-Struktur und führen wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung und in Folge dessen zu einer permanenten Aktivierung von DcuS. Alle gefundenen ON-Varianten befinden sich in den konservierten Interaktionsregionen am N-Terminus (α 1, β 1, β 2, α 2) und am C-Terminus (β 3, β 4, β 5) der PAS_C-Domäne (Ayers and Moffat, 2008). Die ON-Reste am N- und C-Terminus kennzeichnen somit die Signaleingangs- und Ausgangsregionen in PAS_C. Im 3D-Modell des PAS_C-Monomers (Abb. D6A) sieht man die Verteilung der ON-Reste in der Struktur. Auffällig ist, dass viele Reste zur Mitte des PAS_C-Dimers zeigen (Abb. D6B) und somit an der Dimerisierung der Domäne beteiligt sein könnten. Es ist bekannt, dass Mutationen im β -Faltblatt-Gerüst den N-terminalen Loop verändern können und somit die Struktur des Proteins modifizieren (Pellequer, 1998). Der N-terminale Loop spielt eine entscheidende Rolle in PAS_C. Darauf wird im Folgenden noch eingegangen. Es wurden keine ON-Varianten im Großteil des PAS-Kerns und dem helikalen Linker gefunden. In dieser Region ist in anderen PAS-Domänen, z.B. in Aer_{Ec} der Cofaktor FAD gebunden (Campbell *et al.*, 2010). In anderen Proteinen fungiert dieser helikale Loop als Interaktionsstelle zwischen der PAS-Domäne und der Kinase und reguliert die Struktur und Funktion des Proteins (Yamada *et al.*, 2006). PAS_C bindet keinen Cofaktor (Abo-Amer *et al.*, 2005; Etkorn *et al.*, 2008), und es ist möglich, dass in dieser Region deshalb keine ON-Varianten liegen, sondern die Region ausschließlich der Strukturstabilität dient. In den ON-Varianten DcuS-N248D und DcuS-N304D ist im verkürzten DcuS-PAS_C die Stabilität des Homo-Dimers oder die Dimerisierung gestört. Das zeigt, dass die Reste eine entscheidende Rolle für die Struktur die Signalweiterleitung spielen.

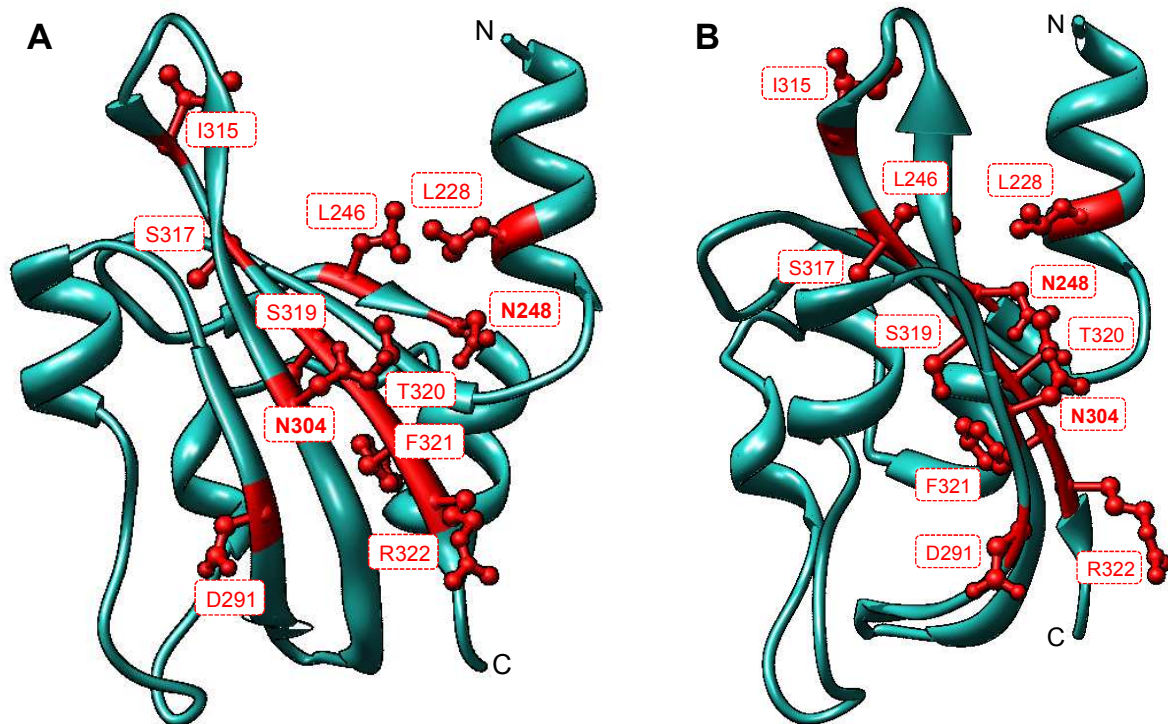


Abb. D6: Lokalisation der ON-Reste im 3D-Modell von PAS_C. Das Modell wurde mit Swiss-Model erstellt und basiert auf den Koordinaten von PAS1 von NifL_{Av} (2GJ3; Key *et al.*, 2007). Die 3D-Modelle A und B zeigen ein PAS_C-Monomer aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. In Rot sind alle ON-Reste hervorgehoben. Fett markiert sind die Reste N248 und N304, die eine fumaratunabhängige Aktivierung zeigen.

In PAS-Domänen gibt es neun sehr gut konservierte Aminosäure-Reste (Taylor & Zhulin, 1999). Der Rest N248 ist durch alle Reiche hinweg der am besten konservierte Rest in PAS-Domänen (Taylor & Zhulin, 1999; Golby *et al.*, 1999). N248 befindet sich in einer unstrukturierten Region im PAS-Kern, ohne definierte Sekundärstruktur zwischen dem β 2-Faltblatt und der α 2-Helix. Die korrespondierenden Reste von N248 in den PAS-Domänen der Sensoren Aer_{Ec} (N34), NifL_{Av} (PAS1-N51; PAS2-N177) und FixL_{Bj} (S170) spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Proteine (Key and Moffat, 2005; Ayers and Moffat, 2008; Campbell *et al.*, 2010, Slavny *et al.*, 2010). Die Substitutionen des Restes N248 gegen verschiedene Aminosäuren haben alle zu einer konstitutiven *dcuB*-Expression geführt. Substitutionen gegen Alanin, Aspartat und Threonin führten zu einer völlig fumaratunabhängigen Expression von *dcuB*.

Die Seitenkette von N248 bildet Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäuren aus (Abb. D7). Laut Etzkorn *et al.* (2008) stabilisiert eine Wasserstoffbrücke zwischen N248 und Q229 die Tertiärstruktur. In einem 3D-Modell lässt sich ein anderes Funktionsmodell vorschlagen. Das Modell wurde mit Swiss-Model basierend auf den Koordinaten von PAS1 von NifL_{Av} erstellt und mit dem Programm Chimera dargestellt. In dem Modell spielt die N-terminale Helix eine wichtige Rolle für die Stabilität der Domäne. Wasserstoffbrücken

zwischen homologen Resten von N248 (N34) und L228 (L14) in Aer_{Ec} (Campbell *et al.*, 2010) stabilisieren den N-terminalen Loop (Pfeil). Dies ergibt den Anschein einer durchgehenden Helix von $\alpha 1$ zu $\alpha 2$ mit 19 dazwischenliegenden Resten, die in Ihrer Struktur ungebrochen, aber in der Sequenz gebrochen scheint. Die Substitution von N34 gegen Aspartat in Aer_{Ec} zerstört die Stabilität der Wasserstoffbrückenbindung zwischen N34 und L14 wodurch die Konformation um die N-terminalen Loop verändert und Aer_{Ec} aktiviert wird. Dieses durchgehende Helix-Motiv ist in der cytoplasmatischen PAS_C -Domäne von DcuS ebenfalls zu finden. Der Rest N248 bildet in diesem Modell mit L228 und vier zusätzlichen Resten G234, V235, V236 und A251 intrinsische Wasserstoffbrückenbindungen aus (Abb. D7B).

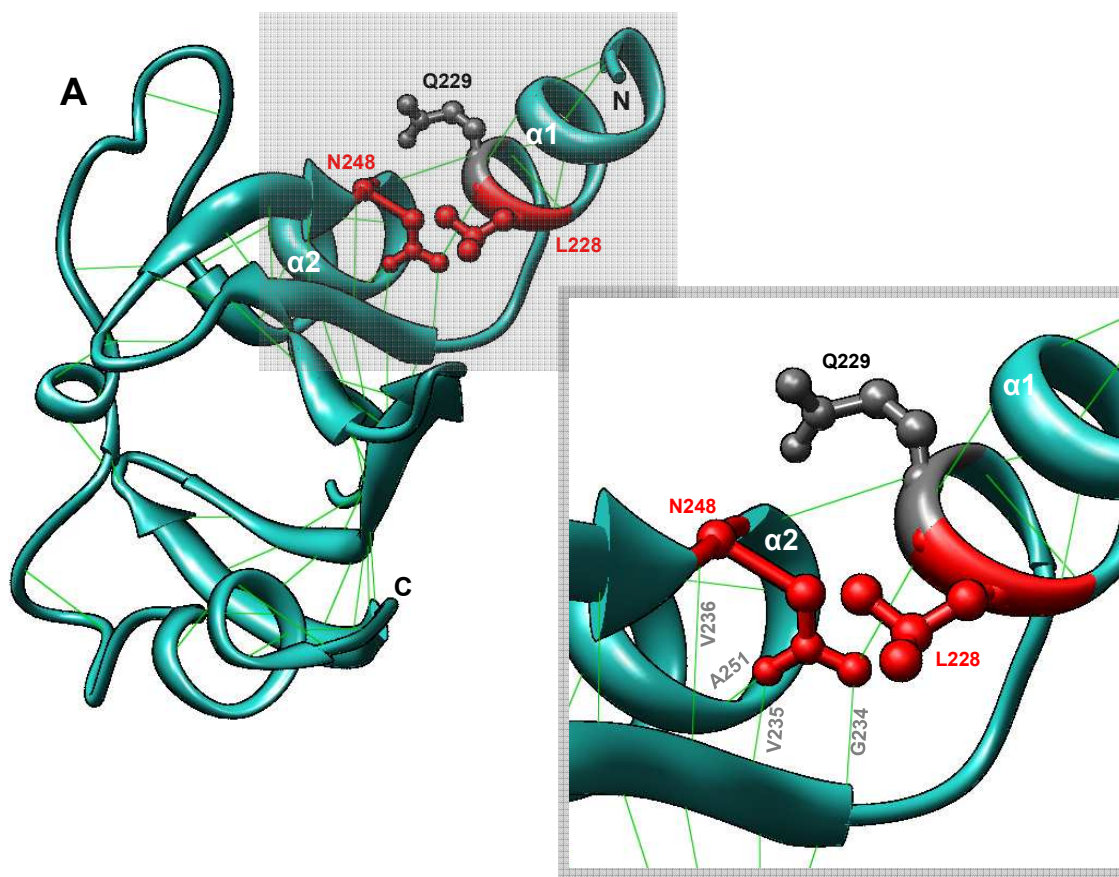


Abb. D7: Wasserstoffbrückenbindung von N248 im 3D-Modell. Das Modell wurde mit Swiss-Model erstellt und basiert auf den Koordinaten von PAS1 von $Nif_{L_{Av}}$ (2GJ3; Key *et al.*, 2007). A) Übersicht der kompletten PAS_C -Domäne. B) Vergrößerung des in der Übersicht grau hinterlegten Bereiches. Das 3D-Modell zeigt die Reste L228, Q229 und N248. Intrinsische Wasserstoffbrücken zwischen homologen Resten von L228 und N248 von Aer_{Ec} stabilisieren den N-terminalen Loop (Pfeil). Dies ergibt den Anschein einer durchgehenden Helix von $\alpha 1$ zu $\alpha 2$ mit 20 dazwischenliegenden Resten

Nach Substitution von N248 gegen Aspartat könnte die Bindungen mit der Aminosäure L228 verloren gehen. Durch die Substitution von N248 wird die Proteinstabilität wahrscheinlich

stark reduziert und es kommt anschließend zu einer permanenten Aktivierung von DcuS und zusätzlichen Erhöhung der Signalstärke. Der N-terminale Loop fungiert wahrscheinlich als eine Art Gelenk und Schaltzentrale, der die Struktur und somit Funktion der PAS_C-Domäne entscheidend beeinflusst. Dabei wird die Kinase nicht mehr ruhiggestellt, woraus eine Autophosphorylierung des konservierten Histidin-Restes resultiert. Somit ist N248 ein zentral wichtiger Rest, der die Struktur und die Funktion von PAS_C beeinflusst und DcuS durch Substitution von N248 gegen andere Aminosäuren in einen fumaratunabhängigen und permanent aktiven Zustand bringen kann und eine Effektorbindung simuliert.

Im Gegensatz zum Rest N248 liegt N304 in der Dimer-Interaktionsregion im β 4-Faltblatt des β -Faltblatt-Gerüsts. Die ON-Variante N304D zeigte eine fumaratunabhängige *dcuB*-Expression. Die Mutationsstelle N304 eines PAS_C-Monomers zeigt enge intermolekulare Nähe zu der Seitenkette des Restes K232 des zweiten PAS_C-Monomers (Abb. D8; Etzkorn *et al.*, 2008). K232 ist in den homologen PAS_C-Domänen nicht konserviert und es sind keine Kristallstrukturdaten eines möglichen Kontakts der beiden Reste hinterlegt. Die Substitution von K232 gegen Alanin resultiert in einer stillen Variante mit stark reduzierter *dcuB*-Aktivität. Der Rest K232 sitzt an einer interessanten Stelle im N-terminalen Loop.

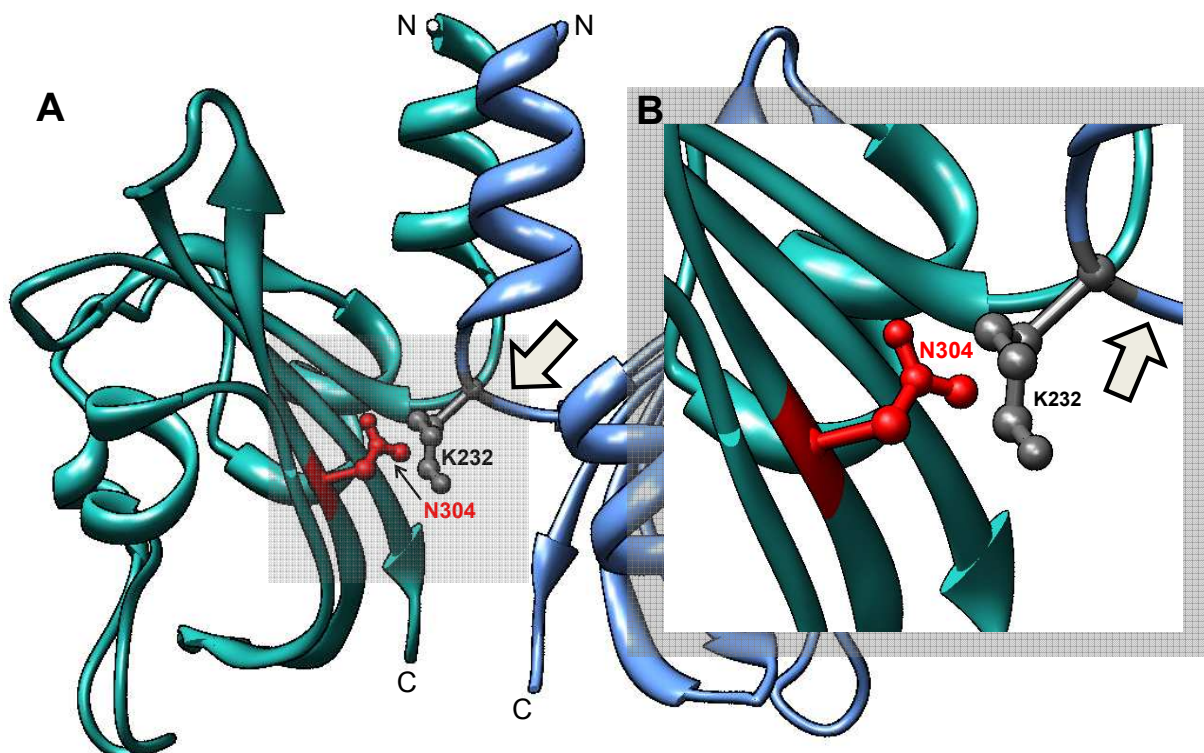


Abb. D8: Interaktion von N304 und K232 im 3D-Modell. Das Modell wurde mit Swiss-Model erstellt und basiert auf den Koordinaten von PAS1 von NifL_{Av} (2GJ3; Key *et al.*, 2007). Die Pfeile markieren den N-terminalen Loop. A) Übersicht des Dimers der kompletten PAS_C-Domäne. B) Vergrößerung des in der Übersicht grau hinterlegten Bereiches. Das 3D-Modell zeigt die intermolekulare Nähe der Reste N304 und K232. Das PAS_C-Monomer 1 ist in Grün und PAS_C-Monomer 2 ist in Blau dargestellt.

Der Loop ist wahrscheinlich mit verantwortlich für die Stabilität der N-terminalen Kappe und der Strukturstabilität von PAS_C. Das ist ein Hinweis, dass sich der Rest K232 an einer wichtigen Position befindet. Somit könnte der ON-Effekt von DcuS-N304D gut durch die intrinsische Interaktion mit der Seitenkette von K232 erklärt werden. Es konnte schon gezeigt werden, dass Mutationen im β -Faltblatt-Gerüst den N-terminalen Loop beeinflussen und verändern können (Pellequer *et al.*, 1998). Die Substitution von N304 gegen Aspartat führte zu einer Instabilität von PAS_C und zu einer permanenten Aktivierung von DcuS. Es ist nicht auszuschließen, dass N304 mit N304 des anderen Monomers oder anderen Resten interagiert und andere Reste in dem β -Faltblatt-Gerüst eine entscheidende Rolle in der Signalweiterleitung spielen. Festzuhalten ist, dass der Rest N304 wichtig ist, da er einen Einfluss auf die Struktur und die Funktion von PAS_C ausübt, ähnlich wie DcuS-N248D.

5.2.3 In Kombination mit ON-Mutation N248D sind OFF-Mutationen der PAS_P- und PAS_C-Domäne wieder aktiv

Die ON-Variante DcuS-N248D zeigt eine fumaratunabhängige *dcuB*-Expression. Die Substitution N248D beeinflusst auch die Funktion anderer Mutationen. Die Funktion dieser Mutation wurde in Kombination mit OFF-Mutationen in PAS_C und PAS_P getestet. In den Kombinationen der OFF-Variante DcuS-N248D-L300A von PAS_C und der OFF-Variante DcuS-N248D-H110A von PAS_P war die ON-Mutation N248D dominant und führte in der Doppelmutante zu einer aktiven Form von DcuS (Abb. D9A+B). Die ON-Mutation N304D zeigte einen ähnlich aktivierenden Effekt auf die PAS_P-Mutation H110A wie N248D (Abb. D9C). In Kombination der PAS_C-Mutationen N248D oder N304D wurden OFF-Varianten wieder aktiv und zeigten eine konstitutive *dcuB*-Expression, die mit Fumarat aber weiter induziert werden konnte. Somit stehen die ON-Mutationen N248D und N304D über den OFF-Mutationen.

Auch die Kombination der beiden ON-Mutationen zeigte weiterhin eine konstitutive Expression von *dcuB*. Der Signal-ON Status von PAS_C scheint in seiner Aktivität weitgehend unabhängig von der Sensordomäne PAS_P zu sein. Allgemein scheinen ON-Varianten in DcuS den höchsten funktionellen Stellenwert einzunehmen. Auch die ON-Variante K55A in PAS_P steht funktionell über OFF-Varianten der PAS_P- und PAS_C-Domäne (Monzel, 2011). Da PAS_C die letzte Domäne vor der Kinase ist, ist sie essentiell für die Regulation und für die Weiterleitung des Signals an die Kinase.

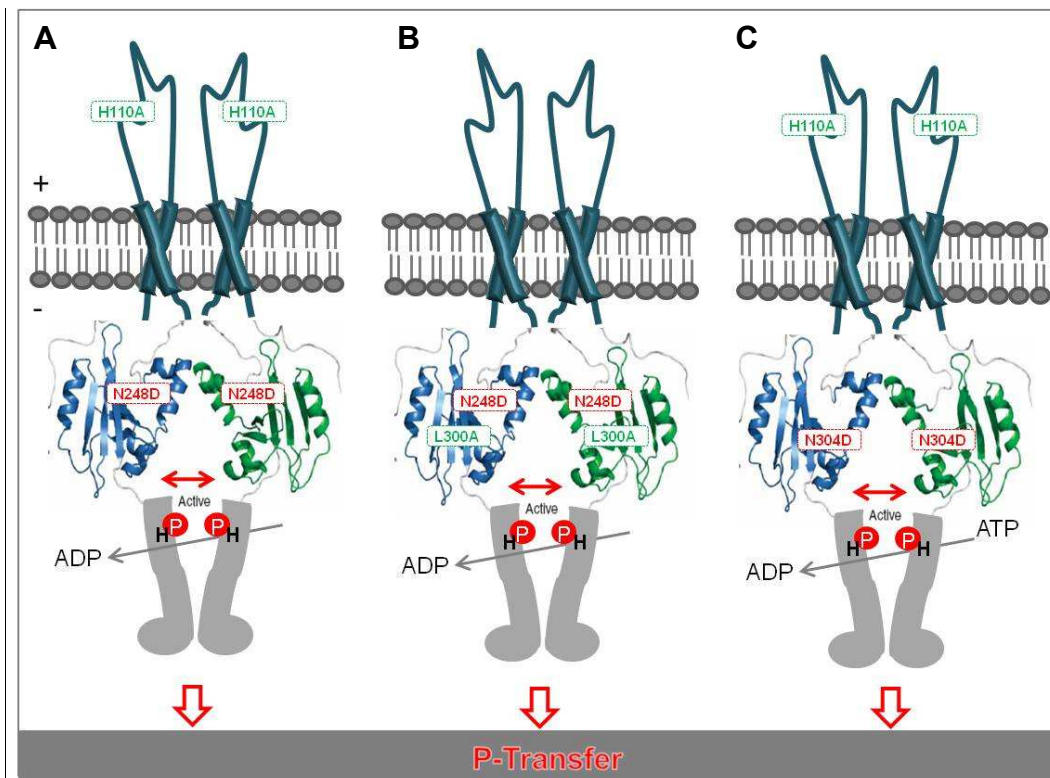


Abb. D9: DcuS-Modell mit Kombinationen von ON-Mutationen der PAS_C-Domäne mit OFF-Mutationen der PAS_C- und PAS_P-Domäne. Alle ON-OFF-Kombinationen führen zu einem Phosphoryl-Transfer zum Responeregulator DcuR und resultieren in einer aktiven Sensorkinase DcuS. Dargestellt ist die PAS_C ON-Mutation N248D in Kombination mit PAS_C OFF-Mutation L300A (A) und PAS_P OFF-Mutation H110A (B). Dargestellt ist die PAS_C ON-Mutation N304D in Kombination mit PAS_P OFF-Mutation H110A (C). ON-Mutationen sind in Rot und OFF-Mutationen sind in Grün dargestellt.

5.2.4 PAS_C spielt eine Rolle für die polare Lokalisation von DcuS in der Membran

Die Lokalisierung von DcuS in der Membran wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. DcuS-YFP zeigt eine polare Akkumulation in *E. coli* (Scheu *et al.*, 2008). Unter Einfluss von Fumarat konnte die Akkumulation an den Zellpolen noch verstärkt werden (Scheu *et al.*, 2008). Die verschiedenen DcuS-Varianten von PAS_C, die hier verwendet wurden, zeigten unterschiedliche Verteilungen von DcuS-YFP in der Zelle. Eine Akkumulation an den Zellpolen, wie bei wildtypischem DcuS-YFP konnte bei stillen und OFF-Varianten von DcuS-YFP beobachtet werden. Die ON-Mutationen N248D und N304D hatten dagegen einen Einfluss auf die Verteilung von DcuS-YFP in der Zelle. Beide ON-Varianten zeigten eine gleichmäßige oder punktuelle Akkumulation in der Membranhülle der Zelle. Ein ähnliches Muster in Interaktion und Lokalisation zeigte die ON-Mutation K55A in PAS_P von DcuS ohne Zusatz eines Effektors (Monzel, 2011).

Die Effektoren Glutarat und Tricarallylat verursachten keine Veränderung der polaren Lokalisation von wildtypischem DcuS-YFP in der Zelle. Fumarat und Malat hingegen hatten

einen Einfluss auf die Verteilung von wildtypischem DcuS-YFP. Auch stille und OFF-Varianten wurden in Anwesenheit von Fumarat von entlang der ganzen Zellmembran verteilt. Fumarat hatte nur auf die ON-Varianten DcuS-N248D-YFP und DcuS-N304D-YFP keinen sichtbaren Effekt. Diese Ergebnisse weichen von publizierten ab (Scheu *et al.*, 2008) und müsste überprüft werden. Die Deletion der PAS_C-Domäne in DcuS verursachte ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung von DcuS-YFP in der Membran. Auch in anderen Proteinen spielt die PAS-Domäne eine wichtige Rolle für die zelluläre Lokalisation (Angelastro *et al.*, 2010; Fukushima *et al.*, 2011) und eine Deletion der PAS-Domäne führte zu einer Verteilung des Proteins in der Membran (Angelastro *et al.*, 2010). Verkürzte DcuS-Varianten ohne Kinase und eine Variante ohne cytoplasmatische PAS_C- und Kinase-Domänen zeigten ebenso einen Verlust der polaren Akkumulation (Scheu, unveröffentlicht).

5.2.5 DcuB hat keinen Einfluss auf ON-Varianten der PAS_C-Domäne

Der sekundäre Transporter DcuB ist der Fumarat/Succinat-Antiporter der Fumaratatmung und wird unter anaeroben Bedingungen exprimiert (Golby *et al.*, 1998; Zientz *et al.*, 1996). DcuB fungiert zusätzlich als Co-Sensor der Sensorkinase DcuS und beeinflusst damit die Expression von *dcuB* und anderen DcuSR-regulierten Genen (Kleefeld *et al.*, 2009). In *dcuB* negativem Hintergrund ist DcuS konstitutiv aktiv und diese Aktivität kann durch C₄-Dicarboxylate nicht weiter gesteigert werden (Kleefeld *et al.*, 2009). In Kombination mit der Deletion von DcuB mit den ON-Mutationen N248D und N304D der PAS_C-Domäne hatte eine um Faktor 2 gesteigerte konstitutive Expression der Zielgene zur Folge. Die Kombination der regulatorischen DcuB-Mutationen mit den ON-Mutationen zeigte das gleiche Expressionsmuster. Sobald DcuS inaktiv vorliegt, erfolgt keine Signalweiterleitung zur Kinase und keine Stimulierung der Zielgene, wie man es bei der OFF-Variante DcuS-V276A sehen kann.

5.3 Die Homo-Dimerisierung von PAS_C

5.3.1 Konservierte Dimer-Interaktionsstellen in PAS-Domänen

Die fünf antiparallelen β -Faltblätter in PAS-Domänen haben eine große Oberfläche, die wichtig für eine Reihe von inter- und intramolekularer Interaktionen diverser PAS-Domänen ist. Das β -Faltblatt-Gerüst und somit die Interaktion der β -Faltblätter beider Monomere spielt eine wichtige Rolle für die Struktur, Funktion und die Signalweiterleitung in vielen PAS-Domänen (Ayers & Moffat, 2008; Lee *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2009; Möglich *et al.*, 2009). Dimere PAS-Domänen besitzen konservierte Dimer-Interaktionsstellen (Ayers & Moffat, 2008). Diese Interaktionsstellen befinden sich in den β -Faltblättern (β 1, β 2, β 4 und β 5) und enthalten fünf konservierte Reste. Diese interagieren entweder mit den β -Faltblättern oder

der N-terminalen Helix des anderen Monomers. In PAS2-FixL_{Bj} interagieren die hydrophoben Reste mit Resten des anderen Monomers. In den meisten Fällen sind die Interaktionsreste hydrophober Natur. Der Vergleich der Interaktionsstellen von PAS2-FixL_{Bj}, PAS1-NifL_{Av}, PAS2-NifL_{Av} und PAS_C-DcuS_{Ec} zeigt, dass mindestens drei von fünf Resten in den vier PAS-Domänen hydrophob sind (Tab. D1). Bei den hydrophilen Resten handelt es sich um ein Tyrosin, ein Threonin oder ein Asparagin. In dem β 1-Faltblatt befinden sich in allen vier PAS-Domänen hydrophobe Aminosäurereste. Die Frage stellt sich nun, welche Auswirkungen Substitutionen der Interaktionsreste auf die Aktivität der Proteine haben und welche Reste wichtig für die Funktion und Struktur des Proteins sind. Die Interaktionsreste von PAS2-FixL_{Bj} und PAS1-NifL_{Av} sind für die Oligomerisierung der PAS-Domänen essentiell. Die untersuchten Reste (V166, L175, L262) von PAS2-NifL_{Av} zeigen, dass drei von fünf Resten „Signal-ON“-Mutanten (NifL-V166M, NifL-L175A, NifL-L262A) darstellen. Diese Mutanten zeigen keine PAS2 Homo-Dimerisierung mehr (Slavny *et al.*, 2010). Die Reste V251 und T264 wurden nicht untersucht.

Tab. D1: Vergleich der Dimer-Interaktionsreste. Dargestellt sind die Reste von PAS2-FixL_{Bj}, PAS1-NifL_{Av}, PAS2-NifL_{Av} und PAS_C-DcuS_{Ec} und die jeweilige Position in den β -Faltblättern. Hydrophobe Aminosäuren sind fett markiert.

	Faltblatt				
	β 1	β 2	β 4	β 5	
PAS2-FixL _{Bj}	Valin158	Leucin167	Methionin241	Threonin250	Phenylalanin252
PAS1-NifL _{Av}	Isoleucin40	Tyrosin49	Valin117	Leucin128	Methionin130
PAS2-NifL _{Av}	Valin166	Leucin175	Valin251	Leucin262	Threonin264
PAS _C -DcuS _{Ec}	Alanin237	Leucin246	Asparagin311	Isoleucin318	Threonin320

In Abb. D10 ist die 3D-Struktur der PAS_C-Domäne von DcuS mit ihren Dimer-Interaktionsresten dargestellt. Die vorhergesagten homologen Dimer-Interaktionsreste von DcuS-PAS_C sind A237, L246, N311, I318 und T320 (Tab. D1). Mutation der Reste L246 und T320 führt zu ON-Varianten (DcuS-L246R und DcuS-T320A). Um sicher zu gehen, ob die beiden Reste für die Dimerisierung in PAS_C wichtig sind, müsste das durch Interaktionsstudien überprüft werden. Der Rest N311 von DcuS liegt in der 3D-Struktur nicht in einem β -Faltblatt, sondern in einem unstrukturierten Bereich zwischen dem β 4- und dem

β 5-Faltblatt. DcuS-Varianten von A237, N311 und I318 zeigen eine wildtypische Aktivität. Die Reste N248 und N304, die bei Substitutionen zu ON-Varianten führen sind keine vorhergesagten Interaktionsstellen, fallen jedoch durch Ihre Lage in PAS_C und ihre konstitutive Aktivität auf. Die ON-Varianten DcuS-N248D und DcuS-N304D zeigten in Interaktionsstudien keine Homo-Dimerisierung mehr. Der Rest N248 liegt in einem unstrukturierten Bereich zwischen β 2-Faltblatt und der α 2-Helix, der Rest N304 zentral im β 4-Faltblatt und somit in der vorhergesagten Dimerisierungsregion. Im 3D-Modell sieht man, dass die Reste in der Nähe der vorhergesagten Interaktionsstelle und auf einer Ebene mit T320 liegen. Beide Reste zeigen mit ihren Seitenketten zur Mitte des Dimers und spielen anscheinend eine wichtige Rolle in der Dimerisierung. Auffällig ist, dass kein Interaktionsrest in β 3-Faltblatt zu finden ist. Möglicherweise liegt das daran, dass das β 3-Faltblatt von der Dimer-Interaktionsfläche abgewandt ist.

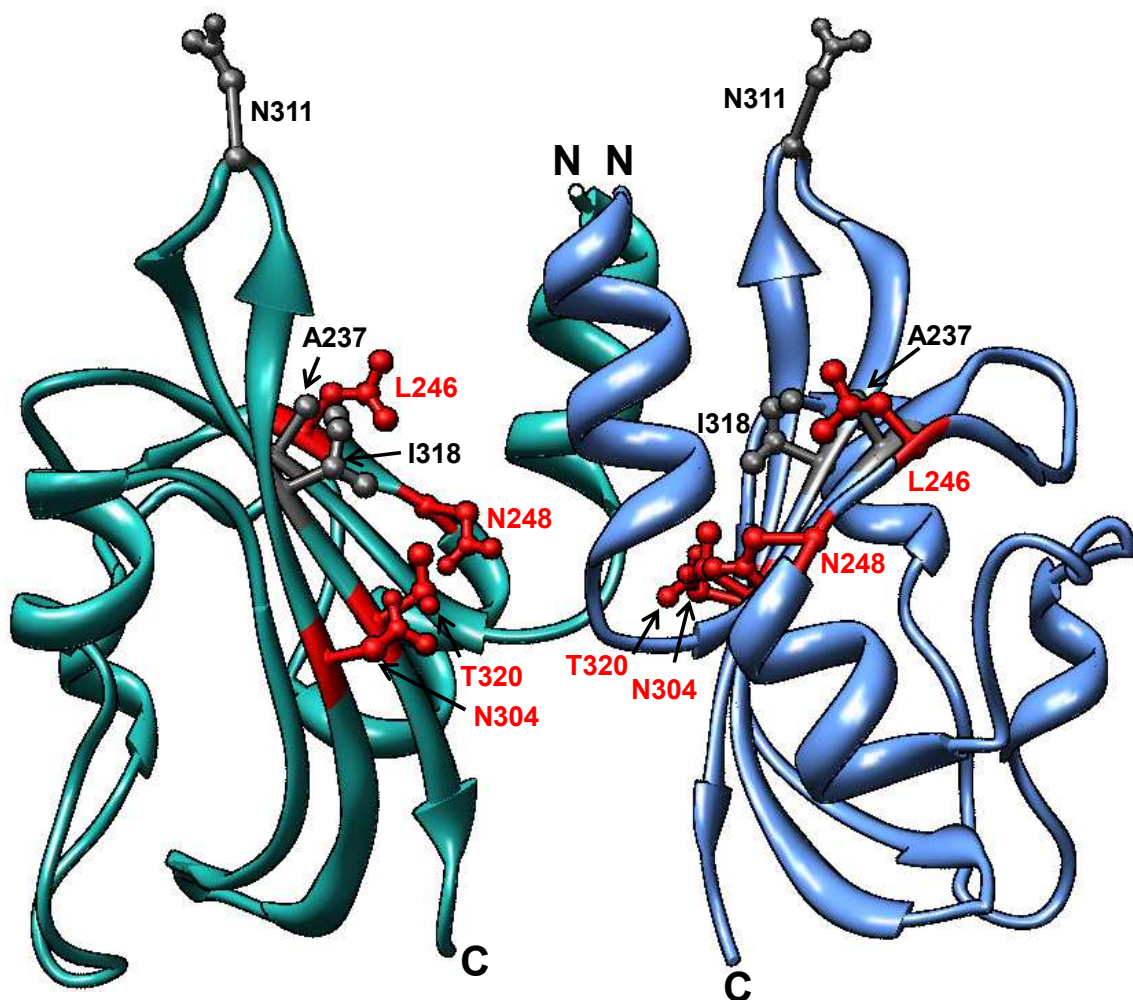


Abb. D10: Vorhergesagte Dimer-Interaktionsreste in PAS_C von DcuS. Das Modell wurde mit Swiss-Model erstellt und basiert auf den Koordinaten von PAS_1 von $Nif_{L_{Av}}$ (2GJ3; Key *et al.*, 2007). Die Dimer-Interaktionsreste A237, L246, N311, I318 und T320 befinden sich hauptsächlich in den β 1-, β 2- und β 5-Faltblättern. ON-Varianten sind Rot und stille Varianten sind Grau hervorgehoben. Das PAS_C -Monomer 1 ist in Grün und PAS_C -Monomer 2 ist in Blau dargestellt.

5.3.2 Die ON-Mutationen N248D und N304D unterbrechen die Homo-Dimerisierung von PAS_C

Bei bakteriellen membrangebundenen Sensor-Histidinkinasen wird vermutet, dass der oligomere Zustand unabhängig vom Effektor besteht (Gao & Stock, 2009). Diese Vermutung konnte 2010 durch Scheu *et al.* für *E. coli* DcuS bestätigt werden. Es wurde zusätzlich postuliert, dass der oligomere Zustand von DcuS einen wichtiger Parameter für die Funktionalität und die Signalweiterleitung ist, denn monomeres DcuS besitzt keine Kinase-Aktivität mehr (Janausch *et al.*, 2002). Die Signalweiterleitung im DcuS-Oligomer wird durch Effektorbindung verursacht und durch Veränderung der Konformation vermittelt (Etzkorn *et al.*, 2008; Kneuper *et al.*, 2010). Untersuchungen zur Oligomerisierung zeigen eine dimere und eine tetramere Form von DcuS (Scheu *et al.*, 2008). Die PAS_P-, PAS_C und die Kinase-Domäne stabilisieren die Oligomerisierung. Auch die Transmembranhelix 2 spielt in der Wechselwirkung zwischen den DcuS-Monomeren eine wichtige Rolle (Steinmetz, 2010). Mutationen in PAS_C haben im Vollängen-DcuS keine erkennbare Auswirkung auf die Oligomerisierung von DcuS. Die ON-Varianten DcuS-N248D und DcuS-N304D und die OFF-Variante DcuS-V276A zeigen den gleichen Oligomerisierungsanteil wie DcuS_{Wt}.

Um mögliche Veränderungen in der Interaktion bzw. Homo-Dimerisierung von PAS_C zwischen DcuS-Varianten zu untersuchen wurde das BACTH-System ausgewählt. Die verkürzten Konstrukte DcuS-TM2 und DcuS-PAS_C zeigen eine signifikante Interaktion. Folglich zeigen Konstrukte ohne PAS_C und Kinase, oder ohne Kinase-Domäne immer noch eine deutliche Interaktion und Dimerisierung, die aber in Anwesenheit der Kinase-Domäne deutlich verstärkt wird. Das isolierte PAS_C-Kinase Konstrukt zeigte eine starke Homo-Dimerisierung, während isoliertes PAS_C und isolierte Kinase alleine keine Dimerisierung und Interaktion mehr zeigt. Anscheinend ist es für die Dimerisierung wichtig, dass die PAS_C-Domäne mit der Kinase-Domäne verbunden ist. Auch die isolierten cytoplasmatischen PAS- und Kinase-Domänen von YycG aus *Bacillus subtilis* liegen vollständig als Monomer vor bzw. zeigen keine Homo-Dimerisierung (Fukushima *et al.*, 2011).

Die Anwesenheit von Effektoren führte in Vollängen-DcuS zu keiner signifikanten Schwächung der Homo-Dimerisierung. Hingegen hatten Fumarat und Malat in allen DcuS-Varianten eine Abnahme der Interaktion zur Folge. Das verkürzte Konstrukt DcuS-PAS_C zeigte mit den Effektoren eine sehr starke Abnahme der Homo-Dimerisierung (Abb. D11B). In Anwesenheit von Effektoren wurde die Interaktion der mutierten Fusionsproteine nicht so stark reduziert wie im Wildtyp. Deutlich ist, dass bei dem verkürzten Konstrukt DcuS-PAS_C ein Fumarat-Effekt sichtbar ist (Abb. D11A). Durch die Substitution N248D verloren Vollängen-DcuS und das verkürzte DcuS-PAS_C Konstrukt Ihre Interaktion. Auch die Substitution N304D zeigte den Verlust der Homo-Dimerisierung im verkürzten DcuS-PAS_C Konstrukt. Somit hatten die Substitutionen N248D und N304D, vergleichbar mit dem Wildtyp

in Anwesenheit der Effektoren, eine Störung oder Verlust der Interaktion der PAS_C-Domäne zur Folge (Abb. D11B). Der ON-Rest N304 befindet sich in der potentiellen Dimer-Interaktionsregion. Möglicherweise führt die Mutation N304D zu einer lokalen, schwachen Konformationsänderung in PAS_C, die einen anderen Effekt auf die Dimerisierung ausübt, jedoch funktionell mit N248D gleichgestellt ist. Es scheint somit nicht zu einem völligen Auseinanderfallen der Domäne wie bei N248D zu kommen, sondern eher zu einer Störung der β -Faltblätter-Interaktion. Möglich ist auch, dass das PAS_C-Dimer von DcuS wie KinA von *Bacillus subtilis* (Lee *et al.*, 2008) und FixL von *Bradyrhizobium japonicum* (Ayers & Moffat, 2008) aufgrund der hohen strukturellen Flexibilität der Domäne in zwei verschiedenen Tertiärstrukturen vorliegen kann. So würden beide Strukturänderungen in PAS_C zu einem Verlust der Interaktion führen.

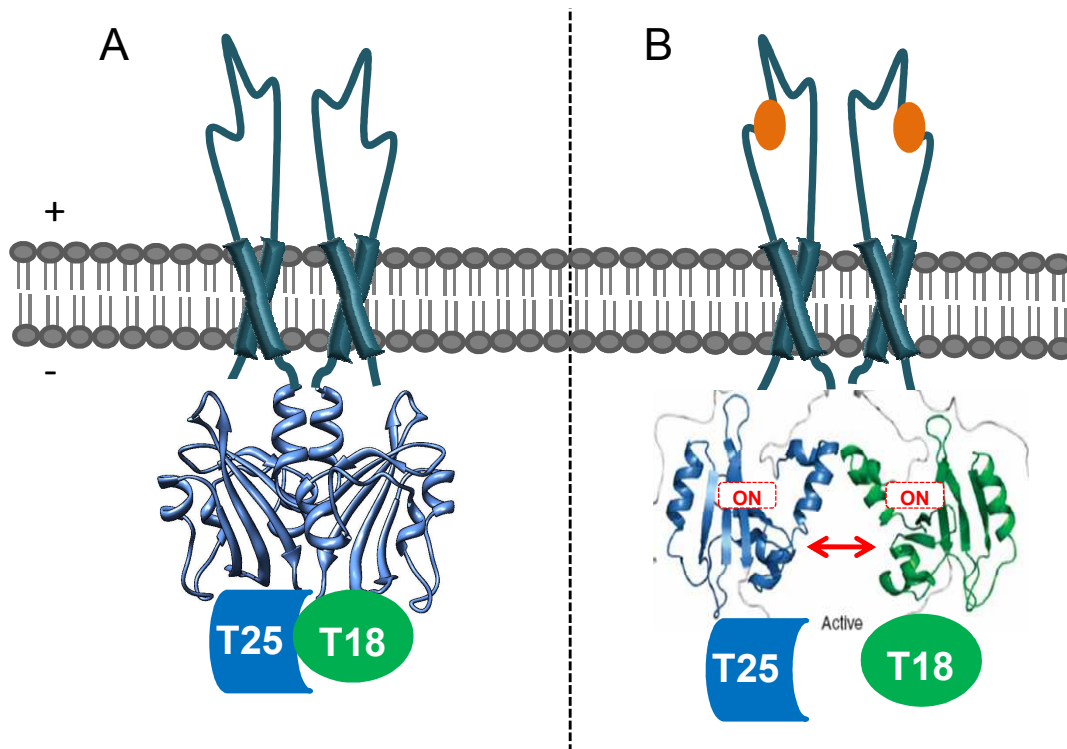


Abb. D11: PAS_C-Dimerisierungsmodell. Dargestellt ist das verkürzte DcuS-PAS_C Konstrukt ohne Kinase-Domäne mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. A) DcuS-PAS_C zeigt Homo-Dimerisierung ohne ON-Mutation (N248D, N304D) oder in Abwesenheit eines Effektors. B) DcuS-PAS_C zeigt keine Homo-Dimerisierung mit ON-Mutation (N248D, N304D) oder in Anwesenheit eines Effektors. Der Effektor ist in orange dargestellt.

5.4 Funktionsmodell von DcuS

Für die Signalweiterleitung in DcuS von PAS_P über die Transmembranhelix 2 zur Kinase-Domäne wird das Kolbenhub-Modell wie für den eng verwandten Citratsensor CitA_{Kp} vorgeschlagen (Sevvana *et al.*, 2008, Kneuper *et al.*, 2010). DcuS kann in zwei

unterschiedlichen Funktionszuständen vorliegen, dem Signal-OFF und dem Signal-ON Zustand (Abb. D12). Ohne gebundenen Effektor in PAS_P wird kein Signal weitergeleitet und PAS_C liegt als Homo-Dimer in einer starren Konformation vor und stellt dadurch die Kinase-Domäne ruhig (Abb. D12A). DcuS liegt somit im Signal-OFF Zustand vor, der auch durch OFF-Mutationen, wie V276A generiert werden kann.

PAS_C ist die letzte Domäne vor der Kinase und scheint somit für die Funktion, Regulation, Lokalisation und Homo-Dimerisierung von DcuS essentiell zu sein, und stellt eine signalweiterleitende, stabilisierende und ruhigstellende Domäne dar.

Ist ein Effektor präsent wird dieser in PAS_P erkannt und gebunden (Abb. D12B). Durch die Effektorbindung kommt es zu einer Bewegung der Transmembranhelix 2 Richtung Periplasma wodurch das Signal über die Membran geleitet wird (Sevvana *et al.*, 2008). Das Signal wird von der cytoplasmatischen PAS-Domäne erkannt. PAS_C erfährt eine Konformationsänderung, wodurch das PAS_C -Dimer wahrscheinlich auseinanderklappt und die PAS_C Homo-Dimerisierung unterbrochen wird (Etzkorn *et al.*, 2008). Durch diese Konformationsänderung wird die Kinase nicht mehr ruhiggestellt und ist somit in einem aktiven Zustand. Es kommt anschließend zu einer Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes (H349) in der Kinase-Domäne (Zientz *et al.*, 1998). DcuS befindet sich nun im Signal-ON Zustand.

Signal-ON Mutationen in DcuS, wie zum Beispiel N248D, führen wahrscheinlich zu einer reduzierten Stabilität und somit zu einer instabilen Konformation von PAS_C , die eine Effektorbindung simuliert. PAS_C liegt nicht mehr als kompaktes Homo-Dimer vor, sondern erfährt eine Aufweitung der Struktur. Das führt in Folge dessen zu einer permanenten Signalweiterleitung an die Kinase. Somit liegt DcuS in einem permanenten Signal-ON Zustand vor und die Kinase Aktivität wird nicht mehr reguliert (Abb. D12C).

Wie die ON-Mutationen führt die Deletion der cytoplasmatischen PAS-Domäne zu einer permanent aktiven DcuS Sensorkinase. Dabei scheint es unwichtig zu sein, ob PAS_C komplett oder nur Teilbereiche deletiert sind. Jede Teildeletion führt wahrscheinlich zu einer Destabilisierung oder inaktivierten PAS_C -Domäne. Ohne stabile PAS_C -Domäne wird die Kinase nicht reguliert und ruhiggestellt und somit erfährt die Kinase eine permanente Autophosphorylierung und der Phosphorylrest wird auf den Responseregulator übertragen, der die Transkription der Zielgene andauernd stimuliert (Abb. D12D). Auch die isolierte Kinase-Domäne kann ohne PAS_C nicht ruhiggestellt werden und zeigt eine konstitutive Aktivität von DcuS. Wohingegen die isolierte PAS_C -Kinase keine Aktivität zeigte, da PAS_C die Kinase wieder reguliert.

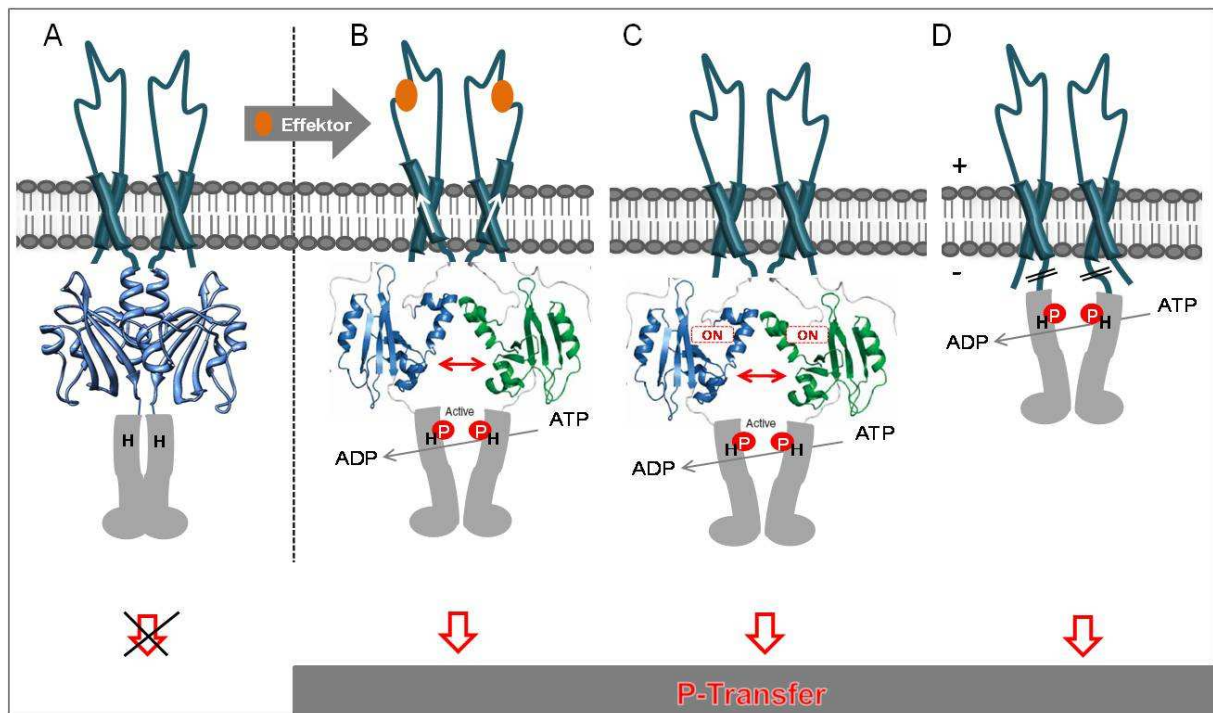


Abb. D12: Modell der Funktionszustände der Sensor-Histidinkinase DcuS (modelliert nach Etzkorn *et al.*, 2008). A) Wildtyp-DcuS ohne Effektor im Signal-OFF Zustand. B) Wildtyp-DcuS mit gebundenem Effektor im Signal-ON Zustand. Die Bindung des Effektors bewirkt vermutlich eine aufwärtsgerichtete Bewegung der Transmembranhelix 2 in Richtung Periplasma. Dies wird von der cytoplasmatischen PAS-Domäne wahrgenommen, welche das Signal an die Kinase-Domäne weiterleitet. Dort kommt es zu einer Autophosphorylierung des konservierten Histidin-Restes (H349) und zum Phosphoryl-Transfer an den Responeregulator. C) ON-Variante von DcuS im permanenten Signal-ON Zustand. D) DcuS ohne PAS_C-Domäne, dabei wird die Kinase nicht reguliert und ruhiggestellt, daraus resultiert eine Autophosphorylierung des konservierten Histidin-Restes und eine permanent aktive Sensorkinase DcuS.

6. Literatur

Angelastro, P.S., Sliusarenko, O., and Jacobs-Wagner, C. (2010)

Polar localization of the CckA histidine kinase and cell cycle periodicity of the essential master regulator CtrA in *Caulobacter crescentus*.

J Bacteriol **192**: 539–552

Abo-Amer, A. E., Munn, J., Jackson, K., Aktas, M., Golby, P., Kelly, D. J. & Andrews, S. C. (2004)

DNA interaction and phosphotransfer of the C₄-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*.

J Bacteriol **186**, 1879–1889

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997)

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Res. **25**, 3389–340

Amezcuca, C. A.; Harper, S. M.; Rutter, J. and Gardner, K. H. (2002)

Structure and Interactions of PAS Kinase N-Terminal PAS-Domain: Model for Intermolecular Kinase Regulation.

Structure, Vol. 1; pp. 1349-1361

Aravind, L., and Ponting, C.P. (1997)

The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins.

Trends Biochem. Sci. **22**, 458–459

Ayers, R.A., and Moffat, K. (2008)

Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains.

Biochemistry **47**, 12078–12086

Bauer, J. (2010)

The C₄-Dicarboxylate Carriers DcuB and DctA of *Escherichia coli*: Function as Cosensors and Topology.

Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Bibikov, S.I., Biran, R., Rudd, K.E., and Parkinson, J.S. (1997)

A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*.

J Bacteriol **179**: 4075–4079

Bradford, M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.

Anal. Biochem. **72**:248–254

Borgstahl, G. E. O.; Williams, D. R.; Getzoff, E. D. (1995)

1,4 Å structure of photoactive yellow protein, acytosolic rezeptor, unusual fold, active side, and chromophore.

Biochem. **34**, 6278-6287

Bott, M., M. Meyer und P. Dimroth (1995)

Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*.

Molecular Microbiology, **18**(3):533–546. PMID: 8748036

- Budler, R.; Gessner, C. R.; Sheng, L.; Tyndall, S.; Getzoff, E. D.; Woods, V. L. Jr (2006)**
PAS Domain Allostery an Light-induced Conformational Changes in Photoactive Yellow Protein upon I2 Intermediate Formation, Probed with Enhanced Hydrogen/Deuterium. Exchange Mass Spectrometry
J. Mol. Biol. ; 363, 148-160
- Cadwell RC, Joyce GF (1992)**
Randomization of genes by PCR mutagenesis.
PCR Methods Appl. Aug;2(1):28-33
- Campbell, A. J.; Watts, K. J.; Johnson M. S. and Taylor B. L. (2010)**
Gain-of-function mutations cluster in distinct regions associated with the signalling pathway in the PAS domain of the aerotaxis receptor Aer
Molecular Microbiology, 1365-2958.2010.07231
- Card, P.B., Erbel, P.J., and Gardner, K.H. (2005)**
Structural basis of ARNT PAS-B dimerization: use of a common beta-sheet interface for hetero- and homodimerization.
J. Mol. Biol. 353, 664–677
- Chapman-Smith, a.; Lutwyche, J. K. and Whitelaw, M. L. (2003)**
Contribution of the Per/Arnth/Sim (PAS) Domains to DNA Binding by the Basic Helix-Loop-Helix PAS Transcriptional Regulators.
J. of Bact. Chem., Vol. 279, pp. 5353-5362
- Cheung, J. H., and W. A. Hendrickson (2008)**
Crystal structures of C₄-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB.
J. Biol. Chem. 283:30256–30265
- Crosson, S., and Moffat, K. (2001)**
Structure of a flavinbinding plant photoreceptor domain: insights into lightmediated signal transduction.
Proc Natl Acad Sci USA 98: 2995–3000
- de Groot, H.J.M. (2000)**
Solid-state NMR spectroscopy applied to membrane proteins
Curr. Op. Struct. Biol. 10: 593-600
- Davies, S. J.; Golby, P.; Omrani, D.; Broad, S. A.; Harrington, V. L.; Guest, J. R.; Kelly, D. J. and Andrews, S.C. (1999)**
Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 181: 5624-5635
- Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale (1988)**
High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation.
Nucleic Acids Res. 16:6127–6145
- Engel, P., Krämer, R. & Unden, G. (1994)**
Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*: Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux
Eur. J. Biochem. 222: 605 - 614

Etzkorn, M. K., P. Dünwald, V. Vijayan, J. Krämer, C. Griesinger, S. Becker, G. Uden, and M. Baldus (2008)

Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS.

Nat. Struct. Mol. Biol. 15:1031–1039

Farinha, M. A.; Kropinski, A. M. (1990)

High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions.

FEMS Microbiol. Lett. 58: 221-225

Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., et al. (2006)

Pfam: clans, web tools and services.

Nucleic Acids Res. 34, D247–D251

Froger A. & Hall J. E. (2007)

Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method.

J Vis Exp. (6):253..

Gao, R., and A. M. Stock (2009)

Biological insights from structures of two component proteins.

Annu. Rev. Microbiol. 63:133–154

Getzoff, E. D.; Gutwin K. N. & Genick U. K. (2003)

Anticipatory active-site motions and chromophore distortion prime photoreceptor PYP for light activation

Nature Structural & Molecular Biology 10, 663 - 668

Goh E.B.; Bledsoe P.J.; Chen L.L.; Gyaneshwar P.; Stewart, V. and Igo, M.M. (2005)

Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system.

J. Bacteriol. 187: 4890-4899

Golby, P.; Kelly, D.J. Guest, J.R. & Andrews, S.C. (1998)

Transcriptional regulation and organisation of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 180(24): 6586 - 6596

Golby, P., Davies, S., Kelly, D. J., Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1999)

Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol 181, 1238–1248

Gong, W.; Hao, B., Mansy, S.S.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.A.; Chan, M.K. (1998)

Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15177–82

Gu, Y.-Z.; Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. (2000)

THE PAS SUPERFAMILY: Sensors of Environmental and Developmental Signals.

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.; 40:519-561

Gunsalus R.P. (1992)

Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes.

J Bacteriol. 1992 Nov;174(22):7069-74

Gunsalus R.P. & Park S.J. (1994)

Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons *Res. Mikrobiol.* 145: 437-50

Gutowski, S.J., Rosenberg, H. (1975)

Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K-12.

J. Biochem. 152: 647 – 654

Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson und J. Beckwith (1995)

Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.

Journal of Bacteriology, 177(14):4121–4130. PMID: 7608087

Hefti, H. M., Franc, K.-J., Vries de, C. S., Dixon, R., Vervoort, J. (2004)

A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction.

Eur. J. Biochem. 271, 1198–1208

Holloway, P.W. (1973)

A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples.

Anal. Biochem. 53: 304-308

Iuchi, S. and Lin, E. C. C. (1988)

arcA (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways.

Proc Natl Acad Sci USA 85:1888-1892

Iuchi, S., Cameron, D.C. and Lin, E.C.C. (1989)

A second global regulatory gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 171: 868-873

Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I. & Unden, G. (2002a)

Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase *in vitro*.

J. Biol Chem 277, 39809–39814

Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A. & Unden, G. (2002b)

C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria.

Biochim Biophys Acta 1553, 39–56

Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I., Lehnen, D., Zeuner, Y. & Unden, G. (2004)

Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*.

Microbiology 150, 877–883

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., Ladant, D. (1998)

A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 95, H. 10, S. 5752–5756

Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L. and Bott, M. (1999)

The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor.

Mol. Microbiol. 33: 858-872.

Key, J., and Moffat, K. (2005)

Crystal structures of deoxy and CO-bound bJFixLH reveal details of ligand recognition and signaling.

Biochemistry 44, 4627–4635

Key, J., Hefti, M., Purcell, E.B., and Moffat, K. (2007)

Structure of the redox sensor domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism.

Biochemistry 46, 3614–3623

Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J. Krämer, J. & Uden, G. (2009)

The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression.

J. Biol. Chem. 284:265-275

Kneuper, H., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C. & Uden, G. (2005)

The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*.

J. Biol Chem 280, 20596–20603

Kneuper H., Scheu P., Etkorn M., Sevana M., Dünwald P., Becker S., Baldus M., Griesinger C., Uden G. (2010)

Sensing ligands by periplasmic sensing histidine kinases with sensory PAS domains.

Buch: Sensory Mechanisms in Bacteria, Molecular Aspects of Signal Recognition, Caister Academic Press 09/2010, Capter 2, edited by Stephen Spiro and Ray Dixon

Krämer, J. (2004)

Die Funktion der periplasmatischen Domäne des C₄-Dicarboxylat-Sensors DcuS von *Escherichia coli*.

Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Krämer, J. (2008)

Der C₄-Dicarboxylat- und Citratsensor DcuS aus *Escherichia coli* -Signalerkennung und Regulation.

Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Deutsche Nationalbibliothek.

Krämer, J., Fischer, J. D., Zientz, E., Vijayan, V., Griesinger, C., Lupas, A. & Uden, G. (2007)

Citrate sensing by the C₄-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: binding site and conversion of DcuS to a C₄-dicarboxylate- or citrate-specific sensor.

J. Bacteriol 189, 4290–4298

Lee, J., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Machius, M., Kort, R., Hellingwerf, K.J., and Gardner, K.H. (2008)

Changes at the KinA PAS-A dimerization interface influence histidine kinase function.

Biochemistry 47, 4051–4064

Ma, X., Sayed, N., Baskaran, P., Beuve, A., and van den Akker, F. (2008)

PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase crystal structure.

J. Biol. Chem. 283, 1167–1178

Marina, A., C. D. Waldburger, and W. A. Hendrickson (2005)

Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein.

EMBO J. 24:4247–4259.

Mascher, T., Helmann, J. D. & Uden, G. (2006)

Stimulus perception in bacterial signal transducing histidine kinases.

Microbiol Mol Biol Rev 70, 910–938

Miller, J. H. (1992)

A Short Course in Bacterial Genetics.

Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory

Miroux, B. and Walker, J. E. (1996)

Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.

J. Mol. Biol. 260, 289-298

Miyatake, H., Mukai, M., Park, S.Y., Adachi, S., Tamura, K., Nakamura, H., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T., and Shiro, Y. (2000)

Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies.

J. Mol. Biol. 301,415–431

Mizuno, T. (1997)

Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*.

DNA Res. 4:161-168

Mullis, K. B., Farone, F. A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986)

Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273

Müllner, M., O. Hammel, B. Mienert, S. Schlag, E. Bill, and G. Uden (2008)

A PAS domain with an oxygen labile $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*.

Biochemistry 47:13921-13932

Monzel C. (2011)

Die periplasmatische Domäne der Sensor-Histidinkinase DcuS von *Escherichia coli*.

Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Deutsche Nationalbibliothek.

Morais Cabral, J.H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B.T., Li, M., and Mackinnon, R. (1998)

Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain.

Cell 95: 649–655

Möglich, A., Ayers, R.A., and Moffat, K. (2009)

Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases.

J Mol Biol 385: 1433–1444

Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., Jr., and Crews, S.T. (1991)

The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development.

Cell 67, 1157–1167

Ottemann, K. M., W. Xiao, Y.-K. Shin und K. D. E. Jr. (1999)

A Piston Model for Transmembrane Signaling of the Aspartate Receptor.

Science, 285(5434):1751–1754. PMID: 10481014

Ormö, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (1996)

Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.

Science 273: 1392-1395

Pandini, A. & Bonati, L. (2005)

Conservation and specialization in PAS domain dynamics

Protein Engineering Design & Selection; Vol. 18, pp. 127-137

Pappalardo, L., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Unden, G. & Griesinger, C. (2003)

The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*.

J. Biol Chem 278, 39185–39188

Paternostre, M.-T., Roux, M. and Rigaud, J.-L. (1988)

Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate.

Biochemistry 27:2668-2677

Parkinson, J. S. (1993)

Signal Transduction Schemes of Bacteria.

Cell, 73:857–871. PMID: 8098993

Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A., and Getzoff, E.D. (1998)

Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily.

Proc Natl Acad Sci USA 95: 5884–5890

Rabin, R. S. und V. Stewart (1993)

Dual Response Regulators (NarL and NarP) Interact with Dual Sensors (NarX and NarQ) to Control Nitrate- and Nitrite-Regulated Gene Expression in *Escherichia coli* K-12 .

Journal of Bacteriology, 175(11):3259–3268. PMID: 8501030

Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., Fletcher, H.M., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (1997)

The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transducer oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior.

Proc Natl Acad Sci USA 94: 10541–10546

Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., Madden, D. R. (2003)

The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain.

J. Biol. Chem. 278:39189-96

Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J.O., Zhulin, I.B., and Taylor, B.L. (2000)

PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*.

Mol Microbiol 36: 806–816

Rigaud, J.-L., Paternostre, M.-T. and Bluzat, A. (1988)

Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin

Biochemistry 2:2677-2688

Rigaud, J.-L., Pitard, B. and Levy, D. (1995)

Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energytransducing membrane proteins

Biochim. Biophys. Acta 1231:223-246

Paternostre, M.-T., Roux, M. and Rigaud, J.-L. (1988)

Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate.

Biochemistry 27:2668-2677

Ponting, C.P., and Aravind, L. (1997)

PAS: a multifunctional domain family comes to light.

Curr. Biol. 7, R674–R677

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001)

Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn.

Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory

Scheu, P., S. Sdorra, Y. F. Liao, M. Wegner, T. Basché, G. Uden, and W. Erker (2008)

Polar accumulation of the metabolic sensory histidine kinases DcuS and CitA in *Escherichia coli*.

Microbiology 154:2463–2472

Scheu, P. D, Liao, Y.-F; Bauer, J, Kneuper, H, Basche, T, Uden, G, Erker, W (2010a)

Oligomeric Sensor Kinase DcuS in the Membrane of *Escherichia coli* and in

Proteoliposomes: Chemical Cross-linking and FRET Spectroscopy.

Journal of Bacteriology 192 (13), S. 3474–3483.

Scheu, Patrick D; Kim, Ok Bin; Griesinger, Christian; Uden, Gottfried (2010b)

Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C₄-dicarboxylates in bacteria.

Future Microbiology 5 (9), S. 1383–1402

Scheu, P. D.; Witan, J.; Rauschmeier, M.; Liao, Y.-F.; Ebert-Jung, A.; Basché, T.; Erker, W.; Uden G. (2011)

The CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*

eingereicht

- Sevvana, M., V. Vijayan, M. Zweckstetter, S. Reinelt, D. R. Madden, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick, M. Bott, C. Griesinger, and S. Becker (2008)**
A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA.
- Silhavy, T. J., M. L. Berman und L. W. Enquist (1984)**
Experiments with gene fusions.
Cold Spring Harbor Laboratory. *J. Mol. Biol.* 377:512–523
- Shaw, D.J. and Guest, J.R. (1982)**
Nucleotide sequence of the *fnr* gene and primary structure of the Fnr protein of *Escherichia coli*
Nucl. Acids Res. 10: 6119-6230
- Six, S., Andrews, S. C., Uden, G. & Guest, J. R. (1994)**
Escherichia coli possesses two homologous anaerobic C₄-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct).
J. Bacteriol. 176: 6470-6478
- Slavny, P.; Little, R.; Salinas, P.; T. A. Clarke and R. Dixon (2010)**
Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein.
Molecular Microbiology 75(1), 61–75
- Steinmetz, P. A. (2010)**
Die Transmembrandomäne des C₄-Dicarboxylat-Sensors DcuS aus *Escherichia coli*.
Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Stewart, V. (1993)**
Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*
Mol. Microbiol. 9: 425-434
- Stewart, V. and Rabin, R.S. (1995)**
Dual sensors and dual response regulators interact to control nitrate and nitriteresponsive gene expression in *Escherichia coli*
In: Two component signal transduction, Hoch JA and Silhavy TJ(eds.), ASM Press, Washington DC, pp233-252
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986)**
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J. Mol. Biol. 189: 113-130
- Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000)**
Two-component signal transduction
Annu. Rev. Biochem. 69: 183-215
- Szurmant, H., R. A. White, and J. A. Hoch (2007)**
Sensor complexes regulating two-component signal transduction.
Curr. Opin. Struct. Biol. 17:706–715
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999)**
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 479–506

Unden, G & Bongaerts, J. (1997)

Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors.
Biochim. Biophys. Acta 1320 (3), S. 217–234

Unden, G. und P. Dünwald (2008)

The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics. In: Böck, A., R. Curtiss III, J. Kaper, P. Karp, F. Neidhardt, T. Nyström, J. Slauch, C. Squires und D. Ussery, Hrsg.: *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Kap. 3.2.2. ASM Press, Washington D.C.

Unden, G. & Kleefeld, A. (2004)

C₄-dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. Module 3.4.5 In R. Curtiss III (Editor in Chief), EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology

Vreede, J.; van der Horst, M. A.; Hellingwerf, K. J.; Crielaard, W. and van Aalten, D. M .F. (2003)

PAS Domains: Common Structure and Common Flexibility
Journal of Biolog. Chem., Vol.278; pp. 18434-18439

West, A. H., and A. M. Stock (2001)

Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems.
Trends Biochem. Sci. 26:369-376

Yamada, S.; Sugimoto, H.; Kobayashi, M.; Ohno, A.; Nakamura, H.; Shiro Y. (2009)

Structure of PAS-Linked Histidine Kinase and the Response Regulator Complex
CellPress Structure 17, 1333–1344

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985)

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene 33:103-119

Zientz, E., Six, S. and Unden, G. (1996)

Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C₄-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange.
J. Bacteriol. 178: 7241-7247

Zhulin, I.B., Taylor, B.L., and Dixon, R. (1997)

PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. or modified chromophores.
Trends Biol. Sci. 22, 331–333

Zientz, E., Bongaerts, J. & Unden, G. (1998)

Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system.
J. Bacteriol 180, 5421–5425

Zientz, E., Janausch, I. G., Six, S. and Unden, G. (1999)

Function of DcuC as the C₄-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 181: 3716–3720

7. Anhang

Tab. A1: Effekt von DcuS-Varianten auf die Fumarat-abhängige Induktion von *dcuB*'-*lacZ*. Der Funktionszustand der DcuS-Varianten wurde in dem *DcuS* negativen *E. coli* Stamm IMW260 nach Komplementation mit Plasmid-kodierten Varianten durch die Expression von *dcuB*'-*lacZ* [MU] nachgewiesen. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, mit und ohne Fumarat (20 mM) als Effektor. In Grau hervorgehoben sind PAS_P-Varianten nach Kneuper *et al.* (2005) und Krämer *et al.* (2007).

Domäne	IMW260 (<i>DcuS</i>)		<i>dcuB</i> '- <i>lacZ</i> [MU]	
	Plasmid	Protein	ohne Effektor	+ Fumarat
	-	DcuS-	6 ±4	11 ±3
	pMW181	DcuS	46 ±4	395 ±96
N-Terminus				
	pMW854	DcuS-T20A	7 ±1	186 ±16
	pMW864	DcuS-I22V	20±5	210±25
TM1				
	pMW776	DcuS-M24A	40 ±10	300 ±10
	pMW777	DcuS-S26A	25 ±10	259 ±10
OFF-Variante	pMW870	DcuS-S26R	11 ±7	34 ±6
	pMW849	DcuS-A27C, S31A	14 ±1	138 ±16
PAS_P				
	pMW771	DcuS-Q83A	3 ±1	214 ±24
	pMW114	DcuS-R90A	23 ±1	292 ±13
	pMW869	DcuS-R92H	5 ±1	227 ±17
	pMW871	DcuS-L96Q	4 ±1	153 ±6
	pMW790	DcuS-V99A	8 ±5	291 ±46
OFF-Variante	pMW343	DcuS-R107A	1 ±nb	7 ±nb
OFF-Variante	pMW318	DcuS-H110A	2 ±3	6 ±2
	pMW772	DcuS-P111A	5 ±1	174 ±8
OFF-Variante	pMW319	DcuS-F120M	5 ±nb	5 ±nb
	pMW773	DcuS-D124A	4 ±0	267 ±27
OFF-Variante	pMW866	DcuS-D124V	3 ±1	5 ±1
	pMW872	DcuS-I125T	5 ±1	128 ±25
	pMW962	DcuS-I125F	9±1	101±1
	pMW791	DcuS-N130A	13 ±1	273 ±14







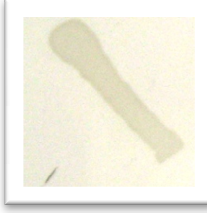

	pMW792	DcuS-N130D	9 ±0	330 ±47
	pMW774	DcuS-E133A	5 ±1	300 ±8
OFF-Variante	pMW818	DcuS-G140	2 ±1	12 ±1
	pMW793	DcuS-A145D	10 ±3	366 ±13
OFF-Variante	pMW237	DcuS-R147A	1 ±nb	17 ±nb
	pMW873	DcuS-N156D	10 ±1	243 ±7
OFF-Variante	pMW351	DcuS-T101G, F120M	3 ±nb	2 ±nb
TM2				
	pMW850	DcuS-S186A	54 ±10	184 ±10
	pMW827	DcuS-S186C	4 ±1	133 ±11
	pMW779	DcuS-F189A	9 ±2	141 ±4
	pMW819	DcuS-G190A	9 ±2	188 ±7
	pMW851	DcuS-M191A	7 ±1	151 ±17
	pMW962	DcuS-V193A	11 ±1	104 ±13
	pMW841	DcuS-G194A	5 ±2	135 ±13
	pMW778	DcuS-L201A	45 ±5	290 ±15
	pMW852	DcuS-W185A, F189A	17 ±6	285 ±15
OFF-Variante	pMW809	DcuS-S186C, G190A	9 ±1	40 ±8
OFF-Variante	pMW813	DcuS-G190A, G194A	14 ±4	60 ±8
	pMW853	DcuS-G194A, T198A	1 ±0	180 ±7
PAS_c				
OFF-Variante	pMW936	DcuS-E213A	13 ±2	24 ±2
	pMW937	DcuS-P214A	11 ±3	153 ± 14
	pMW631	DcuS-Y215A	9 ±2	68 ±7
	pMW928	DcuS-E216A	9 ±1	219 ±16
OFF-Variante	pMW939	DcuS-I217A	9 ±3	29 ±1
	pMW956	DcuS-S218A	8 ±1	220 ±2
	pMW957	DcuS-T219A	10 ±1	452 ±2
	pMW940	DcuS-L220A	13 ±1	230 ±23
OFF-Variante	pMW941	DcuS-F221A	8 ±6	9 ±6
	pMW942	DcuS-E222A	35 ±2	515 ±6
	pMW1303	DcuS-R224A	9 ±2	395 ± 55
	pMW943	DcuS-Q225A	7 ±2	449 ± 21
ON-Variante	pMW913	DcuS-L228A	209 ±36	448 ±36
	pMW632	DcuS-Q229A	20 ±6	317 ±61
	pMW868	DcuS-I231T	31 ±7	403 ±69















OFF-Variante	pMW633	DcuS-K232A	11 ±2	51 ±9
	pMW924	DcuS-A237C	23 ±8	605 ±65
	pMW420	DcuS-D239N	18 ±6	208 ±77
	pMW874	DcuS-D239G	7 ±1	165 ±10
	pMW634	DcuS-D240A	18 ±7	162 ±25
	pMW921	DcuS-L246A	51±9	670 ±59
ON-Variante	pMW920	DcuS-L246R	631 ±65	741 ±69
ON-Variante	pMW485	DcuS-N248A	815 ±20	544 ±12
ON-Variante	pMW421	DcuS-N248D	674 ±25	503 ±22
ON-Variante	pMW483	DcuS-N248S	106 ±22	529 ±14
ON-Variante	pMW484	DcuS-N248G	789 ±25	470 ±87
ON-Variante	pMW486	DcuS-N248F	169 ±6	555 ±107
ON-Variante	pMW926	DcuS-N248T	400 ±23	384 ±63
	pMW944	DcuS-D249A	2 ±1	229 ±28
	pMW474	DcuS-A251C	26 ±8	364 ±20
	pMW489	DcuS-L254T	37 ±8	450 ±81
	pMW810	DcuS-N256A	21 ±6	627 ±70
	pMW811	DcuS-N256D	21 ±6	518 ±66
	pMW422	DcuS-K259A	15 ±4	242 ±60
	pMW482	DcuS-Q261A	17 ±6	312 ±11
	pMW480	DcuS-S270A	17 ±3	266 ±35
	pMW812	DcuS-H271A	22 ±5	419 ±96
	pMW958	DcuS-S272A	10 ±1	281 ±6
	pMW481	DcuS-W273A	36 ±2	698 ±218
	pMW816	DcuS-S274A, V277A	27 ±1	277±52
OFF-Variante	pMW667	DcuS-V276A	21 ±16	20 ±11
	pMW668	DcuS-V276D	23 ±1	140 ±10
	pMW669	DcuS-V276C	12 ±1	110 ±13
	pMW816	DcuS-V277A	15 ±4	290 ±30
	pMW965	DcuS-D278G	12 ±2	120 ±1
	pMW475	DcuS-T287A	4 ±2	434 ±80
	pMW490	DcuS-R289A	18 ±8	255 ±9
	pMW476	DcuS-R290A	14 ±8	176 ±15
ON-Variante	pMW487	DcuS-D291A	56 ±10	545 ±65
ON-Variante	pMW477	DcuS-D291N	95 ±11	399 ±52
	pMW491	DcuS-E293Q	13 ±3	252 ±9
	pMW639	DcuS-I296A	5 ±2	124 ±19



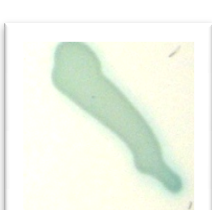
	pMW640	DcuS-I296C	7 ±4	125 ±20
	pMW640	DcuS-I296D	14 ±4	273 ±38
	pMW478	DcuS-K297A	19 ±6	175 ±33
OFF-Variante	pMW922	DcuS-L300A	5 ±1	24 ±2
	pMW488	DcuS-N304D	650 ±124	655 ±20
	pMW479	DcuS-T305A	20 ±12	328 ±50
	pMW712	DcuS-N311A	20 ±3	356 ±30
	pMW713	DcuS-N311D	17 ±3	443 ±23
	pMW923	DcuS-V313A	8 ±2	376 ±29
ON-Variante	pMW959	DcuS-I315A	69 ±5	508 ±29
	pMW636	DcuS-A317C	10 ±2	192 ±26
ON-Variante	pMW637	DcuS-A317D	178 ±28	638 ±108
	pMW638	DcuS-A317Y	5 ±3	168 ±21
	pMW914	DcuS-I318A	4 ±1	227 ±18
ON-Variante	pMW925	DcuS-S319P	323 ±6	465 ±53
ON-Variante	pMW945	DcuS-T320A	86 ±2	529 ±28
ON-Variante	pMW946	DcuS-F321A	179 ±66	569 ±31
ON-Variante	pMW947	DcuS-R322A	332 ±26	528 ±23
	pMW748	DcuS-N323D	18 ±7	239 ±8
ON-Variante	pMW734	DcuS-Q229A, N248D	324 ±17	637 ±39
ON-Variante	pMW564	DcuS-N304D, N248D	203 ±11	460 ±38
ON-Variante	pMW1386	DcuS-L300A, N248D	163 ±13	758 ±46
PAS_p + PAS_c				
ON-Variante	pMW562	DcuS-R107A, N248D	143 ±20	173 ±8
ON-Variante	pMW558	DcuS-H110A, N248D	120 ±15	186 ±20
ON-Variante	pMW502	DcuS-F120M, N248D	403 ±31	258 ±34
ON-Variante	pMW501	DcuS-R147A, N248D	534 ±1	257 ±2
ON-Variante	pMW500	DcuS-T101G, F120M, N248D	538 ±13	231 ±81
ON-Variante	pMW563	DcuS-R107A, N304D	262 ±65	249 ±22
ON-Variante	pMW559	DcuS- H110A, N304D	151 ±9	263 ±12
OFF-Variante	pMW1353	DcuS-H110A, V276A	4 ±3	5 ±4
OFF-Variante	pMW1354	DcuS-H110A, L300A	4 ±4	5 ±3

OFF-Variante	pMW1355	DcuS-H110A, L220A	4 ±4	6 ±2
OFF-Variante	pMW1356	DcuS-H110A, D240A	4 ±4	4 ±4
OFF-Variante	pMW1357	DcuS-H110A, I318A	5 ±3	4 ±4

Tab. A2: Qualitativer und quantitativer Nachweis der *dcuB*'-*lacZ* Expression der Signal-ON und Signal-OFF PAS_c-Varianten. Die Zucht für den qualitativen Nachweis der *dcuB*'-*lacZ* Expression erfolgte anaerob, auf eM9-Indikatorplatten mit X-Gal (0,5 mM), Kanamycin (50 µg/ml), mit und ohne Fumarat. Die Zucht für den quantitativen Nachweis erfolgte anaerob in eM9-Medium mit und ohne Effektor Fumarat.

IMW260 Protein (Plasmid)	Qualitativ	Quantitativ [MU]	Qualitativ	Quantitativ [MU]
	ohne Fumarat		mit Fumarat	
DcuS-		6 ±4		11 ±3
DcuS (pMW181)		13 ±11		255 ±45
DcuS-E213A (pMW936)		13 ±2		24 ±1
DcuS-I217A (pMW939)		5 ±1		29 ±1
DcuS-F221A (pMW941)		5 ±1		6 ±1

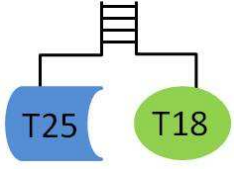
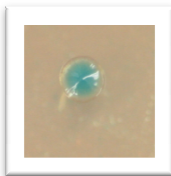
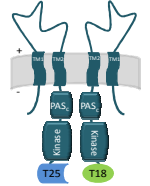

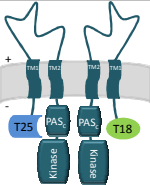
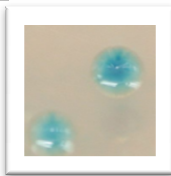
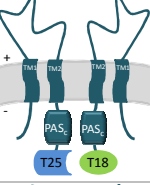

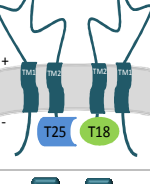
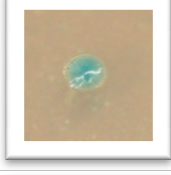
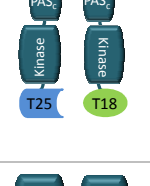
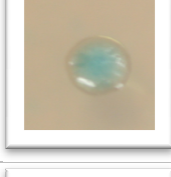

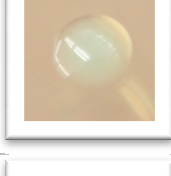
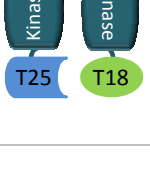
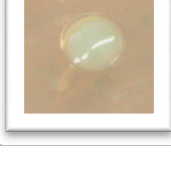
				
DcuS-L228A (pMW1029)		209 ±36		448 ±36
DcuS-L246R (pMW920)		610 ±59		741 ±69
DcuS-N248D (pMW421)		674 ±82		503 ±30
DcuS-V276A (pMW667)		15 ±10		20 ±12
DcuS-D291N (pMW477)		96 ±11		353 ±12
DcuS-L300A (pMW922)		5 ±1		24 ±2
DcuS-N304D (pMW488)		660 ±19		683 ±27

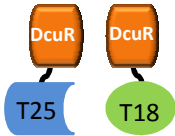
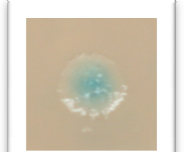
				
DcuS-I315A (pMW959)		209 ±36		508 ±29
DcuS-A317D (pMW638)		188 ±22		638 ±108
DcuS-S319P (pMW925)		323 ±7		465 ±54
DcuS-T320A (pMW945)		86 ±2		529 ±28
DcuS-F321A (pMW946)		179 ±66		569 ±31
DcuS-R322A (pMW947)		332 ±26		528 ±23

Tab. A3: Übersicht der gewonnenen DcuS-Varianten mit ungerichteter Mutagenese. Dargestellt ist die Lage der Mutanten, der Phänotyp und die Häufigkeit der aufgetretenen Mutation.

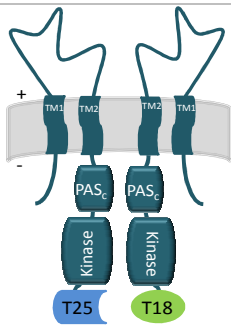

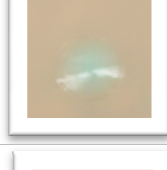
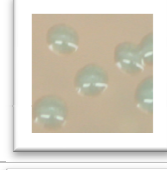
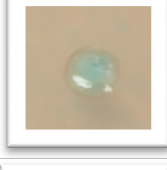

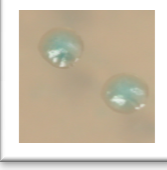
Lage	Mutanten	Phänotyp	Häufigkeit
N-Terminus	I22V	still	1x
TM1	S26R	OFF	2x
PAS _P	L96Q	still	1x
PAS _P	R92H	still	1x
PAS _P	G140A	OFF	2x
PAS _P	N156D	still	1x
PAS _P	D124V	OFF	2x
PAS _C	I231T	still	1x
PAS _C	N248D	ON	4x
PAS _C	D239G	still	1x
PAS _C	N304D	ON	3x
PAS _C	F321A	ON	1x
PAS _C	D291N	ON	1x
PAS _C	R224A	still	1x
PAS _C	L300A	OFF	2x
PAS _C	A317D	ON	2x
PAS _C	N248A	ON	3x
PAS _C	Q229A	still	1x
PAS _C	I237C	still	1x
PAS _C	L228A	ON	2x
PAS _C	L246R	ON	1x
PAS _C	S319P	ON	3x
PAS _C	N248T	ON	2x
PAS _C	R322G	Stop	1x

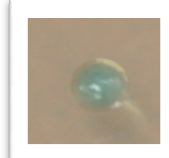

Tab. A4: Interaktion homologer Konstrukte von DcuS und DcuR mit C- und N-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Die Tabelle zeigt ein Schema des Proteinkonstrukts, die Fragmente, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin.

Schema Proteinkonstrukt	T25-Fragment T18-Fragment	Färbung der Kolonie	β -Gal [MU]
	T25-Zip T18-Zip		1361 \pm 174
	DcuS-T25 DcuS-T18		nicht messbar
	T25-DcuS T18-DcuS		1391 \pm 189
	DcuS- PAS _C -T25 DcuS- PAS _C -T18		307 \pm 43
	DcuS-TM2-T25 DcuS-TM2-T18		338 \pm 22
	PAS _C -Kinase-T25 PAS _C -Kinase-T18		1640 \pm 9
	PAS _C -T25 PAS _C -T18		47 \pm 2
	Kinase-T25 Kinase-T18		46 \pm 7

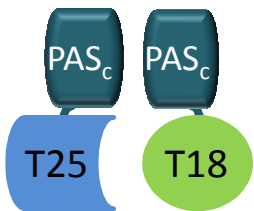





	DcuR-T25 DcuR-T18		774 ±67
---	----------------------	--	---------

Tab. A5: Interaktion homologer Konstrukte von kompletten DcuS mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Die Tabelle zeigt ein Schema des Proteinkonstrukts, die Fragmente, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Mutationen sind in rot markiert.

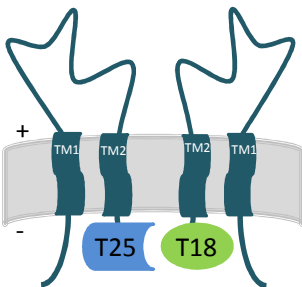
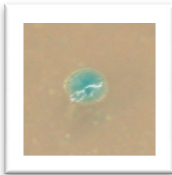
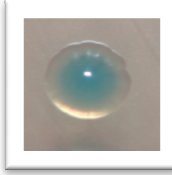
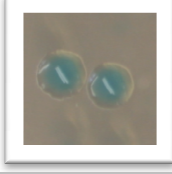

Schema Proteinkonstrukt	T25-Fragment T18-Fragment	Färbung der Kolonie
	DcuS _{-pKNT25} DcuS _{-pUT18}	
	DcuS- N248D _{-pKNT25} DcuS- N248D _{-pUT18}	
	DcuS- N304D _{-pKNT25} DcuS- N304D _{-pUT18}	
	DcuS- V276A _{-pKNT25} DcuS- V276A _{-pUT18}	
	DcuS- F221A _{-pKNT25} DcuS- F221A _{-pUT18}	
	DcuS- L228A _{-pKNT25} DcuS- L228A _{-pUT18}	

	DcuS-L300A _{-pKNT25} DcuS-L300A _{-pUT18}	
	pKNT25-DcuS-D240A pUT18C-DcuS-D240A	

Tab. A6: Interaktion homologer Konstrukte der isolierten PAS_c-Domänen mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Die Tabelle zeigt ein Schema des Proteinkonstrukts, die Fragmente, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Mutationen sind in rot markiert.

Schema Proteinkonstrukt	T25-Fragment T18-Fragment	Färbung der Kolonie	β -Gal [MU]
	PASc _{-pKNT25} PASc _{-pUT18}		47 \pm 2
	PASc _{N248D} _{-pKNT25} PASc _{N248D} _{-pUT18}		54 \pm 2
	PASc _{N304D} _{-pKNT25} PASc _{N304D} _{-pUT18}		57 \pm 4
	PASc _{V276A} _{-pKNT25} PASc _{V276A} _{-pUT18}		56 \pm 3
	PASc _{F221A} _{-pKNT25} PASc _{F221A} _{-pUT18}		56 \pm 2

Tab. A7: Interaktion homologer Konstrukte von verkürztem DcuS bis zur Transmembranhelix 2 mit C-terminal fusionierten T25- und T18-Fragmenten. Die Tabelle zeigt ein Schema des Proteinkonstrukts, die Färbung der Kolonien auf X-Gal-Platten und die β -Galaktosidase-Aktivität [MU] des Stammes. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG, 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin. Mutationen sind in rot markiert.

Schema Proteinkonstrukt	T25-Fragment T18-Fragment	Färbung der Kolonie	β -Gal [MU]
	DcuS-TM2 _{-pKNT25} DcuS-TM2 _{-pUT18}		338 \pm 22
	DcuS-TM2_ R107A _{-pKNT25} DcuS-TM2_ R107A _{-pUT18}		539 \pm 2
	DcuS-TM2_ H110A _{-pKNT25} DcuS-TM2_ H110A _{-pUT18}		477 \pm 53
	DcuS-TM2_ F120A _{-pKNT25} DcuS-TM2_ F120A _{-pUT18}		494 \pm 35

Überproduktion und Reinigung von DcuS und DcuS-Derivaten

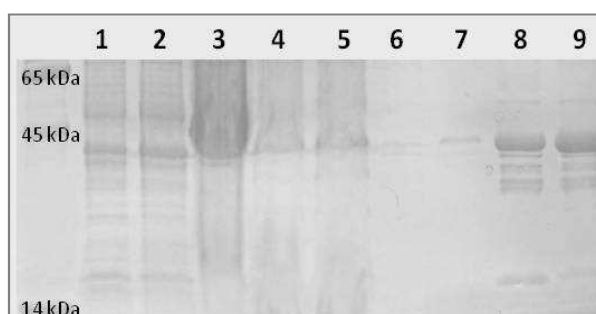


Abb. A1: Überexpression und Reinigung von His₆-DcuS-TM1,2-PASc-V276A aus *E. coli* C43(DE3) (pMW770). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

- 1: Proteinstandard: BSA (Mr 65 kDa), Ovalbumin (Mr 45 kDa), Lysozym (Mr 14 kDa)
 2: Zellhomogenat vor der Induktion 3: Zellhomogenat nach 4 – 5 Stunden Induktion
 4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss
 5: Durchlauf der Ni₆-NTA-Agarose-Säule
 6: Waschfraktion der Ni₆-NTA-Agarose-Säule
 Elution der Ni₆-NTA-Agarose-Säule:
 7: Fraktion 1 6,3 µg
 8: Fraktion 2 18 µg
 9: Fraktion 3 16,4 µg

Überexpression und Reinigung von DcuS-Varianten

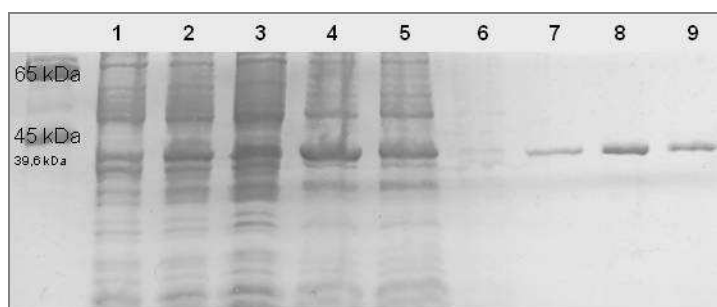


Abb. A2: Überexpression und Reinigung von His₆-DcuS-TM1,2-PASc-T101G aus *E. coli* C43(DE3) (pMW670). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

- 1: Proteinstandard: BSA (Mr 65 kDa), Ovalbumin (Mr 45 kDa), Lysozym (Mr 14 kDa)
 2: Zellhomogenat vor der Induktion
 3: Zellhomogenat nach 4 – 5 Stunden Induktion
 4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss
 5: Durchlauf der Ni₆-NTA-Agarose-Säule
 6: Waschfraktion der Ni₆-NTA-Agarose-Säule
 Elution der Ni₆-NTA-Agarose-Säule
 7: Fraktion 1 2,4 µg
 8: Fraktion 2 6,6 µg
 9: Fraktion 3 5,1 µg

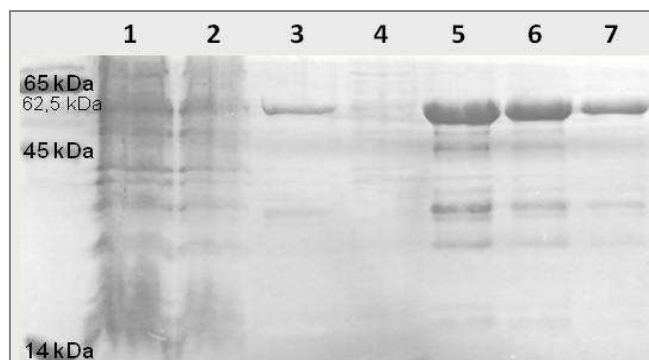


Abb. A3: Überexpression und Reinigung von kompletten DcuS His₆-DcuS-N248D aus *E. coli* C43(DE3) (pMW740). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Proteinstandard: BSA (Mr 65 kDa), Ovalbumin (Mr 45 kDa), Lysozym (Mr 14 kDa)

1: Gesamtprotein nach Zellaufschluss

2: Durchlauf der Ni₆-NTA-Agarose-Säule

3: Elution der Ni₆-NTA-Agarose-Säule, Fraktion 1 6,6 µg

4: Waschfraktion der Ni₆-NTA-Agarose-Säule

Elution der Ni₆-NTA-Agarose-Säule:

5: Fraktion 2 13,6 µg

6: Fraktion 3 12 µg

7: Fraktion 4 9,2 µg

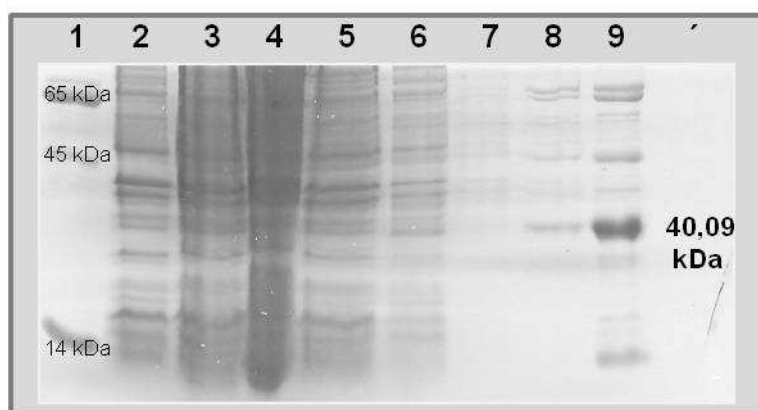


Abb. A4: Überexpression und Reinigung von der isolierter His₆-PAS_c-N248D-Kinase aus *E. coli* C43(DE3) (pMW733). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

1: Proteinstandard: BSA (Mr 65 kDa), Ovalbumin (Mr 45 kDa), Lysozym (Mr 14 kDa)

2: Zellhomogenat vor der Induktion

3: Zellhomogenat nach 4 – 5 Stunden Induktion

4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss

5: Durchlauf der Ni₆-NTA-Agarose-Säule

6: Waschfraktion der Ni₆-NTA-Agarose-Säule

Elution der Ni₆-NTA-Agarose-Säule:

7: Fraktion 1 1,1 µg

8: Fraktion 2 5,2 µg

9: Fraktion 3 12 µg

Ausblick

Um offene Fragestellungen noch zu klären, sollten zukünftige Untersuchungen durchgeführt werden. Die fehlenden Mutanten und Messungen sind die in Tab. A8 zusammengefasst. Die Homo-Dimerisierung von PAS_C sollte noch gründlicher anhand der vorhergesagten Interaktionsreste analysiert werden. Auch sollten die Reste, die vielleicht mit N248 in Wechselwirkung treten und die vorhergesagte mögliche Wechselwirkung von N304 mit K232 und N248 mit L228 genauer untersucht werden.

Tab. 8: Übersicht der fehlenden Mutanten, Expressionsmessungen und BACTH-Untersuchungen von PAS_C.

	Mutagenese und Funktionsmessung	BACTH-Messung DcuS-PAS _C	Bemerkungen
N304D + K232A	X		ON-Variante + stille Variante, mögliche WW
N248D + L228A	X		ON-Variante + ON-Variante, mögliche WW
L246R	ON-Variante	X	vorhergesagter Interaktionsrest
T320A	ON-Variante	X	vorhergesagter Interaktionsrest
A237C	stille Variante	X	vorhergesagter Interaktionsrest
I318A	stille Variante	X	vorhergesagter Interaktionsrest
G234A	X		mögliche WW mit N248
V235A	X		mögliche WW mit N248
V236A	X		mögliche WW mit N248

8. Veröffentlichungen

Gottfried Uden & Pia Dünnwald (2008)

The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics 3.2.2 *EcoSal-Escherichia* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, DC.

Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünnwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., Becker, S., Uden, G. & Baldus, M. (2008)

Plasticity of PAS domain and potential role for signal transduction in the histidine-kinase DcuS, *Nature Structural & Molecular Biology (NSMB)* 15:1031-1039

Paper des Monats 10/2008 (NSMB)

O. B. Kim, J. Reimann, H. Lukas, U. Schumacher, J. Grimpo, P. Dünnwald and G. Uden (2009)

Regulation of tartrate metabolism by TtdR and relation to the DcuS–DcuR-regulated C₄-dicarboxylate metabolism of *Escherichia coli* *Microbiology* ; 155: 3632 – 3640

H. Kneuper, P. Scheu, M. Etzkorn, M. Sevvana, P. Dünnwald, S. Becker, M. Baldus, C. Griesinger, G. Uden (2010)

Sensing ligands by periplasmic sensing histidine kinases with sensory PAS domains

Buch: Sensory Mechanisms in Bacteria, Molecular Aspects of Signal Recognition, Caister Academic Press 09/2010, Capter 2, edited by Stephen Spiro and Ray Dixon

