

**Der Transporter DcuB  
als funktioneller Schalter zwischen freiem DcuS  
und dem sensorisch aktiven DcuS/DcuB-  
Sensorkomplex**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Sebastian Wörner**

geb. am 13.12.1984 in Bad Soden am Taunus

Mainz, Oktober 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2017

## Inhalt

1 Abstract.....	1
2 Zusammenfassung .....	2
3 Einleitung.....	3
3.1 Das Darmbakterium Escherichia coli .....	3
3.2 Globale Regulation der Atmung von E. coli.....	4
3.3 Der C <sub>4</sub> -Dicarboxylat Stoffwechsel von E. coli .....	4
3.4 Regulation des C <sub>4</sub> -Dicarboxylatstoffwechsels von E. coli.....	7
3.5 Das Zweikomponentensystem DcuSR.....	9
3.6 Die C <sub>4</sub> -Dicarboxylat Transporter DctA und DcuB .....	10
3.6.1 Der aerobe Transporter DctA .....	10
3.6.2 Der anaerobe Transporter DcuB.....	11
3.7 Ziele der Arbeit.....	13
4 Material und Methoden.....	14
4.1 Stämme, Plasmide.....	14
4.2 Primer.....	15
4.3 Lösungen und Medien.....	17
4.3.1 Medien und Puffer .....	17
4.3.2 Transportmessung.....	19
4.3.3 Membranpräparation .....	19
4.3.4 Antibiotika.....	20
4.3.5 Zellzahlbestimmung .....	20
4.3.6 P1-Tansduktion.....	20
4.3.7 $\beta$ -Galaktosidase Test .....	21
4.3.8 Semidry-Western-Blotting.....	21
4.4 Zucht und Präparation.....	23
4.4.1 Zucht für $\beta$ -Galaktosidase Test (anaerob) .....	23
4.4.2 Zucht für die absolute Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA .....	24
4.4.3 Präparation der Membranen für die absolute Quantifizierung .....	24

4.4.4	Zucht für Transportmessungen .....	24
4.4.5	Präparation des Darminhalts von Mäusen .....	25
4.5	Molekularbiologische Methoden .....	25
4.5.1	Gerichtete Mutagenese .....	26
4.5.2	Kolonie-PCR .....	27
4.5.3	Stammkonstruktion per P1-Transduktion .....	27
4.6	Biochemische Methoden .....	28
4.6.1	SDS-PAGE .....	28
4.6.2	Immuno-Blot .....	28
4.6.3	Antikörperfärbung .....	28
4.6.4	Bacterial Two Hybrid System (BACTH) .....	29
4.6.5	Beta-Galaktosidase Test .....	30
4.6.6	Transportmessungen .....	31
4.6.7	Absolute Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA mittels SRM.....	32
4.6.8	Bestimmung der Zellzahl.....	36
4.6.9	Bestimmung der Konzentration von C <sub>4</sub> -DC mittels LC-MS/MS .....	36
4.7	Bioinformatische Methoden.....	36
5	Ergebnisse.....	37
5.1	Überführung von DcuS in die C <sub>4</sub> -Dicarboxylat-sensitive Form durch den Transporter DcuB .....	37
5.1.1	Die Signalerkennung im DcuS/DcuB-Sensorkomplex.....	38
5.1.2	Die Interaktion zwischen DcuS und DcuB .....	42
5.1.3	Titration von DcuS mit dem Koregulator DcuB.....	49
5.1.4	Expression von dcuB-lacZ bei verschiedenen DcuB-PhoA Gehalten.....	50
5.1.5	Titration von DcuB mit DcuS.....	52
5.2	Die Absolute Quantifizierung der Transporter DcuB und DctA und des Sensors DcuS .....	55
5.2.1	Identifizierung proteotypischer Peptide für die absolute Quantifizierung.....	56
5.2.2	Absolute Quantifizierung von DcuS und DcuB in E. coli W3110 nach anaerober Zucht... ..	58

5.2.3	Absolute Quantifizierung von DcuS und DctA in E. coli W3110 nach aerober Zucht .....	62
5.2.4	Titration von DcuS mit den Koregulatoren DcuB und DctA .....	64
5.2.5	Beiträge von DcuS und DcuS/DcuB zur Expression des dcuB-Promotors .....	69
5.2.6	Vorkommen von freiem DcuS <sub>F</sub> neben dem DcuS/DcuB-Sensorkomplex.....	71
5.3	Die Konzentration von C <sub>4</sub> -Dicarboxylaten im Mäusedarm .....	72
6	Diskussion.....	75
6.1	Der DcuB/DcuS-Sensorkomplex .....	75
6.1.1	Signalerkennung im DcuS/DcuB-Sensorkomplex.....	75
6.1.2	Die Interaktion zwischen DcuS und DcuB .....	78
6.1.3	Überführung von DcuS in den DcuS/DcuB-Sensorkomplex .....	80
6.2	Absolute Quantifizierung des Sensors DcuS und der Transporter DcuB und DctA.....	81
6.3	Stöchiometrie des DcuS/DcuB-Komplexes .....	84
6.4	Verfügbarkeit von C <sub>4</sub> -Dicarboxylaten im Darm und physiologische Rolle des DcuS/DcuB-Sensorkomplexes .....	86
6.5	Der Transporter DcuB als molekularer Schalter zwischen Modus II- und Modus I-Regulation .....	89
6.6	Ausblick .....	91
7	Literaturverzeichnis .....	92
A	Anhang.....	101
B	Abkürzungsverzeichnis.....	105
C	Veröffentlichungen und Präsentationen.....	108
D	Lebenslauf .....	109
E	Danksagung .....	110
F	Erklärung .....	111

# 1 Abstract

C<sub>4</sub>-dicarboxylate metabolism of *Escherichia coli* is regulated by the two component system DcuSR. The target genes of DcuSR include *dctA* and *dcuB*, encoding the aerobic and anaerobic transporters DctA and DcuB, respectively. The transporters form a DctA/DcuS or a DcuB/DcuS sensor complex with the sensor kinase DcuS.

In this study, the role of the anaerobic transporter DcuB for signal perception in the DcuB/DcuS sensor complex was analyzed. Substrates like fumarate, L-malate, L-aspartate were recognized by DcuS and DcuB. C<sub>4</sub>-dicarboxylates and structural analogues like maleate, meso-tartrate, citrate and 3-nitropropionate induce *dcuB-lacZ* but have no influence on the transport activity of DcuB. Therefore, signal perception in the DcuB/DcuS sensor complex occurs only by DcuS, and DcuB does not serve as secondary input site. However, DcuB is necessary as a structural component that transfers DcuS to a sensory competent DcuB/DcuS complex. The DcuB/DcuS complex is activated by the presence of fumarate.

Cellular contents of DcuS, DctA and DcuB were quantified from membrane preparations via mass spectrometry under different conditions. In the wildtype W3110 10 molecules DcuS and 198 molecules DctA were found per cell after aerobic growth. Addition of fumarate to the growth medium resulted in increased DctA contents (583 molecules per cell). After anaerobic growth 23 molecules DcuS and 273 molecules DcuB were found per cell. DcuB contents increased to 3396 molecules per cell after anaerobic growth on fumarate. Contents of free DcuS<sub>F</sub> were estimated by comparing the different properties of DcuS<sub>F</sub> and DcuS in the DcuB/DcuS complex. Thus, DcuS is almost exclusively present as DcuB/DcuS or DctA/DcuS complex.

The formation of the DcuB/DcuS complex represents a molecular switch between the two fundamental functional modes of DcuS. In mode I DcuS is present as DcuB/DcuS sensor complex which is regulated by binding an effector like fumarate. In mode II DcuS is present as DcuS<sub>F</sub> which is active even in absence of an effector. DcuS<sub>F</sub> contents are always very low. C<sub>4</sub>-dicarboxylates are abundant metabolites in the mammalian gut where they are mostly found in low concentrations only. Mode II regulation of DcuS includes negative feedback regulation which ensures a low basal expression of DcuB. This allows *E. coli* to utilize low concentrations of C<sub>4</sub>-dicarboxylates in the mammalian gut which do not or only weakly activate C<sub>4</sub>-Dicarboxylate metabolism via DcuS.

## 2 Zusammenfassung

Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsel von *Escherichia coli* wird durch das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert. Zu den Zielgenen von DcuSR gehören auch *dctA* und *dcuB*, die für den aeroben Transporter DctA bzw. den anaeroben Transporter DcuB kodieren. Die Transporter bilden mit der Sensorkinase DcuS DctA/DcuS- bzw. DcuB/DcuS-Sensorkomplexe. In dieser Arbeit wurde die Rolle des anaeroben Transporters DcuB bei der Signalerkennung in dem DcuB/DcuS-Sensorkomplex untersucht. Substrate wie Fumarat, L-Malat, L-Aspartat wurden von DcuS und von DcuB erkannt. Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate und Strukturanaloga Maleinat, meso-Tartrat, Citrat und 3-Nitropropionat sind Induktoren von *dcuB-lacZ*, haben jedoch keinen Einfluss auf die Transportaktivität von DcuB. Die Signalerkennung erfolgt im DcuB/DcuS-Komplex demnach allein durch DcuS; DcuB dient nicht als zweiter Signaleingang. DcuB ist jedoch als strukturelle Komponente erforderlich, um DcuS im DcuB/DcuS-Komplex in die sensorisch kompetente Form zu überführen. In der Gegenwart von Fumarat wird dann der DcuS/DcuB-Komplex aktiviert.

Die zellulären Gehalte von DcuS, DctA und DcuB wurden unter verschiedenen Bedingungen massenspektrometrisch aus Membranpräparationen quantifiziert. Im Wildtyp W3110 waren nach aerober Zucht etwa 10 Moleküle DcuS und 198 Moleküle DctA pro Zelle zu finden. Der DctA-Gehalt stieg nach Zugabe von Fumarat auf 583 Moleküle pro Zelle. Nach anaerober Zucht waren etwa 23 Moleküle DcuS und 273 Moleküle DcuB pro Zelle zu finden. Durch Fumarat stieg der DcuB-Gehalt 3396 Moleküle pro Zelle an. Die Gehalte an freiem DcuS wurden anhand der unterschiedlichen sensorischen Eigenschaften von DcuS<sub>F</sub> und DcuS im DcuB/DcuS-Komplex abgeschätzt. Danach liegt DcuS immer nahezu vollständig als DcuS/DcuB- oder DcuS/DctA-Komplex vor.

Die Bildung des DcuS/DcuB-Komplexes stellt einen Schalter dar, durch den zwischen den beiden grundlegenden Funktionsmodi von DcuS gewechselt wird. Im Modus I liegt DcuS als DcuS/DcuB-Sensorkomplex vor, der durch Bindung eines Effektors wie Fumarat reguliert wird. In Modus II liegt DcuS als freies DcuS<sub>F</sub> vor, das bereits ohne Effektor aktiv ist. Die Gehalte an DcuS<sub>F</sub> sind stets sehr niedrig. C<sub>4</sub>-Dicarboxylate stellen im Säugetierdarm gut verfügbare Metabolite dar, die aber meist nur in niedrigen Konzentrationen vorkommen. Im Funktionsmodus II liegt eine negative Rückkopplung vor, die eine niedrige basale Expression von DcuB gewährleistet. Dadurch kann *E. coli* auch niedrige C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Konzentrationen im Säugetierdarm nutzen, bei denen der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat Stoffwechsel nicht oder nur schwach über DcuS aktiviert wird.

## 3 Einleitung

### 3.1 Das Darmbakterium *Escherichia coli*

Das gram-negative  $\gamma$ -Proteobakterium *Escherichia coli* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das erstmals von Theodor Escherich (1886) als *Bacterium coli commune* beschrieben wurde. Die häufig verwendeten K-12 Stämme gehen dabei auf ein Stuhlisolat aus dem Jahr 1922 zurück (Lederberg 2004). Da *E. coli* leicht zu kultivieren ist, wurde der Stamm unter anderem für Experimente zu Biosynthesewegen und zur genetischen Rekombination in Bakterien verwendet (Gray & Tatum 1944; Tatum & Lederberg 1947; Lederberg 2004). In der Folge avancierte *E. coli* zu einem beliebten Labororganismus, sowohl als Modellorganismus, als auch als Werkzeug in der Molekularbiologie (Blount 2015). Auch den ersten Untersuchungen zur Genregulation diente *E. coli* als Modell (Jacob & Monod 1961; Jacob *et al.* 1960). Damit ist *E. coli* mittlerweile wahrscheinlich einer der am besten untersuchten Organismen.

Der natürliche Lebensraum von *E. coli* ist der Dickdarm von Wirbeltieren, ist aber auch im Bereich des Dünndarms zu finden (Tenailon *et al.* 2010; El Aidy *et al.* 2013). *E. coli* ist vor allem in der Mucus-Schicht zu finden (Wadolowski *et al.* 1988; Poulsen *et al.* 1994). Im Dickdarm ist *E. coli* oft der dominierende aerobe Organismus, stellt gleichzeitig aber nur einen kleinen Teil des gesamten Darm-Mikrobioms, das sich aus etwa 500 bis über 1000 Spezies zusammensetzt (Tenailon *et al.* 2010; Shreiner *et al.* 2015). Durch den Verbrauch des Sauerstoffs, der vor allem vom Darmepithel in den Darm diffundiert, gewährleistet *E. coli* eine anaerobe Umgebung für die strikten Anaerobier. Diese stellen den größten Teil der Darmflora und reagieren teilweise empfindlich auf Sauerstoff. Im Gegenzug nutzt *E. coli* Nährstoffe, die von anderen Mikroorganismen in der Darmflora freigesetzt werden. Neben Sauerstoff kann *E. coli* auch alternative Elektronenakzeptoren für eine anaerobe Atmung verwenden. So ist *E. coli* in der Lage Nitrat zu Nitrit und Nitrit zu Ammonium zu reduzieren (Unden & Bongaerts 1997). Neben Nitrat können auch Fumarat, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Trimethylamin-N-oxid (TMAO) als terminale Elektronenakzeptoren verwendet werden (Kröger 1978; Bilous & Weiner 1985; Barrett & Kwan 1985; Unden & Bongaerts 1997). Jüngst wurde sogar von der Verwendung von  $H_2O_2$  als Elektronenakzeptor berichtet (Khademian & Imlay 2017). In Abwesenheit von externen Elektronenakzeptoren ist *E. coli* außerdem in der Lage einen Gärungsstoffwechsel zu betreiben (Clark 1989). Bei der



gemischten Säuregärung entstehen verschiedene Endprodukte. Dies sind vor allem Ethanol, Formiat, Acetat, Wasserstoff, Succinat und Laktat.

### 3.2 Globale Regulation der Atmung von *E. coli*

*Escherichia coli* ist fakultativ anaerob und kann somit sowohl aeroben, als auch anaeroben Stoffwechsel betreiben. Neben Sauerstoff können auch andere Elektronenakzeptoren in der anaeroben Atmung verwendet werden. Dabei nimmt das Redoxpotential  $E_0$  der Elektronenakzeptoren und somit die Energieausbeute von Sauerstoff zu Fumarat ab. Aus diesem Grund ist die Verwendung der verschiedenen terminalen Elektronenakzeptoren streng hierarchisch organisiert (Gunsalus 1992). Ist Sauerstoff vorhanden, wird hauptsächlich eine aerobe Atmung betrieben. Der Übergang vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel wird vor allem über die beiden Sensorsysteme ArcAB (aerobic respiration control) und FNR (fumarate nitrate reductase regulator) gesteuert (Lin & Iuchi 1991; Park & Gunsalus 1995; Unden *et al.* 1995). ArcAB stellt einen indirekten Sauerstoffsensoren dar, der den Redoxstatus der Zelle über den Chinolpool misst, und die Expression der Gene für die aerobe Atmung in Abwesenheit von Sauerstoff hemmt (Malpica *et al.* 2004). FNR dagegen ist ein direkter Sauerstoffsensoren (Jordan *et al.* 1997). In Abwesenheit von Sauerstoff aktiviert FNR die Expression von verschiedenen Genen, die für den anaeroben Stoffwechsel benötigt werden (Unden *et al.* 1995; Salmon *et al.* 2003); in Gegenwart von Sauerstoff zerfällt jedoch ein Eisenschwefelzentrum, sodass FNR inaktiviert wird (Jordan *et al.* 1997). Weitere Sensorsysteme für die terminalen Elektronenakzeptoren aktivieren die Gene für spezifischen Reduktasen und zugehörige Transportsysteme. Die Gene der Nitratatmung werden durch die Zweikomponentensysteme (ZKS) NarXL und NarPQ reguliert (Stewart 1993). Dabei inhibiert NarXL in Gegenwart von Nitrat unter anderem auch die Expression der Gene *frdABCD* und *dmsABC*, die für die Fumarat- bzw. die DMSO-Atmung benötigt werden (Stewart 1993). Die beiden ZKS TorSR und DcuSR regulieren in Gegenwart von TMOA bzw. Fumarat die Expression der benötigten Gene (Simon *et al.* 1994; Méjean *et al.* 1994; Jourlin *et al.* 1996; Zientz *et al.* 1998).

### 3.3 Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat Stoffwechsel von *E. coli*

Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen kann *Escherichia coli* C<sub>4</sub>-Dicarboxylate aufnehmen und verwerten. Unter aeroben Bedingungen und bei neutralem pH werden C<sub>4</sub>-Dicarboxylate wie Fumarat, Succinat und L-Malat über den Transporter DctA in

### 3.3 Einleitung

die Zelle aufgenommen. Bei sauren Bedingungen (pH 5) erfolgt die Aufnahme über den Transporter DauA (Karinou *et al.* 2013). In der Zelle werden die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate in den Citratzyklus eingeschleust und zu CO<sub>2</sub> verstoffwechselt (Abb. 1). Auch die Aminosäure L-Aspartat wird über DctA aufgenommen und über die Aspartase AspA desaminiert, wobei Fumarat entsteht (Guest *et al.* 1984). Neben DctA und DauA besitzt *E. coli* noch weitere Transporter, die unter aeroben Bedingungen C<sub>4</sub>-Dicarboxylate transportieren. DcuA wird konstitutiv sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert (Golby *et al.* 1998). Allerdings scheint DcuA unter aeroben Bedingungen nicht aktiv zu sein (Golby *et al.* 1998). GltP stellt einen zu DctA nahe verwandten Glutamat und Aspartat Transporter dar (Tolner *et al.* 1995). SatP schließlich ist ein niedrig affiner Transporter der entweder Acetat oder Succinat im Symport mit einem Proton aufnimmt (Sa-Pessoa *et al.* 2013).

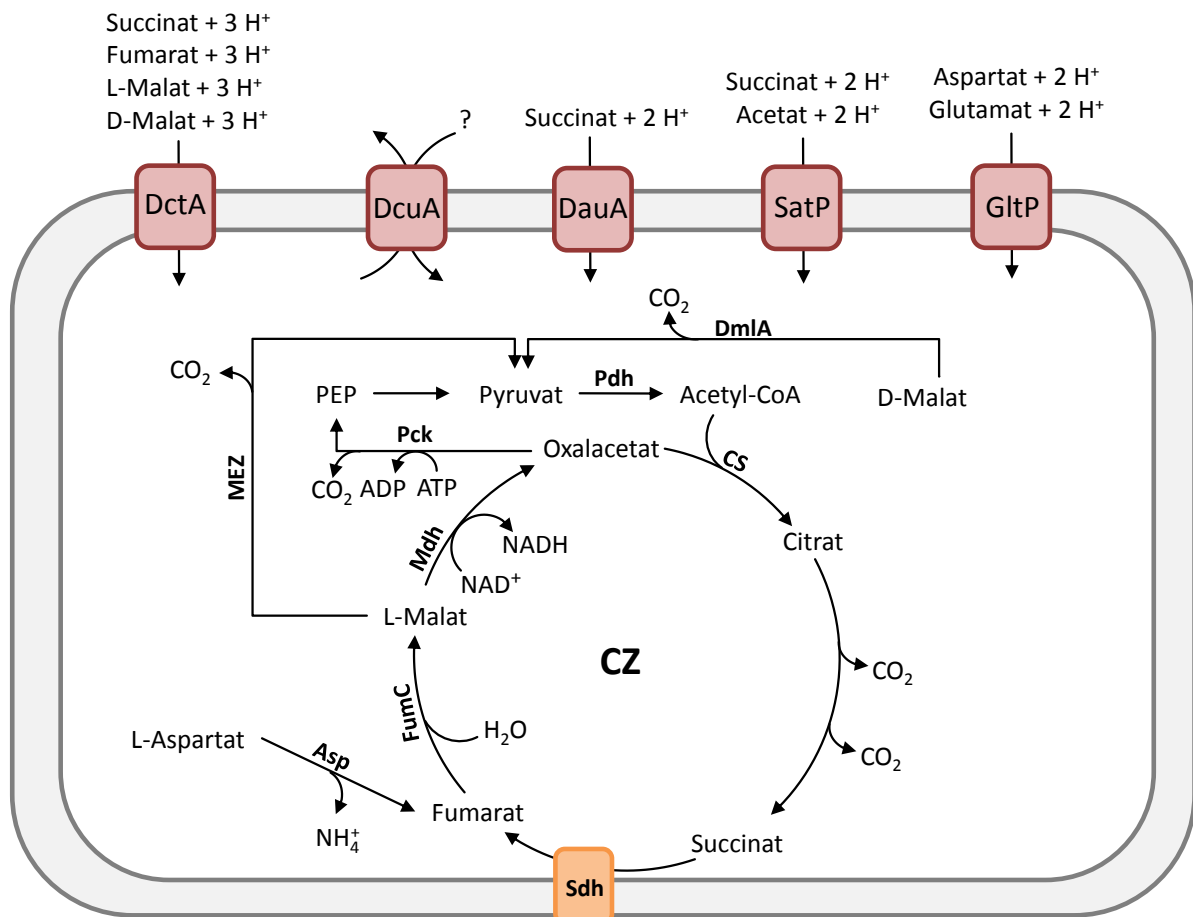


Abb. 1 Übersicht über den aeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsel von *Escherichia coli*. Unter aeroben Bedingungen ist DctA der wichtigste Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate. DcuA wird exprimiert, ist aber inaktiv. DauA dient als Succinat-Transporter unter sauren Bedingungen. SatP dient der Aufnahme von Acetat und Succinat. GltP ist ein Aminosäuretransporter für Glutamat und Aspartat. Beide Aminosäuren können desaminiert und in den Citratzyklus (CZ) eingeschleust werden. Abkürzungen: Malatenzym (MEZ), Aspartase (Asp), Fumarase (FumC), Malatdehydrogenase (Mdh), Phosphocarboxykinase (Pck), Pyruvatdehydrogenase (Pdh), Citratsynthase (CS), Succinatdehydrogenase (Sdh), Phosphoenolpyruvat (PEP).

Unter anaeroben Bedingungen dient vor allem der Antiporter DcuB der Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten, aber auch der homologe Transporter DcuA ist unter anaeroben Bedingungen in der Lage die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten zu katalysieren (Six *et al.* 1994). Diese werden über den reduktiven Ast des Citratzyklus zu Fumarat umgewandelt (Abb. 2). Fumarat schließlich wird von der Fumaratreduktase FrdABCD zu Succinat reduziert, und dient somit als terminaler Elektronenakzeptor in der Fumaratatmung. Nicht im Citratzyklus vorkommende C<sub>4</sub>-Dicarboxylate, wie L-Aspartat und Tartrat, können ebenfalls zu Fumarat umgesetzt werden. L-Aspartat wird durch AspA desaminiert, wobei Fumarat entsteht. D-Tartrat wird durch die Fumarase B (FumB) zu Oxalacetat dehydratisiert. Dies wird über L-Malat zu Fumarat umgesetzt. Das bei der Fumaratatmung anfallende Succinat kann unter anaeroben Bedingungen nicht weiter verstoffwechselt werden und wird über den Antiporter DcuB im Gegentausch mit anderen C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten aus der Zelle ausgeschieden (Engel *et al.* 1992).

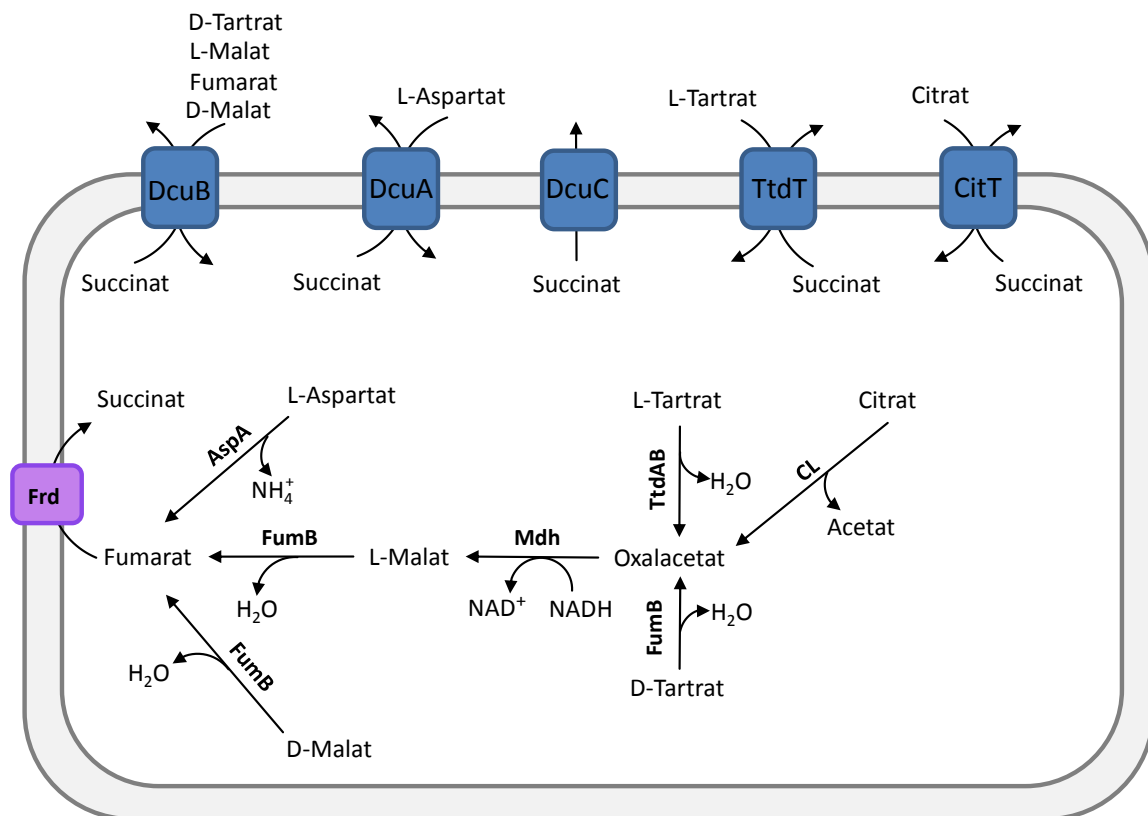


Abb. 2 Übersicht über den anaeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Stoffwechsel von *E. coli*. Für die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten stehen *E. coli* die Transporter DcuB, DcuA und DcuC zu Verfügung. Die Hauptfunktion von DcuC ist jedoch der Export von Succinat aus der Fermentation von Glucose. Für L-Tartrat nutzt *E. coli* den Tartrat/Succinat-Antiporter TtdT. Citrat kann über den Citrattransporter CitT in die Zelle aufgenommen werden. Die Substrate werden in den reduktiven Ast des Citratzyklus eingeschleust und dienen so als Quelle für Fumarat, das über die Fumaratreduktase (Frd) zu Succinat reduziert werden kann. Die hierbei freiwerdende Energie kann zum Aufbau eines Protonengradientens genutzt werden. Succinat fällt als Endprodukt an, das nicht weiter verstoffwechselt werden kann, und wird über die Antiporter DcuB, DcuA, TtdT und CitT im Gegentausch mit Substraten aus der Zelle ausgeschieden. Abkürzungen: Citratlyase (CL), L-Tartratdehydratase (TtdAB), Malatdehydrogenase (Mdh), Fumarase B (FumB), Aspartase (AspA).

Neben DcuB sind weitere anaerobe C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter bekannt. Der bereits erwähnte Transporter DcuA wird konstitutiv unter aeroben und anaeroben Bedingungen exprimiert. Seine physiologische Bedeutung ist noch nicht sicher geklärt, es wird aber angenommen, dass er für den Asparatstoffwechsel wichtig ist. Diese Vermutung wird vor allem durch die Kolokalisation und Koexpression von *dcuA* und *aspA* gestützt (Golby *et al.* 1998; Unden *et al.* 2016b). DcuC dagegen wird ausschließlich unter anaeroben Bedingungen gebildet, aber nicht durch Glucose reprimiert (Zientz *et al.* 1996; Zientz *et al.* 1999). Für diesen Transporter wird angenommen, dass er als Efflux-Transporter für fermentativ gebildetes Succinat dient (Zientz *et al.* 1999). Neben L-Malat, L-Aspartat und Fumarat kann *E. coli* auch auf L-Tartrat und D-Tartrat wachsen. Der mit CitT verwandte Transporter TtdT katalysiert die Aufnahme von L-Tartrat im Gegentausch mit Succinat. Anschließend erfolgt die Dehydratisierung von L-Tartrat zu Oxalacetat über die L-Tartratdehydratase TtdAB (Kim *et al.* 2007). Während *E. coli* für L-Tartrat eigene Enzyme verwendet, kann das in der Natur selten vorkommende D-Tartrat über DcuB aufgenommen und durch die Fumarase B zu Oxalacetat dehydratisiert werden.

Auch D-Malat kann von *E. coli* als Substrat verwendet werden. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme über DctA (Lukas *et al.* 2010). Anschließend erfolgt eine oxidative Decarboxylierung zu Pyruvat durch die D-Malat-Dehydrogenase DmlA (Stern & Hegre 1966; Lukas *et al.* 2010; Reed *et al.* 2006). Anaerob werden für den D-Malat Stoffwechsel keine für D-Malat spezifischen Enzyme benötigt. Die Aufnahme erfolgt über DcuB; FumB dehydratisiert D-Malat zu Fumarat, das schließlich über die Fumaratatmung zu Succinat reduziert wird (Lukas *et al.* 2010)

Unter aeroben Bedingen ist *E. coli* nicht in der Lage Citrat aus dem Medium aufzunehmen, da kein aerober Transporter für Citrat zur Verfügung steht. Dies gilt als charakteristisches Stoffwechselmerkmal für *E. coli* (Koser 1924). Unter anaeroben Bedingungen kann Citrat jedoch über den Citrat/Succinat-Antiporter CitT aufgenommen werden. Für die Citratfermentation wird ein Kosubstrat wie Glycerin als Elektronendonator benötigt (Pos *et al.* 1998). Nach der Spaltung von Citrat zu Oxalacetat und Acetat durch die Citratlyase, erfolgt die Reduktion zu L-Malat, eine Dehydratisierung zu Fumarat, das schließlich als Elektronenakzeptor dient (Unden *et al.* 2016b).

### 3.4 Regulation des C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsels von *E. coli*

Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsel von *E. coli* unterliegt mehreren Ebenen der Regulation. Neben der globalen Regulation des Stoffwechsels durch die Verfügbarkeit von Glucose,

spielt der Redoxstatus der Zelle (ArcAB) sowie die Verfügbarkeit von Sauerstoff (FNR) oder Nitrat (NarXL und NarPQ) eine wichtige Rolle. In Gegenwart von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten werden die benötigten Gene über das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999). Wenn die Sensorhistidinkinase DcuS C<sub>4</sub>-Dicarboxylate bindet, kommt es zu Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes und der Übertragung des Phosphatrestes auf den Antwortregulator DcuR (Janausch *et al.* 2002a). Unter aeroben Bedingungen aktiviert DcuR die Transkription des Transporters DctA. Unter anaeroben Bedingungen wird neben der Fumaratreduktase FrdABCD auch die Expression des anaeroben Transporters DcuB sowie der Fumarase B aktiviert (Abb. 3). Zusätzlich bindet DcuR an den Promotor von *citAB* (Scheu *et al.* 2012). Das CitAB Zweikomponentensystem ist nah mit DcuS verwandt und reguliert die Gene der Citratfermentation. Dies sind *citCDEFXGT*

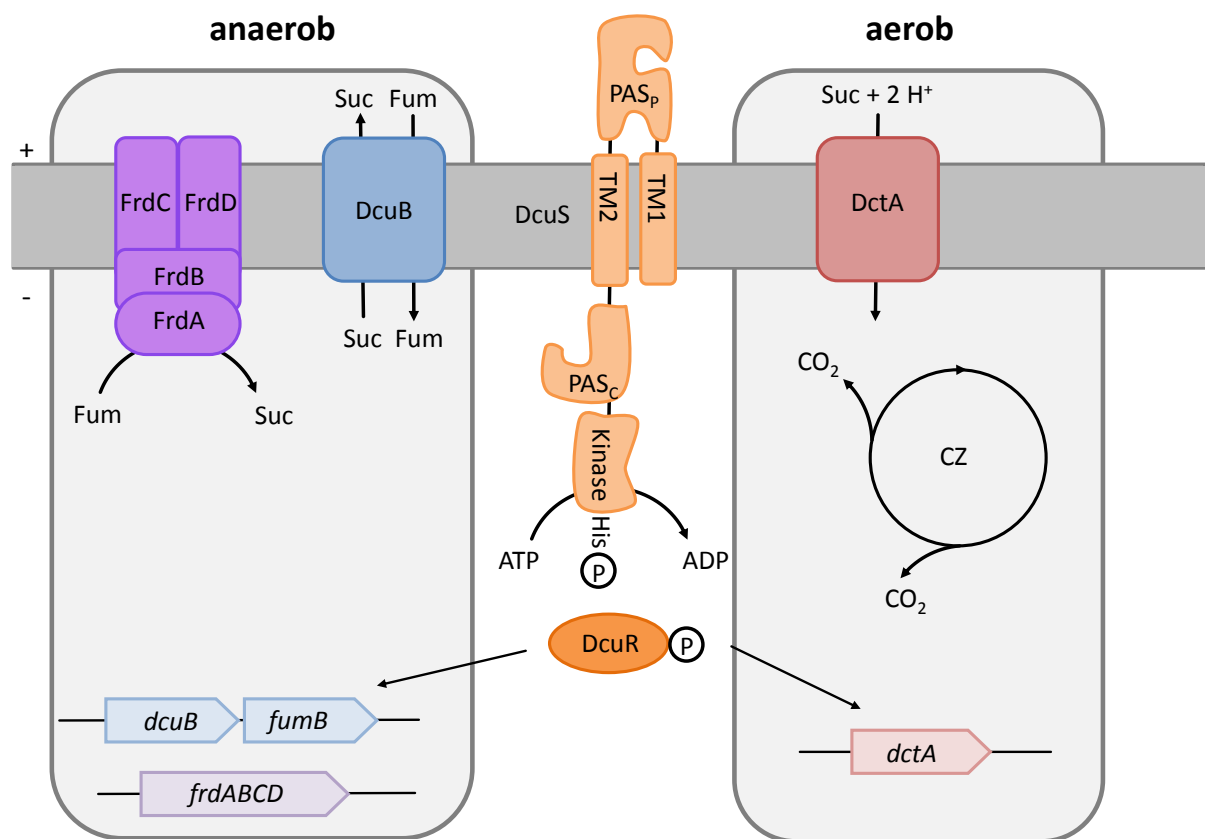


Abb. 3 Regulation des C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsels unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch das Zweikomponentensystem DcuSR. Unter anaeroben Bedingungen aktiviert DcuSR die Transkription von *dcuB*, *fumB* und *frdABCD*. Fumarat (Fum) dient anaerob als Elektronenakzeptor und wird über die Fumaratreduktase FrdABC zu Succinat (Suc) reduziert. Dies wird über den anaeroben Transporter DcuB im Gegenaustausch mit Fumarat oder anderen C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten aus der Zelle ausgeschieden. Unter aeroben Bedingungen induziert DcuSR die Expression von *dctA*. Der aerobe Transporter DctA dient der Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten wie z.B. Succinat im Symport mit zwei bis drei Protonen. Diese werden über den Citratzyklus (CZ) verstoffwechselt.

und *mdh*, welche für die Citratlyase, den Transporter CitT und die Malatdehydrogenase (Mdh) kodieren. Da Citrat auch von DcuS erkannt wird, werden die für die Citratfermentation ebenfalls benötigten Gene der Fumaratatmung (*fumB* und *frdABCD*) auch induziert.

Für die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate L-Tartrat, meso-Tartrat und D-Malat werden neben den Enzymen der Fumaratatmung ebenfalls eigene Enzyme benötigt, die von eigenen Sensoren induziert werden. L-Tartrat und meso-Tartrat wird von TtdR erkannt (Kim *et al.* 2009). TtdR induziert die Expression der Gene des L-Tartrat/Succinat Antiporters *ttdT*, der L-Tartrat-Dehydratase *ttdAB* sowie sein eigenes Strukturgen *ttdR* (Kim *et al.* 2009; Kim & Uden 2007). Für die Detektion von D-Malat nutzt *E. coli* den Regulator DmlR, der in Gegenwart von D-Malat die Transkription von *dmlA* induziert (Lukas *et al.* 2010).

### 3.5 Das Zweikomponentensystem DcuSR

Das Zweikomponenten System DcuSR besteht aus der Sensorhistidinkinase DcuS und dem Antwortregulator DcuR. Die Sensorkinase DcuS gehört zur CitA-Familie und besitzt zwei Transmembranhelices, eine periplasmatische Per-ARNT-Sim Domäne (PAS<sub>P</sub>), eine cytoplasmatische PAS Domäne sowie eine Kinasedomäne (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999). Die periplasmatische PAS<sub>P</sub> Domäne, die nach Upadhyay *et al.* (2016) auch als Cache Domäne klassifiziert wird, dient wahrscheinlich der Signalerkennung (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999; Pappalardo *et al.* 2003; Kneuper *et al.* 2005). In Untersuchungen der PAS<sub>P</sub>-Domäne mittels NMR und Röntgenkristallographie konnte die Substratbindestelle identifiziert werden (Pappalardo *et al.* 2003; Cheung & Hendrickson 2008). Dabei sind insbesondere die Reste R107, H110, F120 und R147 an der Bindung von L-Malat beteiligt. Der gerichtete Austausch dieser Aminosäuren führt zu DcuS-Varianten mit verändertem Substratspektrum (Kneuper *et al.* 2005; Krämer *et al.* 2007; Wörner *et al.* 2016). Neben Fumarat und L-Malat erkennt DcuS eine ganze Reihe C<sub>4</sub>-Dicarboxylate und verwandte Verbindungen (Kneuper *et al.* 2005). Die Transduktion des Signals über die Membran erfolgt wahrscheinlich über einen Kolbenhubmechanismus (Monzel & Uden 2015). Möglicherweise ist aber auch eine Kombination von Kolbenhub mit einer Kippbewegung für die Signaltransduktion zuständig (Stopp 2017). Wie für den nahe verwandten Citratsensor CitA<sub>Kp</sub> aus *Klebsiella pneumoniae* gezeigt wurde, führt wahrscheinlich in DcuS die Bindung des Substrates zu einem Umklappen einer Lasche von PAS<sub>P</sub>, wodurch die Transmembranhelix 2 (TM2) um etwa 4-6 Å Richtung Periplasma verschoben wird (Sevvana *et al.* 2008; Monzel & Uden 2015; Salvi *et al.* 2017). Über die cytoplasmatische PAS<sub>C</sub>

Domäne wird das Signal zur Kinasedomäne weitergeleitet (Etzkorn *et al.* 2008; Monzel *et al.* 2013). Hier kommt es zur Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes H349 und zur anschließenden Übertragung des Phosphatrestes auf den konservierten Aspartat-Rest R56 des Antwortregulators DcuR (Janausch *et al.* 2002a). Phosphoryliertes DcuR-P bildet Homodimere, die über ein Helix-Turn-Helix Motiv an AT-reiche DNA Sequenzen binden können und dadurch die Transkription der Zielgene des DcuSR-Zweikomponentensystems aktivieren (Janausch *et al.* 2004; Abo-Amer *et al.* 2004).

Unter aeroben Bedingungen wird vor allem die Expression des aeroben Transporters DctA induziert, während unter anaeroben Bedingungen der anaerobe Transporter DcuB, die Fumaratreduktase FrdABC und die Fumarase FumB induziert werden (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999).

## 3.6 Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylat Transporter DctA und DcuB

### 3.6.1 Der aerobe Transporter DctA

Der aerobe Transporter DctA gehört zur DAACS-Familie (dicarboxylate/amino acid: cation symporter) der Transporter (Saier 2000). Er nimmt C<sub>4</sub>-Dicarboxylate im Symport mit zwei bis drei H<sup>+</sup> oder Na<sup>+</sup> auf (Gutowski & Rosenberg 1975; Janausch *et al.* 2002b; Groeneveld *et al.* 2010). Der K<sub>m</sub> von DctA liegt bei etwa 30 bis 50 µM (Kay & Kornberg 1971). Die Topologie von DctA konnte experimentell bestimmt werden (Witan *et al.* 2012a). DctA besitzt demnach acht Transmembranhelices und beide Termini weisen eine cytoplasmatische Orientierung auf. Eine Kristallstruktur konnte für DctA bisher nicht gelöst werden. Die Struktur des homologen Transporters Glt<sub>Ph</sub>, aus *Pyrococcus horikoshii* hingegen ist bekannt, sodass ein Homologiemodell von DctA berechnet werden konnte (Yernool *et al.* 2004; Boudker *et al.* 2007; Witan 2012; Steinmetz *et al.* 2014). Dieses Homologiemodell konnte die Topologie bestätigen (Witan 2012; Steinmetz *et al.* 2014). Wie Glt<sub>Ph</sub> liegt DctA wahrscheinlich als Homotrimer vor. Neben seiner Funktion als Transporter dient DctA auch als Koregulator des Sensors DcuS (Davies *et al.* 1999; Steinmetz *et al.* 2014). Dabei wurde zunächst angenommen, dass DctA als Fluxsensor dient und somit eine echte sensorische Funktion besitzt (Davies *et al.* 1999; Witan *et al.* 2012b). Wird *dctA* durch eine Antibiotika-Resistenzkassette ausgeschaltet, kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung von DcuS; diese Aktivierung kann durch plasmidkodiertes *pdctA* wieder komplementiert werden (Davies *et al.* 1999). Wahrscheinlich dient DctA jedoch nicht als Kosensor, sondern eher als strukturelle Komponente, die im DctA/DcuS Komplex

erforderlich ist, um DcuS in die sensorisch kompetente Form zu überführen (Steinmetz *et al.* 2014). Die Regulation des Sensors DcuS erfolgt dabei über eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen DctA und DcuS (Witan *et al.* 2012a). Für diese Interaktion spielt vermutlich ein LDxxxLxxxL Motiv der cytoplasmatischen Helix 8b von DctA eine wichtige Rolle (Witan *et al.* 2012a).

### 3.6.2 Der anaerobe Transporter DcuB

Der anaerobe C<sub>4</sub>-Dicarboxylat Transporter DcuB gehört zur DcuAB-Familie der Transporter (Janausch *et al.* 2002b; Six *et al.* 1994). DcuB ist unter anaeroben Bedingungen der Haupttransporter für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate. Er dient der Aufnahme von Fumarat, L-Malat und anderen C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten. Gleichzeitig ist er als Antiporter in der Lage, das bei der Fumaratatmung anfallende Succinat aus der Zelle zu transportieren. Im Gegenaustausch werden Substrate wie Fumarat und L-Malat in die Zelle aufgenommen (Engel *et al.* 1994; Engel *et al.* 1992).

Bisher ist es weder gelungen die Struktur von DcuB, noch die Struktur von homologen Proteinen zu lösen. Die Topologie konnte jedoch experimentell bestimmt werden (Abb. 4): DcuB verfügt über 12 Transmembranhelices, wobei die Helices IV bis VI wahrscheinlich eine Haarnadelschleife ausbilden und nicht die gesamte Membran durchspannen; sowohl der N- als auch der C-Terminus weisen eine periplasmatische Orientierung auf (Bauer *et al.* 2011). Über den Oligomerisierungsgrad liegen derzeit keine Daten vor. Es ist aber anzunehmen, dass auch DcuB in oligomerer Form vorliegt. Ähnlich wie der aerobe Transporter DctA hat auch der anaerobe Transporter DcuB einen regulatorischen Einfluss

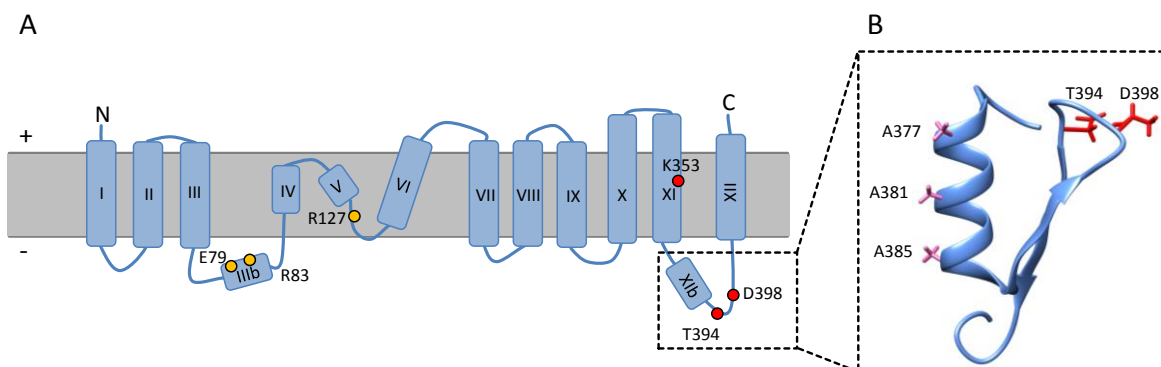


Abb. 4 A: Topologiemodell des anaeroben Transporters DcuB nach Bauer *et al.* (2011). Die für den Transport wichtigen Reste E79, R83 und R127 sind gelb markiert. Die für die Regulation wichtigen Reste K353, T394 und D398 sind rot markiert. B: Helix XIb als *ab initio* Strukturmodell nach Witan (2012). Die beiden regulatorisch wichtigen Reste T394 und D398 sind rot markiert. Die Reste A377, A381 und A385 bilden ein AxxxAxxxA Motiv und sind violett markiert.



Einfluss auf die Aktivität von DcuS. In DcuB-defizienten Stämmen ist DcuS konstitutiv aktiv (Kleefeld *et al.* 2009). Die vorhergesagte Helix XIb, die sich in einer cytoplasmatischen Schleife befindet, enthält ein AxxxAxxxA-Motiv (Witan 2012). Dieses Sequenzmotiv dient möglicherweise, analog zu dem LDxxxLxxxL Motiv in DctA, als Interaktions-vermittelndes Motiv (Witan 2012).

Außerdem konnten DcuB-Varianten identifiziert werden, die entweder in ihrer regulatorischen Funktion oder ihrer Transportfunktion eingeschränkt waren. Die Varianten K353A, T394I und D398N zeigen alle einen regulatorischen Defekt, sind aber weiterhin in der Lage die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten zu katalysieren (Kleefeld *et al.* 2009). Die Varianten E79A, R83A und R127A dagegen zeigen keine Transportaktivität, sind aber noch in der Lage DcuS zu regulieren (Kleefeld *et al.* 2009). Somit ist auch DcuB ein bifunktionelles Protein, das neben der Transport- eine regulatorische Funktion aufweist (Abb. 5). Diese beiden Funktionen können somit bereits in DcuB durch Punktmutationen räumlich und funktionell getrennt werden. Die Regulation von DcuS erfolgt, wie bei DctA, wahrscheinlich über eine Protein-Protein-Interaktion (Witan 2012; Wörner *et al.* 2016).

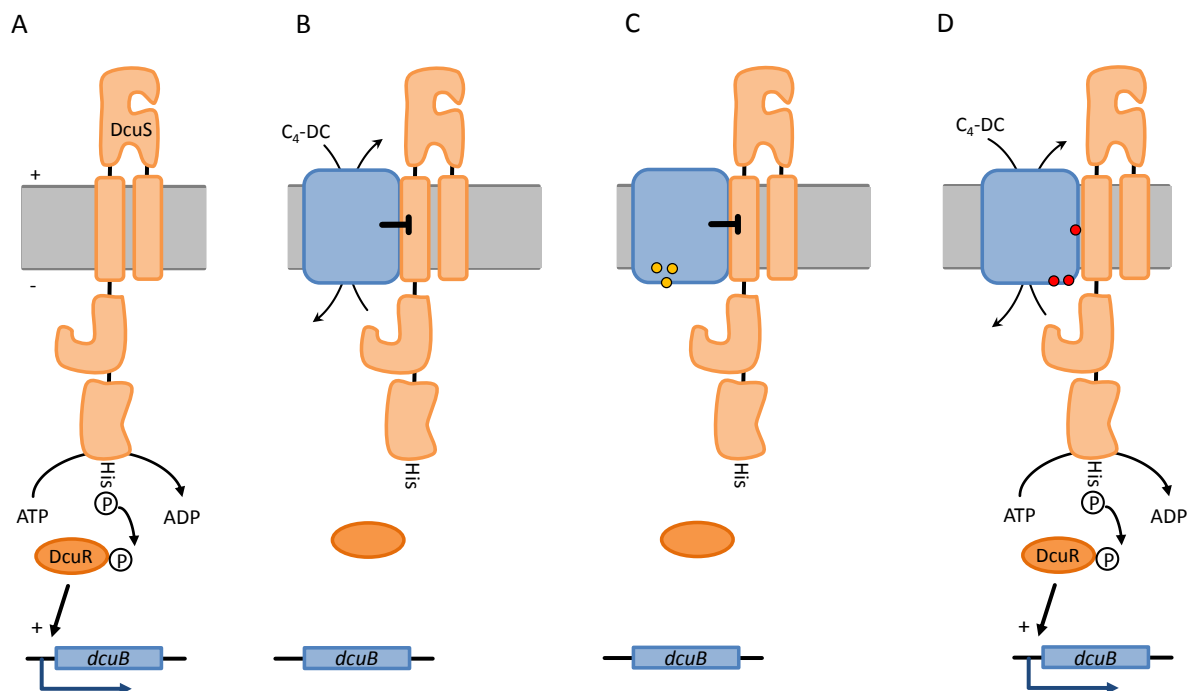


Abb. 5 Modell zur Funktion von DcuB als Komponente des DcuB/DcuS-Sensorkomplexes mit Transport- und regulatorischer Funktion. Unter anaeroben Bedingungen ist der Sensor DcuS in Abwesenheit des Transporters DcuB konstitutiv aktiv (A). In Gegenwart von DcuB ist DcuS inaktiv (B). Auch in Gegenwart der transportdefizienten DcuB-Varianten E79A, R83A und R127 (gelbe Punkte) wird DcuS in einen inaktiven Zustand versetzt (C). In Gegenwart der regulatorischen DcuB-Varianten K353A, T394U und D398N (rote Punkte) ist DcuS konstitutiv aktiv, die Transportfunktion dieser Varianten ist jedoch nicht eingeschränkt (D). Die Transport- und die regulatorische Funktion von DcuB ist durch Punktmutationen differenzierbar (Rot: reg. Mutanten K353A, T394I oder D398N; Gelb: Transportmutanten E79A, R83A oder R127A; Kleefeld *et al.* 2009).

### 3.7 Ziele der Arbeit

Es wird angenommen, dass der Transporter DcuB als Kosensor des Sensors DcuS dient (Kleefeld *et al.* 2009; Bauer *et al.* 2011). Der aerobe Transporter DctA ist jedoch nicht direkt an der Signalerkennung beteiligt und stellt auch keinen Fluxsensor dar (Steinmetz *et al.* 2014). Eine mögliche Rolle bei der Signalerkennung soll hier auch für den anaeroben Transporter DcuB untersucht werden. Daraus ergibt sich die Frage, welche Rolle der Transporter DcuB im DcuB/DcuS-Komplex spielt. Hierzu sollte in einem Titrationsexperiment der Einfluss des Transportergehaltes auf die Funktion des Sensors DcuS untersucht werden. Zusätzlich sollte die Substratspezifität von DcuS in der Induktion von *dcuB-lacZ* mit der Transportspezifität von DcuB verglichen werden, um die Rolle von DcuB und DcuS in der Erkennung des Effektors zu differenzieren.

Das DcuSR ZKS benötigt den aeroben Transporter DctA oder den anaeroben Transporter DcuB für die Bildung eines funktionellen Sensorkomplexes. Freies DcuS<sub>F</sub> hingegen ist konstitutiv aktiv, und aktiviert über DcuR die Transkription der Zielgene. Um das Vorkommen und die Rolle von freiem DcuS<sub>F</sub> näher zu untersuchen, sollten die Proteine DctA, DcuB und DcuS unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen quantifiziert werden. Über die Gehalte der drei Proteine und den funktionellen Status von DcuS sollte der Beitrag von DcuS<sub>F</sub> eingeschätzt werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Stämme, Plasmide

Die verwendeten Stämme und Plasmide sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 1 Liste der verwendeten Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
IMW503	MC4100, aber $\Delta dcuB$ , $\lambda[\Phi(dcuB-lacZ) hyb, amp^R$	Kleefeld (2006)
IMW260	MC4100, $\lambda[\Phi(dcuB-lacZ) hyb, amp^R, dcuS::cam^R$	Zientz <i>et al.</i> (1998)
IMW237	MC4100 aber $\lambda[\Phi(dcuB-lacZ) hyb, amp^R$	Zientz <i>et al.</i> (1998)
IMW505	MC4100, aber $\Delta dcuB$ , $dcuA::spc^R$ , $dcuC::cam^R$ $\lambda[\Phi(dcuB-lacZ) hyb, amp^R$	Kleefeld <i>et al.</i> (2009)
IMW213a	$dcuA, dcuB, dcuC, dctA$	Zientz <i>et al.</i> (1998)
IMW529	LJ1, aber, $dcuB::kan^R$ , $dcuA::spc^R$ , $\Delta ttdT$ $dcuC::miniTn10(cam^R)$ , $citT::kan^R$	Kim & Unden (2007)
IMW536	MC4100, $\lambda[\Phi(dcuB-lacZ) hyb, amp^R, dcuS::spc^R$ , $dcuB::cam^R$	Kleefeld (2006)
W3110	Wildtyp	Bachmann (1972)
IMW658	W3110 aber $dcuA::spc^R, dcuC::cam^R$	Diese Arbeit
IMW659	W3110 aber $dcuA::spc^R, dcuB::kan^R, dcuC::cam^R$	Diese Arbeit
XL1-Blue	$F-, recA1-, (mk+, rk-) supE44, endA1, thi-1, \lambda-,$ $gyrA96, relA1, (lac-) [F-, proAB, lacIq, ZAM15$ $Tn10(tet^R)]$	Stratagene
JM109	$recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96 relA1$ $thiA(lac-proAB), F[traD36 proAB+, lacIq,$ $lacZAM15]$	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
BTH101	$F^- cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^r),$ $hsdR2, mcrA1, mcrB1$	Karimova <i>et al.</i> (1998)

Tab. 2 Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW181	pET28a mit $dcuS$ (mit eigenem Promotor) über $XbaI / HindIII kan^R$	Kneuper <i>et al.</i> (2005)
pBAD33	Plasmid für die Genexpression über einen pBAD Promotor, pACYC184 ori, $cam^R$	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pET28a	Expressionsvektor für Fusionen mit N- und C-terminalem His6-	Novagen

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW228	Tag, T7-Promotor, pBR322 ori, <i>kan<sup>R</sup></i> <i>dcuB</i> mit eigenem Promotor in pME6010, <i>tet<sup>R</sup></i>	Kleefeld <i>et al.</i> (2009)
pMW397	pMW228, aber <i>dcuB</i> (T394I)	Kleefeld <i>et al.</i> (2009)
pMW405	pMW228, aber <i>dcuB</i> (D398N)	Kleefeld <i>et al.</i> (2009)
pMW508	pMW228, aber <i>dcuB</i> (K353A)	Kleefeld <i>et al.</i> (2009)
pMW561	<i>dcuB-phoA</i> in pBAD18-Kan*, <i>kan<sup>R</sup></i>	Bauer <i>et al.</i> (2011)
pMW2334	<i>dcuB-phoA</i> aus pMW561 über <i>HindIII</i> und <i>KpnI</i> in pBAD33, <i>cam<sup>R</sup></i>	Wörner <i>et al.</i> (2016)
pMW2335	pMW2334 aber DcuB(P376S)	Diese Arbeit
pMW2336	pMW2334 aber DcuB(A377S)	Diese Arbeit
pMW2337	pMW2334 aber DcuB(V380S)	Diese Arbeit
pMW2338	pMW2334 aber DcuB(A381S)	Diese Arbeit
pMW2339	pMW2334 aber DcuB(S382A)	Diese Arbeit
pMW2340	pMW2334 aber DcuB(P384S)	Diese Arbeit
pMW2341	pMW2334 aber DcuB(A385S)	Diese Arbeit
pMW2385	pMW2334 aber DcuB(A385D)	Diese Arbeit
pMW2386	pMW2334 aber DcuB(A385E)	Diese Arbeit
pMW2391	pMW2334, aber A381S und A385S, <i>cam<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
pMW1391	His6- <i>dcuS</i> in pBAD30 über <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> aus pMW151, <i>amp<sup>R</sup></i>	Witan (2012)
pMW2543	His6- <i>dcuS</i> aus pMW1391 über <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> in pBAD33, <i>cam<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
pMW280	<i>dcuB</i> mit N-terminalem His-tag über <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> in pET28a, <i>kan<sup>R</sup></i>	Kleefeld (2006)

## 4.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden bei Eurofins-Genomics GmbH (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bestellt und sind in Tab. 3 und Tab. 4 aufgelistet.

## 4.2 Material und Methoden

Tab. 3 Liste der verwendeten Primer für die gerichtete Mutagenese.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	TM [° C]
DcuB_P376S_for	GCGATCGGCGTTGATAGCGCATACATCGTGGC	68,2
DcuB_P376S_rev	GCCACGATGTATGCGCTATCAACGCCGATCGC	68,2
DcuB_A377S_for	GATCGGCGTTGATCCGAGCTACATCGTGGCTTCAG	69,1
DcuB_A377S_rev	CTGAAGCCACGATGTAGCTCGGATCAACGCCGATC	69,1
DcuB_Y378S_for	CGTTGATCCGGCAAGCATCGTGGCTTCAG	65,7
DcuB_Y378S_rev	CTGAAGCCACGATGCTTGCCGGATCAACG	65,7
DcuB_V380S_for	GTTGATCCGGCATAACATCAGCGCTTCAGCACCGGCTTG	70,9
DcuB_V380S_rev	CAAGCCGGTGCTGAAGCGCTGATGTATGCCGGATCAAC	70,9
DcuB_A381S_for	GATCCGGCATAACATCGTGAGCTCAGCACCGGCTTGCTAC	71,8
DcuB_A381S_rev	GTAGCAAGCCGGTGCTGAGCTCAGGATGTATGCCGGATC	71,8
DcuB_S382A_for	CATACATCGTGGCTGCGGCACCGGCTTGCTAC	69,5
DcuB_S382A_rev	GTAGCAAGCCGGTGCCGACGCCACGATGTATG	69,5
DcuB P384S_for	CATACATCGTGGCTTCAGCAAGCGCTTGCTACGGTTATTAC ATC	69,2
DcuB P384S_rev	GATGTAATAACCGTAGCAAGCGCTTGCTGAAGCCACGATG TATG	69,2
DcuB A385S_for	CGTGGCTTCAGCACCGAGCTGCTACGGTTATTAC	68,0
DcuB A385S_rev	GTAATAACCGTAGCAGCTCGGTGCTGAAGCCACG	68,0
DcuB C386S_for	CTTCAGCACCGGCTAGCTACGGTTATTAC	62,9
DcuB C386S_rev	GTAATAACCGTAGCTAGCCGGTGCTGAAG	62,9
dcuB(A385S)- A381S-for	GGCATAACATCGTGAGCTCAGCACCGAGCTG	67,1
dcuB(A385S)- A381S-rev	CAGCTCGGTGCTGAGCTCAGGATGTATGCC	67,1
dcuB(Triple A-S)-for	GATCGGCGTTGATCCGAGCTACATCGTGAGCTCAG	69,1
dcuB(Triple A-S)-rev	CTGAGCTCAGGATGTAGCTCGGATCAACGCCGATC	69,1
dcuB-A385D-for	GTGGCTTCAGCACCGGATTGCTACGGTTATTAC	65,6
dcuB-A385D-rev	GTAATAACCGTAGCAATCCGGTGCTGAAGCCAC	65,6
dcuB-A385E-for	GGCTTCAGCACCGGAATGCTACGGTTATTAC	64,4
dcuB-A385E-rev	GTAATAACCGTAGCATTCCGGTGCTGAAGCC	64,4

Tab. 4 Liste der verwendeten Sequenzierungsprimer.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	TM [° C]
dcuB-for	CATTAACATCTGCGCAGTACAAAC	54,0
dcuB-rev	CCTTTCGACAGCGTTTCTTC	51,8
dcuB86-seq-for	GCTGCTGCGCCGCAACCC	59,4
dcuB269-Seq-for	CGGCAAACCGCTGTTCGATGG	57,9
midDcuS	GTT TTC TGG CGC AGG CTT TAC GC	58,8

### 4.3 Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Medien und Puffer vor Gebrauch autoklaviert.

#### 4.3.1 Medien und Puffer

##### LB-Medium (Bertani 1951)

10 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

Es wurde fertig gemischtes LB-Medium verwendet (Roth).

##### LB-Agar

15 g/l Agar-Agar in LB-Medium gelöst

##### 10xM9 Medium

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

30 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Roth)

5 g/l NaCl

10 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fluka)

##### Zusätze

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

10 ml/l säurehydrolysiertes Casein (AHC) (10 %)

5 ml/l L-Tryptophan (1%)

##### Kohlenstoffquellen, Elektronenakzeptoren sowie Effektoren

Glycerin

DMSO

Fumarat

L-Malat (steril filtriert)

D-Malat (steril filtriert)

Maleinat

L-Tartrat

D-Tartrat

m-Tartrat

L-Aspartat

Citrat

3-Nitropropionat (steril filtriert)

Malonat

Itaconat

Phenylsuccinat

Von allen Zusätzen wurden 1 M Stammlösungen angesetzt, außer von DMSO (2 M), 3-Nitropropionat (0,1 M), L-Aspartat (0,2 M) und Maleinat (0,5 M).

#### X-Gal-eM9-Agar

15 g/l (Endvolumen) Agar-Agar in eM9

#### SOC-Medium

20 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefeextrakt

0,584 g/l NaCl

0,19 g/l KCl

2,03 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

2,46 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

3,96 g/l Glucose x H<sub>2</sub>O

Es wurde eine SOB-Fertigmischung verwendet, der Glucose hinzugegeben wurde.

#### Glycerin-MOPS Medium

1 mM MOPS

15% Glycerin

#### TSB-Medium

LB-Medium mit folgenden Zusätzen:

100 g/l Polyethylenglycol (PEG 6000)

2,46 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

2,03 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

100 ml/l DMSO

Das TSB-Medium wurde steril filtriert.

#### 10x PBS, pH 7,5

1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### TBS-Puffer, pH 7,6

50 mM Tris  
150 mM NaCl

### 4.3.2 Transportmessung

#### Transportpuffer

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7)  
1 mM MgSO<sub>4</sub>

#### Weitere Lösungen

0,1 M LiCl  
1 M Glucose  
Rotizint Ecoplus (Roth)  
[2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat (40 Bq/nmol, Hartmann Analytics)  
[2,3-<sup>14</sup>C]-Succinat (33,3 Bq/nmol, Hartmann Analytics)

### 4.3.3 Membranpräparation

#### Puffer A

50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5  
500 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM DTT



#### 4.3.4 Antibiotika

Tab. 5 enthält alle verwendeten Antibiotika sowie die verwendeten Endkonzentrationen. Wurden zwei oder mehr Antibiotika gleichzeitig verwendet, wurden die Konzentrationen halbiert.

Tab. 5 Liste der verwendeten Antibiotika.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration [<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>]</b>
Ampicilin	100
Chloramphenicol	20
Kanamycin	50
Spectinomycin	50
Tetracyclin	15

#### 4.3.5 Zellzahlbestimmung

##### Verdünnungslösung nach Norris & Powell (1961)

9 g/l NaCl

Soviel festes  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  hinzufügen bis der pH-Wert von 7,2 erreicht ist.

5 ml/l 35 % Formaldehydlösung

#### 4.3.6 P1-Tansduktion

##### R-Agar

10 g/l Bacto-Tryptone

1 g/l Hefeextrakt

8 g/l NaCl

1 g/l Glucose

12 g/l Agar-Agar

Nach dem Autoklavieren wurde 2 mM  $\text{CaCl}_2$  steril hinzugegeben.

##### R-Top-Agar

6,5 g/l Agar-Agar in LB-Medium

Nach dem Autoklavieren wurden 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM  $\text{MgSO}_4$  steril hinzugegeben.

### MC-Puffer

0,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

### 0,1 M Na<sub>3</sub>-Citrat

### 4.3.7 $\beta$ -Galaktosidase Test

#### $\beta$ -Galaktosidase Puffer

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0  
10 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Zusätze

0,005 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) oder Chloroform  
0,0025 % (w/v) Natriumdesoxycholat oder 0,0025 % (w/v) Natriumdodecylsulfat  
2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol oder 8 mM DTT

#### Lösungen für den $\beta$ -Galaktosidase Test

4 mg/ml ONPG  
1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### 4.3.8 Semidry-Western-Blotting

#### Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

#### Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

#### Trenngel (10 %)

1,98 ml H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub>  
1,67 ml 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid  
1,25 ml Trenngelpuffer  
50  $\mu$ l 10 % SDS  
5  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)  
20  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfat (APS)

#### Sammelgel (4 %)

1,49 ml H<sub>2</sub>O<sub>VE</sub>  
0,33 ml 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid  
0,63 ml Sammelgelpuffer  
50 µl 10 % SDS  
2,5 µl TEMED  
7,5 µl 10 % APS

#### 10x SDS-Laufpuffer

250 mM Tris  
1,92 M Glycin  
1 % (w/v) SDS

#### 2x SDS-Probenpuffer (Laemmli 1970)

100 mM Tris/HCl, pH 7,7  
200 mM Dithiothreitol (DTT)  
4 % (w/v) SDS  
0,2 % (w/v) Bromphenolblau  
20 % Glycerin

#### Transferpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Ethanol

#### Blockingpuffer

1x PBS  
3 % (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA) oder 2 % (w/v) Magermilchpulver  
0,1 % (w/v) Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)

#### Waschpuffer

1x PBS  
0,1 % (w/v) Tween 20

### Antikörperlösung

1x PBS

1 % (w/v) BSA

0,1 % (w/v) Tween 20

### **Antikörperverdünnung**

#### Primäre Antikörper

Anti-DcuS-PD (Kaninchen),

gegen die periplasmatische Domäne von DcuS gerichtet (Müller 2007)

Anti-PhoA (Maus)

gegen PhoA gerichtet

#### Sekundäre Antikörper

Anti-IgG-Rabbit, HRP-gekoppelt (Carl Roth, Karlsruhe)

Anti-IgG-Mouse, HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Verdünnung für Chemilumineszenz-Entwicklung 1:10000 bis 1:20000

## 4.4 Zucht und Präparation

### 4.4.1 Zucht für $\beta$ -Galaktosidase Test (anaerob)

Für die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität erfolgte die Zucht in eM9-Medium in Gegenwart oder Abwesenheit von Effektoren. Für die anaerobe Zucht wurde Glycerin (50 mM) als Kohlenstoffquelle und DMSO (20mM) als Elektronenakzeptor hinzugefügt. Außerdem wurden die Effektoren in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Die Vorkultur erfolgte in Deepwellplatten semianaerob in 1 ml eM9 für jeweils 24 h. Für die Hauptkultur wurden die Platten in Anaerobentöpfen kultiviert, die für 15 min evakuiert und anschließend mit Stickstoff (Reinheit >99,999 %, Westfalengas) begast wurden. Die Zucht erfolgte bei 37° C für 16 h bei Kulturen mit verwertbaren Effektoren wie Fumarat und 28 h bei Kulturen mit Effektoren, die nicht als Elektronenakzeptor genutzt werden konnten.

### 4.4.2 Zucht für die absolute Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA

Die Vorkultur erfolgte als semianaerobe Standkultur in 10 ml eM9 mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) bei 37° C im Wasserbad. Wenn angegeben, wurden weitere Zusätze hinzugegeben. Die Hauptkultur erfolgte in 200 ml eM9 in Müller-Krempel Flaschen bei 37° C im Wasserbad für 16 h bis 28 h.

Für die Quantifizierung von DcuS und DctA in *E. coli* W3110 erfolgte die aerobe Zucht in Schikanekolben unter Schütteln in eM9-Medium mit Glycerin (50 mM) oder Fumarat (50 mM) als Kohlenstoffquelle.

Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>570</sub> von ungefähr 0,5 gezüchtet. Für die Membranpräparation wurden etwa 80 OD-Einheiten per Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden entweder direkt weiter genutzt oder bis zu ihrer Nutzung bei -80 °C gelagert.

Für die Analyse ganzer Zellen wurden etwa 15 OD-Einheiten geerntet und pelletiert. Die Pellets wurden bis zu ihrer Nutzung bei -80 °C gelagert.

### 4.4.3 Präparation der Membranen für die absolute Quantifizierung

Für die Präparation der Membranen wurden etwa 80 OD-Einheiten Zellen geerntet und entweder direkt genutzt oder bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert. Vor dem Zellaufschluss wurden die Zellen zunächst in Puffer A resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss durch drei Passagen durch die French-Press (1,38·10<sup>2</sup> MPa; Modell FA078E1, Aminco, USA). Zelltrümmer wurden über einen langsamen Zentrifugationsschritt (13798 g, 4 °C, 10 min; Eppendorf 5403, Hamburg) entfernt. Anschließend erfolgte die Ernte der Membranen aus dem Überstand per Ultrazentrifugation (208097 g, 4 °C, 1 h; LE-80K, TFT70.38, Beckmann Coulter, USA). Bis zur Verwendung wurden die Membranen bei -80 °C gelagert.

### 4.4.4 Zucht für Transportmessungen

Die Vorkultur für Transportmessungen erfolgte für 24 h als semianaerobe Standkultur in Reagenzgläsern mit 10 ml eM9 Medium mit Glycerin (50 mM) als Kohlenstoffquelle und DMSO (20 mM) als Elektronenakzeptor. Wenn angegeben, wurde dem Medium außerdem 50 mM Fumarat hinzugefügt. Die Hauptkultur erfolgte als anaerobe Kultur in Müller-Krempel-Flaschen mit 50 bis 70 ml eM9-Medium mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) sowie Fumarat (20 mM), wenn angegeben. Die Müller-Krempel-Flaschen wurden über eine Vakuumpumpe drei Mal für 15 min evakuiert; die Luft wurde durch Stickstoff (Reinheit > 99,999 %, Westfalengas) ersetzt, das über einen Sterilfilter in die Flaschen geleitet wurde. Die Zucht erfolgte bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 bis 0,8.

### 4.4.5 Präparation des Darminhalts von Mäusen

Für die Untersuchung des Darminhaltes wurden männliche C57BL/6J Mäuse im Alter von neun Wochen verwendet. Die Mäuse erhielten normales Laborfutter und Wasser *ad libitum*. Die Präparation der Mäuse erfolgte durch Dr. Kerstin Nagel-Wolfrum. Nach der Öffnung der Bauchdecke wurde der Darm entnommen. Dünndarm und Dickdarm wurden jeweils grob in einen proximalen und einen distalen Teil geteilt. Der als proximal bezeichnete Teil des Dünndarms reichte dabei von der Magenöffnung zu den ersten erkennbaren Mesenterien. Der distale Teil reichte von dort bis zum Caecum. Der proximale Teil des Dickdarms entsprach dem Bereich nach dem Caecum bis etwa zu dem Abschnitt, ab dem der Darminhalt die Form von Kotkugeln hatte, welche den distalen Teil des Dickdarms markierten. Die Inhalte der Darmabschnitte wurde jeweils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl TBS-Puffer überführt und gewogen. Anschließend wurden die Proben für 2 min gevortext, um das Pellet aufzubrechen. Die festen Bestandteile und Zellen wurden abzentrifugiert (Eppendorf, Tischzentrifuge; 6000 rpm; 5 min). Der Überstand wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C tiefgefroren.

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden die molekularbiologischen Methoden so durchgeführt, wie sie in Sambrook & Russell (2001) beschrieben sind. Für allgemeine molekularbiologische Arbeiten wurde der Stamm JM109 verwendet. Elektrokompente Zellen wurden nach Farinha & Kropinski (1990) hergestellt. Die Zucht der Vorkultur erfolgte über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm (EXCELLA E24, New Brunswick Scientific, Edison, USA) in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium. Die Hauptkultur erfolgte in Schikanekolben in 100 bis 200 ml LB-Medium bei 37 °C. Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase ( $OD_{578}$  von 0,5 bis 0,7) durch Zentrifugation (6000 rpm, 4 °C, 10 min; Eppendorf 5403, Hamburg) geerntet und mit Glycerin-MOPS zweifach gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml Glycerin-MOPS resuspendiert und bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert. Für die Elektroporation nach Dower *et al.* (1988) wurden 30 bis 50 µl der elektrokompenten Zellen mit 1 bis 4 µl der in Wasser gelösten Plasmid-DNA versetzt und in gekühlte und durch UV-Licht sterilisierte Elektroporationsküvetten (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem Eporater (Eppendorf, Hamburg) mit einem Puls von 2500 V. Zur Regeneration wurde der Transformationsansatz mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 1 h

bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl des Ansatzes auf selektiven LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Herstellung hitzekompetenter Zellen wurde 400 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln im Schikankolben bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 gezüchtet. Die Zellen wurden per Zentrifugation geerntet und zwei Mal mit TSB-Puffer gewaschen, und schließlich in 4 ml TSB-Medium resuspendiert. Für die Hitzeschocktransformation wurden 100 µl hitzekompetente Zellen mit 3 µl Plasmid-DNA vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Die Zellen wurden dann in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium aufgenommen und zur Regeneration für 2 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf selektiven Agar-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden.

### 4.5.1 Gerichtete Mutagenese

Punktmutationen wurden über gerichtete Mutagenese nach dem QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) eingeführt. Hierzu wurden komplementäre Primer (Tab. 3) erstellt, die den angestrebten Austausch enthielten. Für die PCR wurde die Phusion®-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze erfolgte wie in Tab. 6 dargestellt und nach dem Programm in Tab. 7. Nach der PCR erfolgte ein Restriktionsverdau mit *DpnI*, bei dem die methylierte Template-DNA verdaut wird. Anschließend wurde der Ansatz in hitzekompetente XL1-Blue Zellen transformiert und auf selektiven LB-Agar Platten ausplattiert. Zur Überprüfung der Mutagenese wurden die isolierten Plasmide mittels geeigneter Primer sequenziert (LGC Genomics GmbH, Berlin).

Tab. 6 Komponenten eines PCR-Ansatzes für die gerichtete Mutagenese.

Komponenten	Phusion
HF-Puffer	1x
dNTPs	je 250 µM
Primer	je 0,5 µM
Template DNA	50-100 ng
DMSO	0-8 %
Polymerase	1 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Tab. 7 PCR-Programm für die gerichtete Mutagenese. Schritte 2 bis 4 wurden 20-30-mal wiederholt.

Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]
1. Initiale Denaturierung	30	98
2. Denaturierung	10	98
3. Annealing	20	60-72
4. Elongation	15-30 /kb	72
5. Finale Elongation	600	72

### 4.5.2 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von chromosomalen Genen wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine zu überprüfende Kolonie gepickt und in ein steriles Reaktionsgefäß mit dem PCR-Ansatz überführt. Als Polymerase diente entweder die Taq-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) oder die LongAmp®-Taq Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA). Hierzu wurden Primer verwendet, die den zu testenden Bereich flankieren. Das PCR-Produkt konnte anschließend im Agarose-Gel und per Sequenzierung analysiert werden.

### 4.5.3 Stammkonstruktion per P1-Transduktion

Um in Stämmen einzelne Gene auszuschalten wurden P1<sub>kc</sub>-Phagen verwendet. Mit Hilfe von P1<sub>kc</sub> lassen sich DNA-Bereiche von bis zu 80 kB von einem *E. coli* Stamm auf andere Stämme übertragen. Als Donor dienten Stämme, bei denen die Zielgene durch Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette ausgeschaltet wurden. Im Rezipienten werden die Gene durch homologe Rekombination übertragen. Für die Herstellung von P1<sub>kc</sub>-Phagenlysaten wurde zunächst eine Übernachtskultur (in 5 ml LB-Medium) des Donorstammes mit 5 ml MC-Puffer versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Jeweils 100 µl dieser Bakteriensuspension wurde mit 100 µl einer P1<sub>kc</sub>-Phagenverdünnung versetzt und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Diese Mischung wurde mit 3 ml flüssigem R-Top-Agar vermischt, der zuvor auf 50 °C abgekühlt wurde. Der R-Top-Agar wurde anschließend auf vorgewärmte R-Agarplatten gegossen und gleichmäßig verteilt. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C für etwa 7 h wurde 2 ml LB-Medium zu den Platten gegeben und der R-Top-Agar in ein steriles Greinerröhrchen überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Chloroform und anschließendes Vortexen wurden noch intakte Zellen lysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und für die weitere Verwendung aliquotiert.

Für die Transduktion wurden 5 ml einer Übernachtskultur des Rezipientenstammes mit 3 ml MC-Puffer versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt, abzentrifugiert (1 min, 10000 rpm)



und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Jeweils 100  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden mit 10  $\mu$ l 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  und 100  $\mu$ l einer Verdünnung ( $10^0$  bis  $10^{-3}$ ) des zuvor hergestellten Phagenlysats vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 ml Na-Citrat Lösung und 0,5 ml LB-Medium sowie Schütteln bei 37 °C für 60 min wurde die weitere Infektion verhindert. Anschließend wurde der Transduktionsansatz durch Zentrifugation aufkonzentriert und vollständig auf selektiven LB-Agar-Platten ausplattiert. Bei erfolgreicher Transduktion konnten - nach Inkubation der Platten - Kolonien gepickt und erneut ausplattiert werden. Eine Überprüfung der Transduktion erfolgte mittels Kolonie-PCR.

## 4.6 Biochemische Methoden

### 4.6.1 SDS-PAGE

Für den Expressionsnachweis wurden die Proben per SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. SDS-PAGE erfolgte mit dem Mini-PROTEAN System bei 200 V für 50 Minuten (Bio-Rad, USA). Für die SDS-PAGE wurden 400  $\mu$ l der Zellen abzentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend mit Probenpuffer versetzt, resuspendiert und für 5 min bei 95 °C aufgekocht.

### 4.6.2 Immuno-Blot

Nach der Auftrennung über SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Semi-Dry-Westernblotting (Towbin *et al.* 1979) auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0,45 NC Membran, GeHealthcare) übertragen. Hierzu wurden die Nitrocellulosemembran auf zwei Lagen Chromatografiepapier gelegt. Darauf folgte das SDS-Gel und zwei weitere Lagen Chromatografiepapier. Alle Schichten wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte mit dem Pierce Fast Semi-Dry-Blotter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei 1,6 mA/cm<sup>2</sup> für 45 Minuten.

### 4.6.3 Antikörperfärbung

Die Membran wurde nach dem Blotten über Nacht bei 4 °C in Blockingpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der primären Antikörperlösung für 45 min. Darauf folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer für jeweils 5 min und die Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung. Danach folgten erneut drei Waschschrte für jeweils 5 min. Anschließend wurde die Membran für etwa 5 min mit HRP Entwicklersubstrat (Immobilon Western HRP Substrat; Merck Millipore, Billerica, USA) überschichtet. Über die

Lumineszenz wurde ein Röntgenfilm belichtet, der mit dem Röntgenfilm-Prozessor SRX-101 A (Konica Minolta, Japan) entwickelt wurde. Die entwickelten Filme wurden eingescannt (Scan 4400F, Canon, Japan) und mit der Software ImageJ analysiert (Schneider *et al.* 2012)

### 4.6.4 Bacterial Two Hybrid System (BACTH)

Die Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte nach Karimova *et al.* (1998) über das Bacterial Two-Hybrid System (BACTH). Hierbei werden die beiden Domänen T25 und T18 der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis* C- oder N-terminal an die zu testenden Proteine fusioniert. Für DcuB wurde außerdem ein Konstrukt verwendet, bei dem das T25-Fragment in eine cytoplasmatische Schleife von DcuB eingefügt wurde und deshalb als Sandwich-Konstrukt oder DcuB-SW-T25 bezeichnet wird (Witan 2012) (Abb. 6). Die beiden Fragmente sind alleine inaktiv, werden sie durch Interaktion der Zielproteine in räumliche Nähe gebracht, erlangen sie ihre Aktivität zurück und katalysieren die Umsetzung von ATP zu cAMP. Als Teststamm dient BTH101, der über keine Adenylatzyklase verfügt. Als Reporter dient die Expression von *lacZ*, die über cAMP und das Catabolite Activator Protein (CAP) induziert wird. Die Interaktion kann so mittels eines photometrischen Assays über die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase quantifiziert werden.

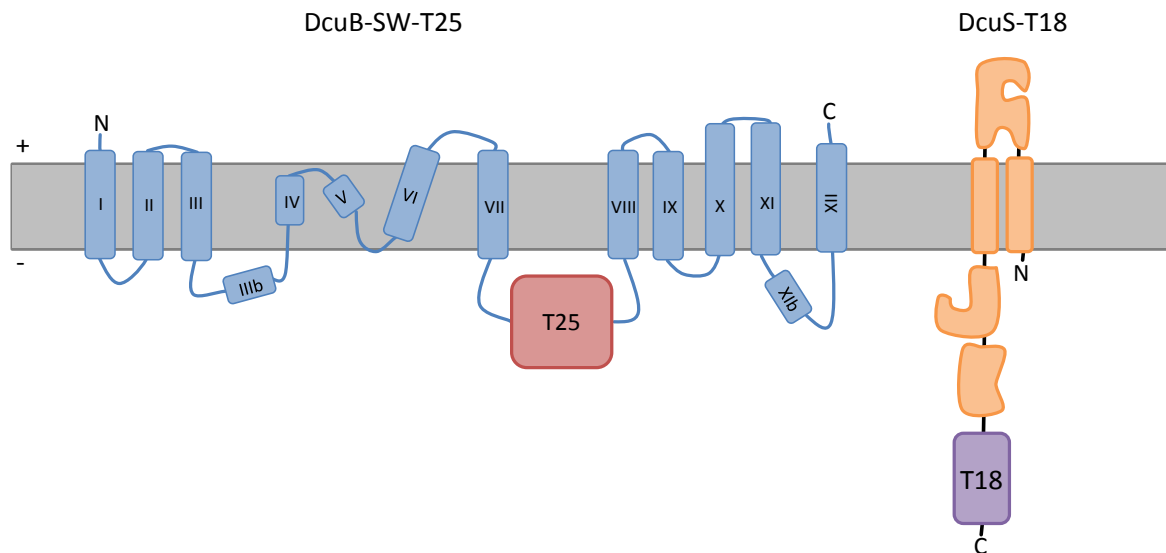


Abb. 6 Schematischer Aufbau des DcuB-Sandwich-Konstrukts (DcuB-SW-T25) und des verwendeten DcuS-T18 Konstruktes (nach Witan 2012).

### 4.6.5 Beta-Galaktosidase Test

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität erfolgte nach Miller (1992). Hierbei wird das chromogene Substratanalogon ONPG genutzt, das von der  $\beta$ -Galaktosidase zu Galaktose und 2-Nitrophenol gespalten wird. Letzteres kann bei einer Wellenlänge von 415 nm photometrisch nachgewiesen werden. Die Durchführung des Testes erfolgte in Mikrotiterplatten (MTP) nach einem modifizierten Protokoll (Griffith & Wolf 2002; Monzel *et al.* 2013).

Für die photometrischen Messungen der  $OD_{570}$  und der Extinktion bei 415 nm ( $E_{415}$ ) mit dem MTP-Reader (EL808, Biotek) wurden die MTP stets mit einem Volumen von 250  $\mu$ l befüllt. Dies gewährleistet eine gleiche Füllhöhe bei allen Proben; die Weglänge des Lichtstrahls in den Proben ist somit vergleichbar.

Nach der Zucht erfolgte zunächst die Bestimmung der  $OD_{570}$ . Bei Bedarf wurden die Proben mit Medium verdünnt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss. Hierzu wurden in Deepwell-Platten 800  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer. Es wurden unterschiedliche Zusätze für den Puffer verwendet. Während der Aufschluss im  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer nach Miller (1992) über SDS und Chloroform erfolgte, wurden in einer zweiten Variante CTAB und SDC zum Aufschluss verwendet. Als reduzierendes Agens wurde entweder  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT verwendet. Jeweils 200  $\mu$ l der Hauptkultur wurden mit einer automatischen Mehrkanalpipette (Rainin, Mettler-Toledo) zu 800  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer pipettiert. Der Aufschluss erfolgte über die Mischfunktion durch 10-maliges auf und ab Pipettieren. Anschließend wurden von jedem Well jeweils vier Aliquots à 150  $\mu$ l entnommen und in MTP pipettiert. Bei der Verwendung von Chloroform im  $\beta$ -Galaktosidase Puffer wurden die aufgeschlossenen Zellen vor dem Aliquotieren zunächst 15 min ruhen gelassen, damit sich das Chloroform absetzen konnte. Da Chloroform das Material der MTP angreift, konnte so eine Verschleppung vermieden werden. Die Verwendung des alternativen  $\beta$ -Galaktosidase Puffers vereinfachte diesen Schritt.

Die Proben wurden vor dem eigentlichen Test für 15 min auf 30 °C vorgewärmt und mit je 30  $\mu$ l einer ebenfalls auf 30 °C vorgewärmten ONPG-Lösung versetzt. Die Reaktion wurde nach 20 min durch die Zugabe von 70  $\mu$ l  $Na_2CO_3$  (1 M) gestoppt.

Die Berechnung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität erfolgte nach Miller (1992) über Gl. 1 oder Gl. 2.

$$\beta - \text{Galaktosidaseaktivität} = \frac{1000 \cdot \Delta E_{415}}{t \cdot V \cdot \Delta OD_{570}} \quad \text{Gl. 1}$$

Dabei ist  $\Delta E_{415}$  die Differenz zwischen der Extinktion bei 415 nm und dem Blindwert.  $t$  ist die Zeit zwischen Start der Reaktion durch Zugabe von ONPG und dem Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .  $V$  ist das Volumen der Kultur, die beim Zellaufschluss in den Test eingesetzt wurde und  $\Delta \text{OD}_{570}$  ist die Differenz zwischen der  $\text{OD}_{570}$  der Kultur und der OD des Blindwertes bei 570 nm. Die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten wurden jeweils von vier parallelen Zuchten und von jeder Zucht in Vierfachbestimmung ermittelt. Die Experimente wurden 2- bis 4-mal wiederholt. Der Blindwert der Extinktion bei 415 nm berücksichtigt zwar die unspezifische Spaltung von ONPG und den Hintergrund. Um zusätzlich für die Streuung auf Grund von Zelltrümmern zu korrigieren, wurde auch die erweiterte Gl. 2 verwendet. Hier wurde auch die  $\text{OD}^*_{570}$  der Reaktionslösung gemessen und von  $\Delta E_{415}$  abgezogen.

$$\beta - \text{Galaktosidaseaktivität} = \frac{1000 \cdot (\Delta E_{415} - \text{OD}^*_{570})}{t \cdot V \cdot \Delta \text{OD}_{570}} \quad \text{Gl. 2}$$

### 4.6.6 Transportmessungen

#### 4.6.6.1 Herstellung der Zellsuspension

Nach der Zucht erfolgte zunächst die Zellernte per Zentrifugation (8000 rpm, 6 min, 4 °C). Alle weiteren Schritte erfolgten stets auf Eis. Die Zellen wurden in Transportpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in Transportpuffer resuspendiert; die  $\text{OD}_{578}$  wurde auf 6 bis 8 eingestellt. Die verwendeten Puffer wurden vor der Benutzung anaerobisiert. Nach Herstellung der Zellsuspension wurde diese ebenfalls anaerobisiert.

#### 4.6.6.2 Durchführung der Aufnahmemessung

Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von 20 mM Glucose bei 37 °C für 5 min energetisiert. Die energetisierten Zellen wurden mit 100  $\mu\text{M}$  [2,3- $^{14}\text{C}$ ]-Fumarat versetzt und bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Aufnahme wurden 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in 900  $\mu\text{l}$  eisgekühlte LiCl-Lösung (0,1 M) überführt. Die Zellen wurden anschließend über Vakuumfiltration (FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Pharmacia Biotech) von dem Medium und Stopplösung abgetrennt. Hierzu wurden Glasfaserfilter (APFF, Ø25 mm, Porengröße 0,7  $\mu\text{m}$ , Millipore) oder Filter aus Cellulosemischester (ME24, Ø25 mm, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , Whatman) verwendet. Anschließend wurden die Filter zweimal mit je

1 ml 0,1M LiCl gewaschen, um Reste des Substrats zu entfernen. Zur Bestimmung des Blindwerts wurden 50 µl der Zellsuspension und 50 µl der Arbeitslösung des markierten Substrates direkt zu 900 µl eisgekühltem 0,1 M LiCl gegeben und sofort auf den Filter überführt. Die Filter wurden in Szintilationsvials aus Polyethylen (Roth oder Perkin Elmer) gegeben und mit 4 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth) versetzt. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität dpm (Desintegrations per Minute) über einen Flüssigszintillationszähler (Perkin Elmer). Über Gl. 3 wurde aus der gemessenen Radioaktivität die Aufnahmeaktivität in U/g TG berechnet.

$$\text{Aufnahmeaktivität} = \frac{\Delta\text{dpm} \cdot 10000}{a \cdot t \cdot 281 \text{ mg TG} \cdot \Delta\text{OD}_{578}} \quad \text{Gl. 3}$$

In dieser Formel entspricht  $\Delta\text{dpm}$  der Differenz zwischen der gemessenen Radioaktivität der Probe und des Blindwertes;  $a$  ist die spezifische Aktivität des verwendeten Fumarats in dpm/nmol;  $t$  entspricht der Zeit nach der die Aufnahme gestoppt wurde;  $\Delta\text{OD}_{578}$  ist die Differenz zwischen der OD der Zellsuspension im Transportansatz und des Blindwertes bei 578 nm. Für die Berechnung wurde angenommen, dass eine  $\text{OD}_{578}$  von 1 einem Trockengewicht von 281 mg entspricht (Zientz *et al.* 1996).

### 4.6.6.3 Kompetitionsmessungen

Für die Bestimmung des Substratspektrums von DcuB wurde die Aufnahme von markiertem Fumarat in Gegenwart verschiedener Kompetitoren bestimmt. Hierzu wurden 50 µl einer Suspension energetisierter Zellen zu 50 µl einer Lösung mit 100 µM [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat und 1 mM des zu testenden Kompetitors gegeben. Die Aufnahme wurde nach 0,5 min oder einer 1 min durch die Überführung in eisgekühltes LiCl (0,1 M) gestoppt. Die Messung der Aufnahmeaktivität erfolgte jeweils in zwei parallelen Ansätzen als Doppelbestimmung. Die Aufnahmeaktivität für [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat ohne Kompetitor wurde stets mitbestimmt und diente als Referenzwert. Die Aktivität in Gegenwart eines Kompetitors wurde relativ zu diesem Referenzwert angegeben.

### 4.6.7 Absolute Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA mittels SRM

Die im Folgenden beschriebene absolute Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA erfolgte an der Universität Greifswald durch Dr. Elke Hammer und Dr. Kristin Surmann.

### 4.6.7.1 Probenvorbereitung

Für die absolute Quantifizierung wurden Membranpellets von jeweils 80 OD<sub>578</sub>-Einheiten verwendet. Diese wurden in 300 µL UT-Lösung (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff) resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (50 W, 3 x 30 s auf Eis, SonoPuls, Bandelin electronic, Berlin). Die solubilisierten Proteine wurden per Zentrifugation abgetrennt und befanden sich im Überstand (20000 x g, 4 °C, 1 h). Um eine vollständige Solubilisierung zu gewährleisten, wurde das Pellet noch zwei Mal mit jeweils 150 µl UT-Lösung per Ultraschall aufgeschlossen. Der Proteingehalt der Überstände wurde mittels Bradford Assay (Biorad, München) ermittelt. Etwa 85 bis 95 % des gesamten Proteingehaltes waren im ersten Überstand zu finden. Im dritten Überstand wurde weniger als 1 % des gesamten Proteins gefunden. Aus diesem Grund wurden alle Membranpellets zweifach aufgeschlossen, um eine vollständige Solubilisierung zu gewährleisten.

### 4.6.7.2 Proteolytischer Verdau

Von jeder Probe wurden 4 µg Protein in einer wässrigen Ammonium-Bicarbonat-Lösung (20 mM) bis zu einer Harnstoff-Konzentration < 2 M verdünnt. Der Spike-in von schweren Peptiden erfolgte an dieser Stelle. Es folgte eine Reduktion der Proteine mit DTT (2,5 mM) bei 60 °C für 1 h. Anschließend wurden die Proben mit 10 mM Iodoacetamid für 30 min bei 37 °C im Dunkeln alkyliert. Vor dem Verdau erfolgte ein weiterer Verdünnungsschritt mit einer wässrigen Ammonium-Bicarbonat-Lösung (20 mM), um die Harnstoff-Konzentration unter 1 mM zu senken.

Für den Verdau wurde Trypsin (Promega GmbH, Mannheim) in einem Verhältnis Protease zu Protein von 1:25 (w/w) hinzugefügt. Nach 16 bis 18 h bei 37 °C wurde der Verdau durch Zugabe von 1 % (v/v) Essigsäurelösung gestoppt. Die Proben wurden abzentrifugiert (10 min, 16,000 g) und der Überstand weiterverwendet. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte über µC18-ZipTip Säulen (Merck Millipore, Darmstadt). Der Elutionspuffer wurde mittels Vakuumzentrifugation entfernt. Die aufgereinigten Peptide wurden in 20 µl 0.1 % (v/v) Essigsäurelösung mit 2 % (v/v) ACN gelöst. Bis zur Analyse der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

### 4.6.7.3 Absolute Quantifizierung mittels SRM

Die absolute Quantifizierung erfolgte mittels SRM (Single Reaction Monitoring) in Kombination mit schweren Standardpeptiden (JPT, Berlin). Diese enthielten Arginin und Lysinreste mit den schweren Isotopen <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N. Dadurch unterscheidet sich ihre Masse

von den natürlichen Peptiden der Proteine, was ihre Verwendung als interne Standards ermöglicht (Surmann *et al.* 2016). Bei den Standardpeptiden handelte es sich um proteotypische Peptide, welche eine eindeutige Identifizierung des Proteins ermöglichen (Kuster *et al.* 2005).

Die verwendeten Peptide sind in Tab. 8 aufgelistet. Für DctA und DcuS wurden jeweils vier Peptide ausgewählt. Für DcuB-PhoA wurden drei Peptide ausgewählt, wobei zwei für PhoA spezifisch waren und eins für DcuB. Zur Quantifizierung von DcuB wurde das für DcuB spezifische Peptid genutzt, um auszuschließen, dass *E. coli* PhoA die Quantifizierung verfälscht. Die schweren Standardpeptide wiesen produktionsbedingt einen C-terminalen Aminosäure-Tag auf, der aber während des tryptischen Verdaus abgespalten wurde. Ein nmol lyophilisiertes Pulver jedes Standardpeptids wurde in jeweils 100 µl Puffer aus 80 % (v/v) Ammoniumbicarbonat (100 mM) und 20 % (v/v) Acetonitril (ACN) gelöst. Die gelösten Peptide wurden in Aliquots à 10 µl bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs für die absolute Quantifizierung wurden Verdünnungsreihen der schweren Standardpeptide (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; und 100 fmol) mit jeweils 1 µg *E. coli* W3110 Membranprotein vermessen. Die Membranproteine dienten als Probenhintergrund.

Tab. 8 Ausgewählte Peptide für die Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA mit Position im Protein. Die ersten beiden DcuB-Peptide sind spezifisch für DcuB, die zwei weiteren stammen aus PhoA, da teilweise eine DcuB-PhoA Fusion verwendet wurde.

<b>Protein</b>	<b>Peptid</b>	<b>Position</b>
<b>DcuS</b>	TLADSPEIR	62-70
	ALNGEENVAINR	128-139
	LLLINTVPVR-310	300-309
<b>DctA</b>	AVAVYADQAK	116-125
	ATGFSIFK	244-251
	ALTNLVGNGVATIVVAK	384-400
	LDDVLNNR	410-418
<b>DcuB</b>	FISVPENR (DcuB)	209-216
	SGTTHIGR (DcuB)	407-414
	LTGDQTAALR (PhoA)	496-505
	NYAEGAGGFFK (PhoA)	534-544

Die SRM erfolgte wie bei Surmann *et al.* (2016): Zunächst wurden die Peptide mittels nano Acquity UPLC (Waters Corporation, Manchester, UK) chromatographisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels dem TSQ Vantage Triple Quadrupol LC/MS Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen). Die Parameter und Einstellungen sind in Tab. 9 aufgeführt. Als Kollisionsenergie wurde zunächst entsprechend des Masse/Ladungs-Verhältnisses der Peptide die Grundeinstellungen des Gerätes verwendet und anschließend variiert um die optimalen Parameter zu ermitteln. Für jede Bedingung wurden jeweils drei bis fünf biologische Replikate vermessen. Die zweifach geladenen Vorläuferpeptide und die vier häufigsten Produkte (Übergänge, engl. *transitions*) wurden bei der Datenerfassung für jedes Peptid ausgewählt. Paare von schweren und leichten Peptiden konnten auf Grund der gleichen Retentionszeit und des Elutionsprofils detektiert werden. Für die absolute Quantifizierung wurden die Peptide ausgewählt, die die höchste Intensität und das beste Signal/Rauschen-Verhältnis zeigten. Hierzu wurde jede Probe mit definierten Mengen der schweren Standardpeptide versetzt. Dabei wurde ein Verhältnis von schweren Peptid zu leichtem Probenpeptid von eins angestrebt. Aus dem Verhältnis der Peakflächen von schwerem Standardpeptid zum leichten Probenpeptid wurde das Protein absolut quantifiziert. Über die Zellzahl konnte die Kopienzahl pro Zelle berechnet werden.

Tab. 9 Parameter und Einstellungen für die Flüssigchromatographie und die Massenspektrometrie.

<b>LC-Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Instrument	NanoAcquity UPLC (Waters Corporation, Manchester, UK)
LC-Säule	NanoAcquity BEH130 C18 Säule (10 cm Länge, 100 $\mu$ M innerer Durchmesser und 1.7 $\mu$ m Partikelgröße, Waters Corporation)
LC-Puffer	A: 0.1% Essigsäure und 2% ACN in Wasser in HPLC Qualität (J. T. Baker, Center Valley, PA, USA) B: 0.1% Essigsäure in ACN
LC-Gradient	0 min-5% Puffer B / 3-10 / 26-35 / 32-60 / 33-90 / 38-90 / 39-0 / 42-0
Lösungsmittelflussrate	400 nL/min
<b>MS-Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
Instrument	TSQ Vantage Triple Quadrupol Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)
Auflösung	MS1 R=0,7 Halbwertsbreite (FWHM), MS2 R= 2,5 FWHM
Verweilzeit ( <i>dwel time</i> )	20 ms pro Übergang
Zykluszeit ( <i>cycle time</i> )	2.4 s/Zyklus



### 4.6.8 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der absoluten Kopienzahl von DcuS, DcuB und DctA pro Zelle, wurde die genaue Zellzahl bestimmt. Hierfür wurde die Kultur mit einer Verdünnungslösung nach Norris & Powell (1961) verdünnt. Da es sich bei *E. coli* um ein begeißeltes, und somit bewegliches, Bakterium handelt wurde der Verdünnungslösung 5 ml/l 35 %ige Formaldehydlösung zugesetzt. Die lichtmikroskopische Auszählung der Zellen erfolgte in einer Thoma-Zählkammer.

### 4.6.9 Bestimmung der Konzentration von C<sub>4</sub>-DC mittels LC-MS/MS

Die Bestimmung der Konzentrationen der C<sub>4</sub>-Dicarboxylate erfolgte in Kooperation mit Dr. Hannes Link am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg) über Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) (Guder *et al.* 2017).

## 4.7 Bioinformatische Methoden

Die Darstellung von 3D-Modellen erfolgte mit UCSF Chimera (v1.11.2) (Pettersen *et al.* 2004). Sequenzdaten wurden aus der Uniprot-Datenbank (The UniProt Consortium 2017) oder der KEGG Datenbank (Kanehisa & Goto 2000) geladen. Multiple Sequenzalignments erfolgten mit Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011) unter Standardeinstellungen.

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Überführung von DcuS in die C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-sensitive Form durch den Transporter DcuB

Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsel von *Escherichia coli* wird vor allem durch die Sensorhistidinkinase DcuS und den Antwortregulator DcuR reguliert. Die Sensorkinase und der Antwortregulator zusammen bilden das DcuSR-Zweikomponentensystem (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999). Liegen C<sub>4</sub>-Dicarboxylate im Medium vor, induziert DcuSR die Expression verschiedener Zielgene. Im Gegensatz zu klassischen Zweikomponentensystemen sind bei dem DcuSR-System weitere Komponenten beteiligt (Stock *et al.* 2000; Tetsch & Jung 2009). In Abwesenheit des aeroben Transporters DctA, beziehungsweise des anaeroben Transporters DcuB befindet sich DcuS in einem konstitutiven ON-Zustand (Kleefeld *et al.* 2009; Davies *et al.* 1999). Ist einer der beiden Transporter vorhanden, ist die Aktivität von DcuS abhängig von der Gegenwart von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten. Dabei konnte sowohl für DctA als auch für DcuB gezeigt werden, dass ein DcuS/Transporter Komplex vorliegt (Witan *et al.* 2012a; Witan *et al.* 2012b; Wörner *et al.* 2016). Dies führte zu der Hypothese, dass DcuB und DctA als Kosensoren von DcuS dienen und an der Signalerkennung direkt beteiligt sind. Der Transporter/DcuS Komplex hat diesem Modell zu Folge zwei potentielle Signaleingangsstellen, die beide für die Aktivierung der Signaltransduktion benötigt werden. Dabei wurde postuliert, dass die Transporter Fluxsensoren seien, während DcuS selbst die Konzentration von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten detektiert. Für den aeroben Transporter DctA hingegen konnte bereits gezeigt werden, dass DctA zwar für die ordnungsgemäße Funktion von DcuS notwendig ist, nicht jedoch an der Signalerkennung beteiligt ist (Steinmetz *et al.* 2014). Im Folgenden sollte daher die Rolle des Transporters DcuB für die Funktion des DcuB/DcuS-Sensorkomplexes weiter charakterisiert werden. Hierfür wurde zunächst die Bedeutung von DcuB für die Signalerkennung untersucht.

Sowohl DcuS als auch DcuB verfügen über eine Substratbindestelle. DcuS bindet C<sub>4</sub>-Dicarboxylate über die periplasmatische PAS<sub>P</sub> Domäne (Unden *et al.* 2016a; Kneuper *et al.* 2005; Krämer *et al.* 2007; Pappalardo *et al.* 2003; Cheung & Hendrickson 2008). Für DcuB wurden die Varianten E79A, R83A und R127A beschrieben, die nicht mehr in der Lage sind Succinat zu transportieren, aber weiterhin einen regulatorischen Einfluss auf DcuS besitzen (Kleefeld *et al.* 2009). Es stellt sich die Frage, ob beide Substratbindestellen des DcuS/DcuB-

Sensorkomplexes auch tatsächlich an der Signalerkennung beteiligt sind oder ob eine der beiden potentiellen Signaleingangstellen bereits ausreicht. Dabei verfügen sowohl DcuB als auch DcuS über ein relativ breites Substratspektrum (Kneuper *et al.* 2005; Krämer *et al.* 2007; Steinmetz *et al.* 2014; Six *et al.* 1994). Beide erkennen C<sub>4</sub>-Dicarboxylate wie Fumarat, L-Malat oder Succinat. Allein anhand dieser Effektoren lässt sich der Beitrag der beiden Proteine zur Signalerkennung nicht differenzieren. Deshalb sollte überprüft werden, inwiefern sich die Substrate, die zu einer Induktion der *dcuB-lacZ* Reporterfusion führen, mit den Substraten überschneiden, die die Aufnahme von radioaktiv markiertem Fumarat über DcuB inhibieren.

### 5.1.1 Die Signalerkennung im DcuS/DcuB-Sensorkomplex

Die folgenden Ergebnisse zur Substratspezifität von DcuS und DcuB und der Signalerkennung im DcuS/DcuB-Sensorkomplex wurden in meiner Diplomarbeit beschrieben (Wörner 2013). Die Daten wurden durch den Effektor m-Tartrat ergänzt.

#### 5.1.1.1 Substratspektrum des Sensors DcuS

Für die Bestimmung des Substratspektrums von DcuS wurde der DcuS-defiziente Stamm IMW260 (*dcuS::cam<sup>R</sup>*) verwendet, der außerdem eine chromosomale *dcuB-lacZ* Reporterfusion trägt (Zientz *et al.* 1998). Das Gen des Sensors *dcuS* wurde über das Plasmid pMW181 in den Stamm eingeführt und von dem wildtypischen DcuS-Promotor exprimiert. Da das DcuSR System unter anaeroben Bedingungen die Expression von *dcuB-lacZ* induziert, konnte so die Aktivität von DcuS in Gegenwart verschiedener Effektoren bestimmt werden. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium, dem Glycerin (50 mM) als Kohlenstoffquelle und DMSO (20 mM) als zusätzlicher Elektronenakzeptor hinzugefügt wurden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Aktivität von DcuS.

Nahezu alle C<sub>4</sub>-Dicarboxylate induzieren die Expression von *dcuB-lacZ* (Abb. 7). Insbesondere Fumarat, Maleinat, L-Tartrat sowie D-Malat führen zu einer starken Induktion. Auch die Effektoren L-Malat, L-Aspartat, D-Tartrat und m-Tartrat führen zu einer eindeutigen Induktion des Reportergenes *dcuB-lacZ*. Neben C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten wurden auch Substrate getestet, die strukturelle Ähnlichkeit mit C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten aufweisen. 3-Nitropropionat beispielsweise entspricht einem Succinat-Molekül, bei dem eine Carboxylgruppe durch eine Nitrogruppe ersetzt wurde. Citrat entspricht L-Malat mit einer zusätzlich Acetylgruppe. Bei beiden war noch eine leichte Induktion zu beobachten. Dabei ist zu beachten, dass 3-Nitropropionat nur in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt wurde, da es in höheren Konzentrationen wachstumshemmend wirkt (Bock 2004).

Es wurde außerdem der Effekt von Itaconat, Phenylsuccinat und Malonat auf die Expression von *dcuB-lacZ* untersucht. Itaconat und Phenylsuccinat sind C<sub>4</sub>-Dicarboxylate mit einer zusätzlichen Ethylen- bzw. Phenylgruppe. Malonat ist eine C<sub>3</sub>-Dicarbonsäure. Während Itaconat einen sehr schwachen Einfluss auf die Induktion von *dcuB-lacZ* zeigte, lag die Aktivität nach Zucht in Gegenwart von Phenylsuccinat und Malonat auf dem Niveau der Kontrolle (Anhang Abb. A 1).

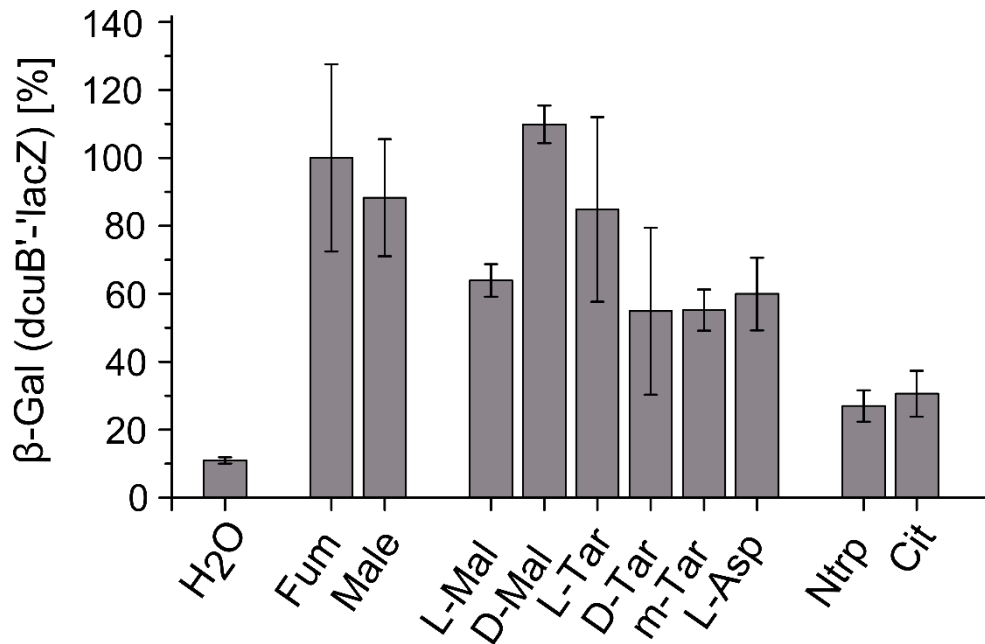


Abb. 7 Effektoren der anaeroben Induktion von *dcuB-lacZ* in IMW260 (*dcuS::cam<sup>R</sup>*, *dcuB-lacZ*) mit pMW181 (*pdcuS*). Gemessen wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nach anaerober Zucht in eM9 mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO durch verschiedene Effektoren: Fumarat (Fum), Maleinat (Male), L-Malat (L-Mal), D-Malat (D-Mal), L-Tartrat (L-Tar), D-Tartrat (D-Tar), meso-Tartrat (m-Tar), L-Aspartat (L-Asp), 3-Nitropropionat (Ntrp), Citrat (Cit). Die Effektoren lagen in einer Konzentration von 20 mM (Nitropropionat: 5 mM) vor.

#### 5.1.1.2 Substratspezifität von DcuB

Die Bestimmung der Substratspezifität des Transporters DcuB erfolgte über die Messung der Transportaktivität von Fumarat. Über einen Filtrationsassay kann die Aufnahme von radioaktiv markiertem [2,3<sup>14</sup>C]-Fumarat in die Zelle bestimmt werden. Da nicht alle in Frage kommenden Effektoren in markierter Form verfügbar sind, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Hierbei wurde die Aufnahme von [2,3<sup>14</sup>C]-Fumarat in die Zelle in Gegenwart von unmarkierten Substraten gemessen. Ein Transport oder eine Bindung dieser Substrate durch die Transportdomäne von DcuB sollte zu einer kompetitiven Hemmung der Aufnahme von [2,3<sup>14</sup>C]-Fumarat führen.

Um das Substratspektrum von DcuB zu testen wurde der Stamm IMW213a (*dcuA*, *dcuB*, *dcuC*, *dctA*) mit plasmidkodiertem DcuB (pMW228) verwendet. In dem Stamm wurden die Gene der C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter *dcuA*, *dcuB*, *dcuC* und *dctA* durch Insertion von Antibiotikaresistenzkassetten ausgeschaltet. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9 unter Zusatz von Glycerin (50 mM) als Kohlenstoffquelle, Fumarat (50 mM) als Elektronenakzeptor und DMSO (20 mM) als zusätzlichem Elektronenakzeptor. Die Zellen wurden geerntet und eine Zellsuspension hergestellt. Vor der Zugabe des Substrates wurden die Zellen 5 min bei 37 °C mit 20 mM Glucose energetisiert. Anschließend wurden 50 µM [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat zu den Zellen gegeben. Für die Kompetitionsmessung wurde neben dem radioaktiv markierten Substrat der zehnfache Überschuss des zu testenden Kompetitor-Substrates zugesetzt.

Wie auch DcuS, erkennt DcuB verschiedene C<sub>4</sub>-Dicarboxylate. So wurde die Aufnahme von [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat durch nicht markiertes Fumarat, L-Malat, D-Malat, D-Tartrat und Aspartat gehemmt (Abb. 8). Die Substrate L-Malat, L-Aspartat und D-Tartrat haben dabei den stärksten Effekt gezeigt.

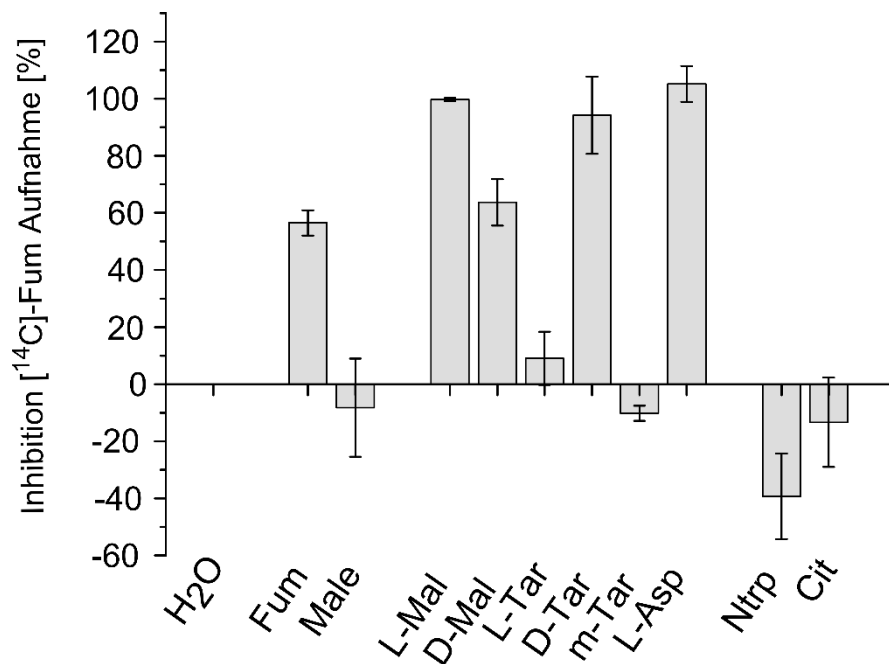


Abb. 8 Inhibition der Aufnahme von [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat in IMW213a mit pMW228 nach anaerober Zucht in eM9 mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO und 20 mM Fumarat. Die Inhibition wurde auf H<sub>2</sub>O normiert (0 %). Vor der Messung der Aufnahmeaktivität wurden die Zellen 5 min mit 20 mM Glucose energetisiert. Nach Zugabe von 50 µM [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat und 500 µM des Kompetitors wurden die Zellen für 1 min bei 37 °C inkubiert. Nach 1 min wurde die Aufnahme gestoppt und die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Die verwendeten Kompetitoren waren: H<sub>2</sub>O, Fumarat (Fum), Maleinat (Male), L-Malat (L-Mal), D-Malat (D-Mal), L-Tartrat (L-Tar), D-Tartrat (D-Tar), meso-Tartrat (m-Tar), L-Aspartat (L-Asp), 3-Nitropropionat (Ntrp), Citrat (Cit).

Einige gute Induktoren der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, wie Maleinat und L-Tartrat, hatten dabei nur einen geringen oder keinen Einfluss auf die Aufnahme von markiertem Fumarat. Auch 3-Nitropropionat und Citrat, die beide zu einer schwachen Induktion von *dcuB-lacZ* führten, hemmten nicht die Aufnahme von [2,3- $^{14}$ C]-Fumarat in die Zelle.

### 5.1.1.3 Konzentrationseffekte von Maleinat und Nitropropionat auf die Aufnahme von [2,3- $^{14}$ C]-Fumarat

Während die Effektoren bei der Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in einer Konzentration von 20 mM hinzugegeben wurden, lagen die Kompetitoren bei der Bestimmung der Substratspezifität von DcuB in einer Konzentration von 500  $\mu$ M vor. Da die beiden Effektoren Maleinat und Nitropropionat keinen Effekt auf die Aufnahme von [2,3- $^{14}$ C]-Fumarat hatten, aber durchaus die Expression von *dcuB-lacZ* induzieren, kommen sie als spezifische Effektoren von DcuS in Frage. Um auszuschließen, dass sie in höheren Konzentrationen, wie sie bei dem  $\beta$ -Galaktosidase-Assay vorlagen, einen Effekt auf die Transportaktivität haben, wurde die Aufnahme von [2,3- $^{14}$ C]-Fumarat in Gegenwart steigender Konzentrationen von Maleinat und Nitropropionat gemessen (Abb. 9).

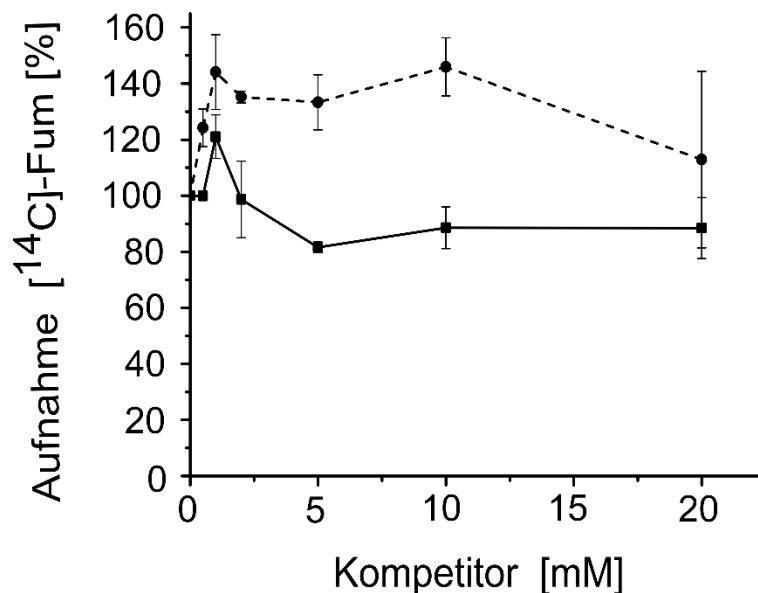


Abb. 9 Aufnahme von [2,3- $^{14}$ C]-Fumarat in IMW213a mit pMW228 in Gegenwart steigender Konzentrationen von 3-Nitropropionat (●) oder Maleinat (■). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO und 20 mM Fumarat. Vor Messung der Aufnahmeaktivität wurden die Zellen 5 min mit 20 mM Glucose energetisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ M [2,3- $^{14}$ C]-Fumarat und des Kompetitors (Maleinat oder Nitropropionat). Die Kompetitoren wurden in einer Konzentration von 0 bis 20 mM hinzugegeben. Nach 1 min wurde die Aufnahme gestoppt und die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Die aufgenommene Radioaktivität in Abwesenheit eines Kompetitors wurde als 100 % gewählt.

Trotz steigender Konzentration der beiden Effektoren, konnte keine Hemmung der Aufnahme von [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat beobachtet werden. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass beide Substrate zwar von DcuS erkannt werden, jedoch kein Transportsubstrat von DcuB darstellen.

### 5.1.2 Die Interaktion zwischen DcuS und DcuB

Der Sensor DcuS ist in Abwesenheit eines Koregulators konstitutiv aktiv, und erst in Anwesenheit des anaeroben Transporters DcuB oder des aeroben Transporters DctA spricht DcuS auf die Anwesenheit von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten an (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009; Steinmetz *et al.* 2014). Für den aeroben Transporter DctA konnte gezeigt werden, dass die Regulation von DcuS über eine direkte Protein-Protein-Interaktion (PPI) zwischen DcuS und DctA vermittelt wird (Witan *et al.* 2012a). Für DcuB stehen weniger Daten zur Verfügung. Da sowohl der N-Terminus, als auch der C-Terminus von DcuB im Periplasma gelegen sind, sind C- oder N-terminale Fusionen für BACTH oder FRET Untersuchungen nicht geeignet (Bauer *et al.* 2011; Bauer 2010). Aus diesem Grunde wurde das T25-Fragment in eine cytoplasmatische Schleife zwischen Helix VII und VIII kloniert (Witan 2012). Dieses Konstrukt wurde als Sandwich-Konstrukt bezeichnet und zeigte eine schwache, aber eindeutige Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase im BACTH Assay (Witan 2012). Außerdem wurde die Interaktion durch Ko-Chromatographie Experimente (mHPINE) bestätigt (Wörner *et al.* 2016). Die interagierende Domäne von DcuB ist bisher unbekannt. Für DctA konnte die Bedeutung der Helix 8b für die Interaktion demonstriert werden (Witan *et al.* 2012a). Für den anaeroben Transporter wird zwar die vorhergesagte Helix XIb als möglicher Kandidat für die Interaktionsstelle betrachtet, bisher fehlen allerdings experimentelle Belege für diese Vermutung (Witan 2012).

Im Folgenden sollte die Interaktion zwischen DcuS und DcuB näher charakterisiert werden. So sollte der Einfluss von Fumarat auf die Interaktion getestet werden und versucht werden, die Interaktionsstelle zwischen DcuS und DcuB zu identifizieren.

#### 5.1.2.1 Einfluss von Fumarat auf die Interaktion von DcuS und DcuB

Es wurde spekuliert, dass sich Sensorkomplexe von Sensorhistidinkinasen mit akzessorischen Proteinen abhängig von der Gegenwart oder Abwesenheit des Effektors bilden (Tetsch & Jung 2009; Hsieh & Wanner 2010). Auch für DcuS wurde ein möglicher Einfluss von Fumarat auf die Interaktion mit seinen Koregulatoren DcuB und DctA spekuliert (Witan *et al.* 2012a).

Um den Einfluss von Fumarat auf die Interaktion von DcuB und DcuS zu charakterisieren, wurde ein BACTH-Test durchgeführt. Die Zucht erfolgte in LB-Medium ohne Zusatz von

Fumarat, oder unter Zugabe von Fumarat (20 mM). Anschließend erfolgte die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als Maß für die Interaktion. Das Sandwich-T25 Konstrukt wurde dabei entweder mit einem T18-DcuS Konstrukt oder dem DcuS-T18 Konstrukt zusammen getestet. Die Interaktion von DcuB-SW mit dem T18-DcuS war dabei nur sehr schwach und konnte durch die Zugabe von Fumarat nicht wesentlich beeinflusst werden (Abb. 10). Die Aktivität bei der Kombination von DcuB-SW mit dem DcuS-18 Konstrukt war deutlich höher. Hier ließ sich eine geringfügige Reduktion der Aktivität durch die Zugabe von Fumarat beobachten. Da nur ein funktionierendes BACTH-Konstrukt von DcuB als Fusion mit dem T25 Fragment vorliegt, konnten weitere Kombinationen nicht getestet werden. Bei früheren Tests zum Einfluss von Fumarat auf die Interaktion zwischen DcuS und DctA im BACTH-System konnte beobachtet werden, dass Fumarat je nach getesteter Fusionskombination, einen aktivierenden oder einen hemmenden Effekt auf die Interaktion hat (Witan 2012; Wörner *et al.* 2016). Wahrscheinlich bedeuten diese Daten nicht, dass die Interaktion aufgehoben wird, sondern dass es durch den Einfluss der Effektoren zu einer Modulation der Interaktion kommt.

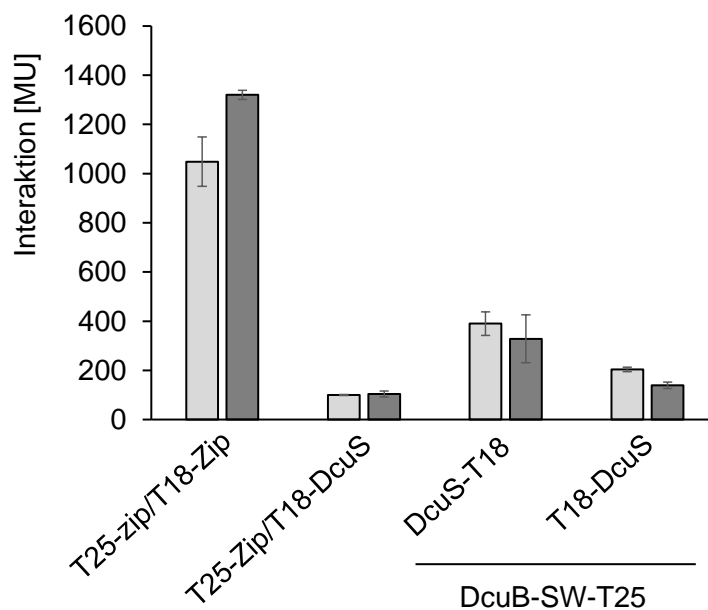


Abb. 10 Die Interaktion von DcuS-T18 und T18-DcuS mit DcuB-SW in Gegenwart von 20 mM Fumarat (■), oder ohne Fumarat (□) wurde mittels BACTH bestimmt. Als Kontrolle diente T25-Zip/T18-Zip sowie die Kombination T25-Zip/T18-DcuS.



### 5.1.2.2 Die Helix XIb von DcuB als mögliche Interaktionsfläche

Für den aeroben Transporter DctA wurde gezeigt, dass die C-terminale cytoplasmatische Helix 8b für die Interaktion mit dem Sensor DcuS wichtig ist (Witan *et al.* 2012a). Der C-Terminus des anaeroben Transporters DcuB liegt nicht im Cytoplasma, dennoch lässt sich hier eine cytoplasmatische Schleife identifizieren, die nach einer *ab initio* Strukturvorhersage eine Helix enthält (Witan 2012). Diese Helix XIb weist ein ähnliches Strukturmotiv auf, wie die Helix 8b von DctA und kommt somit als Interaktionsstelle für die Interaktion mit DcuS in Frage.

Ähnlich dem LDxxLxxxL Motiv aus Helix 8b von DctA, besitzt die vorhergesagte Helix XIb von DcuB ein konserviertes AxxxAxxxA Motiv, das zur Anordnung der drei Ala-Reste auf der der gleichen Seite in drei aufeinanderfolgenden Windungen einer  $\alpha$ -Helix führt. Dabei ist die erste Position des Motivs relativ schwach konserviert, während die dritte Position A385 in den hier untersuchten DcuB-Proteinen zu 100 % konserviert ist (Abb. 11). Interessanterweise liegen die zwei Reste D398 und T394 ganz in der Nähe, deren Mutation die regulatorische Funktion von DcuB stört (Kleefeld *et al.* 2009).

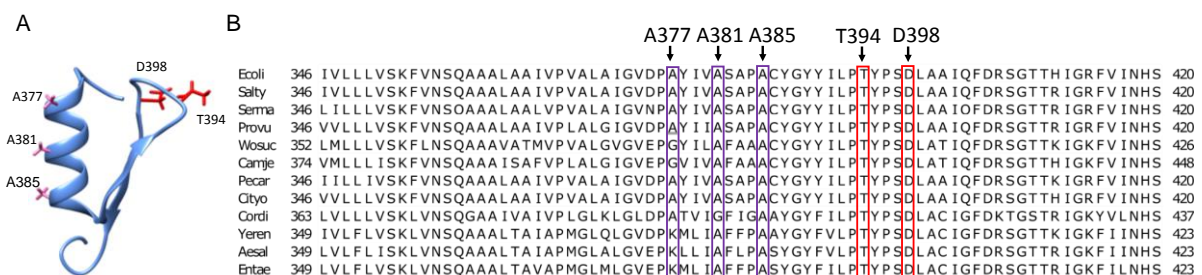


Abb. 11 A: Strukturvorhersage von Helix XIb von DcuB (Witan 2012). Die drei konservierten Alanin Reste A377, A381 und A381 bilden ein AxxxAxxxA Motiv. B: Alignment von DcuB von Position 346 bis Position 420. Ecoli: *Escherichia coli*, Salty: *Salmonella typhimurium*, Serma: *Serratia marescens*, Provu: *Proteus vulgaris*, Wosuc: *Wolinella succinogenes*, Camje: *Campylobacter jejuni*, Pecar: *Pectobacterium carotovorum*, Cityo: *Citrobacter youngae*, Cordi: *Corynebacterium diphtheriae*, Yeren: *Yersinia enterocolitica*, Aesal: *Aeromonas salmonicida*, Entae: *Enterobacter aerogenes*.

### 5.1.2.3 Gerichtete Mutagenese in Helix XIb

Um die Bedeutung der Helix XIb für die Regulation von DcuS durch DcuB weiter zu charakterisieren wurden Varianten von DcuB erstellt, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden. Hierzu wurden die drei Alaninreste A375, A381 und A385 durch die polare Aminosäure Serin ersetzt. Auch in benachbarten Positionen wurden Serinreste eingeführt. Diese Varianten wurden über einen Plasmidvektor (pMW2334) in den DcuB-negativen Reporterstamm IMW503 eingeführt ( $\Delta dcuB$ , *dcuB-lacZ*). Nach anaerober Zucht in eM9-Medium in Abwesenheit von Fumarat wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Wie

beschrieben weist der Reporterstamm ohne Plasmid eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf (Kleefeld *et al.* 2009). Diese konstitutive Aktivität von DcuS kann komplementiert werden, indem ein regulatorische intaktes DcuB von einem Plasmid exprimiert wird. In Gegenwart des wildtypischen DcuB-PhoA sinkt die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität deutlich ab. DcuS ist nicht mehr konstitutiv aktiv. Die meisten der getesteten Varianten zeigten ebenfalls ein wildtypisches Verhalten und konnten den *dcuB*-Effekt aufheben (Abb. 12). Einzelne Varianten, wie P376S und A381S, zeigten im Vergleich zum Wildtyp zwar eine leicht erhöhte Aktivität, diese befand sich aber auf einem vergleichbaren Niveau. Bei den Varianten V380S, A385D, A385E wurde jedoch eine deutlich erhöhte Induktion von *dcuB-lacZ* beobachtet. Die Aktivität dieser Varianten entsprach etwa der Aktivität des DcuB-defizienten Stammes. Auch eine Variante bei der die beiden Reste A381 und A385 durch Serin ersetzt wurden, zeigte eine erhöhte Aktivität. Diese ist jedoch etwas niedriger, als die Aktivität in dem DcuB-defizienten Stamm.

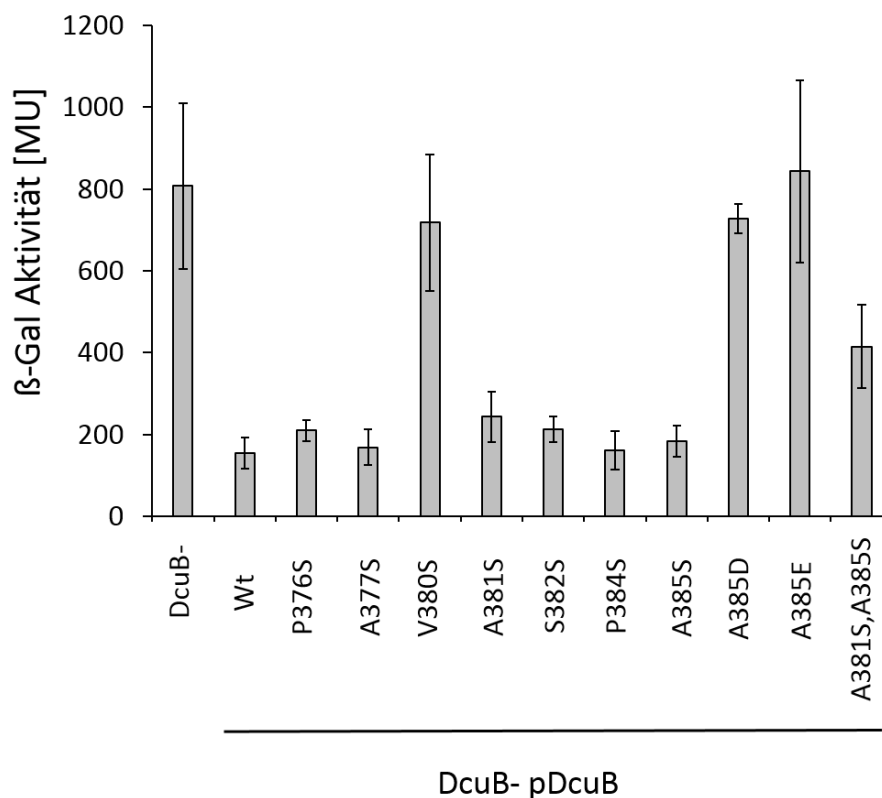


Abb. 12 Einfluss von Helix XIb auf die Expression von *dcuB-lacZ*. Die Expression von *dcuB-lacZ* wurde nach anaerober Zucht in eM9 Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Die Messung erfolgte mit dem Stamm IMW503 ( $\Delta$ *dcuB*, *dcuB-lacZ*) oder IMW503 mit einer plasmidkodierten Variante von DcuB-PhoA.

5.1.2.4 Überprüfung der Expression von DcuB-Varianten

Um sicherzugehen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf eine gestörte regulatorische Funktion von DcuB zurückzuführen sind, wurde per Immunoblot die Expression der DcuB-PhoA Varianten untersucht. Bei etwas unter 100 kDa konnte eine Bande ausgemacht werden, die wahrscheinlich DcuB-PhoA entspricht (Abb. 13). In dem DcuB-negativen Stamm ohne das Plasmid konnte die Bande nicht detektiert werden. Für die Variante V380S konnte allerdings nur eine sehr schwache Bande detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass diese Variante nicht richtig gebildet wird. Wahrscheinlich ist der beobachtete Effekt somit nicht auf die Störung der regulatorischen Aktivität im Komplementationstest zurückzuführen, sondern auf ein Fehlen von DcuB.

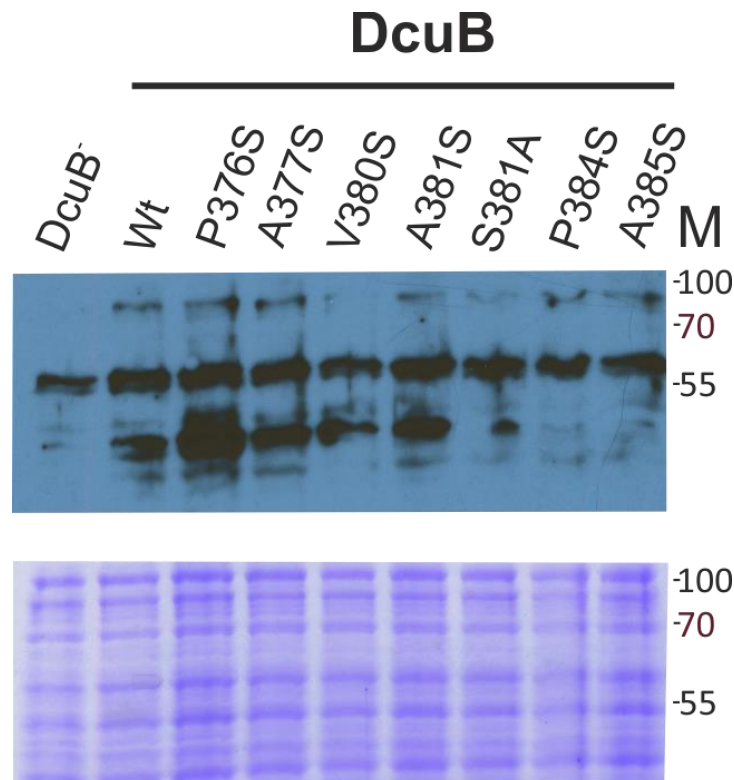


Abb. 13 Die Expression der DcuB-PhoA Varianten wurde mittels Immunoblot (oben) überprüft. 1. AK Anti-PhoA 1:10000, 1,5 h; 2. AK: Anti-Mause, 1:10000, 1 h. Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen.

5.1.2.5 Wachstumskomplementation durch die DcuB-Varianten

Um die Untersuchung der Funktionalität der DcuB-Varianten abzurunden, wurde auch die Fähigkeit getestet, das Wachstum auf Fumarat als einzigem Elektronenakzeptor zu komplementieren. Hierzu wurde der Stamm IMW505 verwendet, der neben einer Deletion von *dcuB* eine Spectinomycinkassette in *dcuA* und eine Chloramphenicolkassette in *dcuC* enthält, sodass alle relevanten anaeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter ausgeschaltet wurden (Kleefeld

2006). Während der Stamm in Gegenwart des leeren pBAD33 Vektors nur ein langsames Wachstum zeigte und auch nach über 60 h Wachstum erst eine  $OD_{578}$  von 0,184 erreichte, zeigte der Stamm mit plasmidkodiertem DcuB-PhoA ein deutlich stärkeres Wachstum. Hier wurde nach 64 h eine  $OD_{578}$  von 1,24 erreicht. Die Varianten A385D und A385E zeigten ein dem Leervektor vergleichbares Wachstum. Sie konnten den Wachstumsdefekt nicht ausgleichen. Die Doppelvariante DcuB-PhoA A381S A385S, die einen partiellen Verlust der regulatorischen Aktivität zeigte (Abb. 12), wies auch einen deutlichen Wachstumsdefekt auf (Abb. 14). Sie zeigte ein besseres Wachstum als die Einzelvarianten, erreichte aber nach 64 h nur eine  $OD_{578}$  von 0,52. Dies deutet darauf hin, dass diese Variante nicht nur in ihrer regulatorischen Funktion eingeschränkt ist, sondern auch in der Transportfunktion.

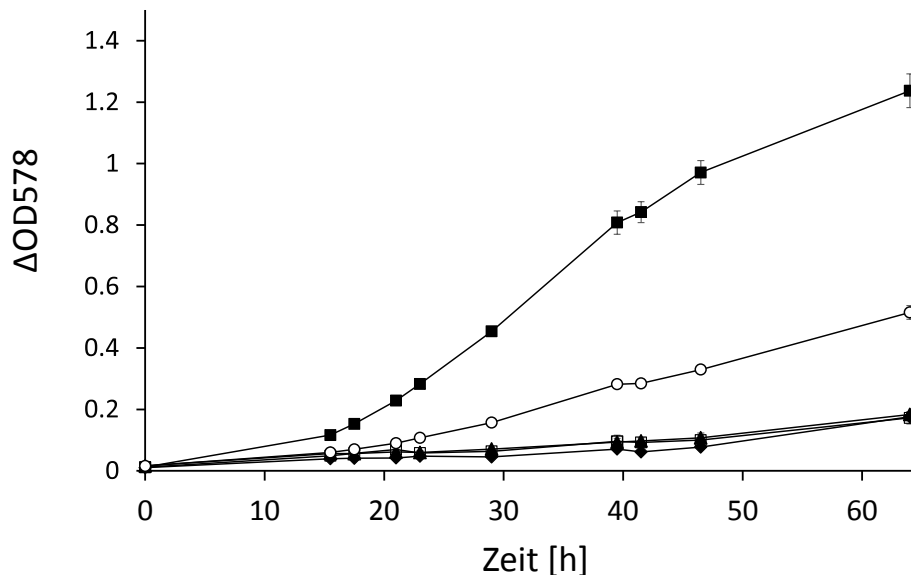


Abb. 14 Anaerobes Wachstum von IMW505 mit plasmidkodiertem DcuB-PhoA in eM9 mit Glycerin (50 mM) und Fumarat (20 mM). Die Funktionalität der DcuB-PhoA Varianten A385D (□), A385E (◆) und A381SA385S (○) wurde mit wildtypischem DcuB-PhoA (■) verglichen. Als Negativkontrolle diente IMW505 mit dem Leervektor pBAD33 (▲).

Die regulatorisch defizienten Varianten DcuB-PhoA A385D und A385E haben neben ihrer regulatorischen Funktion auch ihre Transportfunktion verloren. Dieser Verlust beider essentieller Funktionen von DcuB deutet darauf hin, dass der Verlust der regulatorischen Aktivität wahrscheinlich auf ein dysfunktionales Protein zurückzuführen ist, und nicht auf einen spezifischen Effekt durch den gezielten Austausch des Restes A385. Ein ähnlicher Schluss lässt sich aus dem Wachstumsverhalten der Doppelvariante ziehen. Sie zeigte sowohl einen teilweisen Verlust der regulatorischen, als auch ein vermindertes Wachstum. Die Variante ist möglicherweise in ihrer Stabilität beeinträchtigt, sodass beide Funktionen nur zu einem

gewissen Grad erfüllt werden können. Es ist hier also auch eher von einem unspezifischen Effekt auszugehen, der keine Rückschlüsse auf die Bedeutung der ausgetauschten Reste für die Interaktion mit DcuS erlaubt.

### 5.1.2.6 Komplementation der regulatorischen Mutanten von DcuB durch ungerichtete Mutagenese von DcuS

Durch ungerichtete Mutagenese konnten Reste in DcuB identifiziert werden, die für die Regulation von DcuS wichtig sind (Kleefeld *et al.* 2009). Die DcuB Varianten K353A, T394I und D398N sind nicht in der Lage den regulatorischen Effekt einer DcuB-Deletion zu komplementieren. Sie sind aber weiterhin transportaktiv. Damit ist es wahrscheinlich, dass die Reste an einer funktionellen Interaktion mit DcuS beteiligt sind. Um die Interaktionsstelle auf der Seite von DcuS zu charakterisieren sollten per ungerichteter Mutagenese nach Cadwell & Joyce (1992) in einem Screeningverfahren kompensatorische Varianten von DcuS identifiziert werden, die bei Kombination mit einer der drei regulatorischen DcuB-Varianten K353A, T394I und D398N wieder den regulatorischen Phänotyp des Wildtyps aufweisen.

Für das Experiment sollte ein Derivat des DcuS-Expressionsplasmids pMW181 als Template dienen, bei dem über gerichtete Mutagenese eine *NdeI*- und eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt wurden, die den zu mutierenden Bereich flankieren. In Vorversuchen wurde das Screeningverfahren zur Suche nach regulationspositiven Mutationen getestet. Hierzu wurde der Teststamm IMW536 verwendet. Er weist einerseits einen *dcuB-lacZ* Reporterfusion auf; außerdem wurden die Gene *dcuS* und *dcuB* durch Antibiotikaresistenzkassetten ausgeschaltet (Kleefeld 2006). Dieser Stamm wurde entweder nur mit pMW181 (*pdcuS*) transformiert, oder in einer Ko-Transformation mit pMW181 und einem der Plasmide pMW508, pMW397 oder pMW405 transformiert. Diese Plasmide dienen der Expression der regulatorischen Varianten von DcuB (Kleefeld *et al.* 2009). Ausplattiert auf X-Gal-eM9-Agar mit Fumarat (20 mM) oder ohne Fumarat, sollten die Kolonien sich entweder blau färben (DcuS +/- Fumarat, DcuS und regulatorisch defizientes DcuB +/- Fumarat; DcuS und wildtypisches DcuB mit Fumarat) oder weiß bleiben (kein DcuS; DcuS und wildtypisches DcuB ohne Fumarat). Mit diesem Screeningverfahren sollten Varianten von DcuS identifiziert werden, die in Gegenwart der regulatorischen Varianten wildtypisch reagieren, und somit nur bei Zugabe von Fumarat blaue Kolonien zeigen.

Das Screeningverfahren hat sich jedoch als unzureichend herausgestellt. Die  $\beta$ -Gal Aktivität des Stammes IMW536 mit plasmidkodiertem DcuS ist auch nach Zucht mit Fumarat nur sehr schwach. Somit waren blaue Kolonien oftmals nicht von weißen Kolonien zu unterscheiden.

Der Stamm IMW536 scheint somit ungeeignet zu sein für das angestrebte Screeningverfahren. In den Stämmen IMW503 und IMW237, die beide wildtypisch für DcuS sind, konnten deutlichere Unterschiede beobachtet werden. Diese Stämme sind jedoch ebenfalls nicht für das Screeningverfahren geeignet, da sie über wildtypisches DcuS verfügen. Versuche einen alternativen Stamm ausgehend von IMW503 ( $\Delta dcuB$ ,  $dcuB-lacZ$ ) mittels P1-Transduktion zu erstellen, blieben jedoch erfolglos. Der Grund dafür ist, dass wahrscheinlich neben  $dcuS::spc^R$  auch ein intaktes  $dcuB$  Gen mit übertragen wurde, das neben  $dcuS::spc^R$  lokalisiert ist.

### 5.1.3 Titration von DcuS mit dem Koregulator DcuB

Das DcuSR-Zweikomponentensystem ist abhängig von der Präsenz eines Koregulators. In Abwesenheit eines Koregulators ist DcuS in einem konstitutiv aktiven Zustand, unabhängig von der Gegenwart eines Effektors (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009). Unter aeroben Bedingungen dient der Symporter DctA als Koregulator (Davies *et al.* 1999; Steinmetz *et al.* 2014). Unter anaeroben Bedingungen übernimmt der Antiporter DcuB diese Rolle (Kleefeld *et al.* 2009). Interessanterweise sind beide Transporter nicht näher miteinander verwandt, üben aber eine vergleichbare Funktion unter unterschiedlichen Bedingungen aus (Six *et al.* 1994; Steinmetz *et al.* 2014; Uden *et al.* 2016a). Eine sensorische Funktion beider Transporter konnte ausgeschlossen werden; weder DctA noch DcuB dienen als Kosensor (Steinmetz *et al.* 2014; Wörner *et al.* 2016). Aus diesem Grunde wurde die Rolle von DcuB im DcuS/DcuB-Sensorkomplex näher charakterisiert. Analog zu dem Titrationsexperiment in Steinmetz *et al.* (2014) wurde der Sensor DcuS mit dem Transporter DcuB titriert. Hierzu wurde  $dcuB-phoA$  auf pBAD33 in den  $dcuB$ -negativen Reporterstamm IMW503 ( $dcuB::cam^R$ ,  $dcuB-lacZ$ ) eingeführt und über den durch Arabinose induzierbaren pBAD-Promotor induziert. Dies ermöglicht es, den Transporter DcuB, der über die Interaktion mit DcuS seine eigene Expression reguliert, unabhängig von DcuS zu exprimieren und so dessen Einfluss auf die DcuS-vermittelte Genregulation zu untersuchen. Die Gehalte von DcuB-PhoA wurden variiert, indem dem Medium unterschiedliche Konzentrationen L-Arabinose hinzugefügt wurden. Die  $dcuB-lacZ$  Expression wurde für jedes Expressionsniveau von DcuB-PhoA bei steigender Fumarat Konzentration gemessen. Dabei wurde die steigende Konzentration von DcuB-PhoA mittels Immunoblot nachgewiesen. Hierzu wurde eine DcuB-PhoA Proteinfusion verwendet, da es keine funktionierenden Antikörper gegen DcuB gibt und auch 6xHis- und Strep-Antiseren nur schlecht für den Nachweis von 6xHis- bzw. mit einem Streptag markiertem DcuB geeignet waren (Bauer *et al.* 2011). Das PhoA-Antiserum hat sich in früheren Experimenten zum Nachweis von DcuB-PhoA bewährt (Bauer *et al.* 2011).

#### 5.1.4 Expression von *dcuB-lacZ* bei verschiedenen DcuB-PhoA Gehalten

Die Expression von *dcuB-lacZ* wurde in einem Bereich 0 mM bis 10 mM Fumarat getestet (Abb. 15). Die basale Expression von *dcuB-lacZ* in Abwesenheit von Fumarat lag im Bereich von 38 MU bei 0  $\mu$ M L-Arabinose. Bei steigender L-Arabinosekonzentration konnte eine geringe Abnahme der basalen Expression beobachtet werden. Bei 1  $\mu$ M L-Arabinose war noch eine Aktivität von 31 MU und bei 10  $\mu$ M L-Arabinose von 17 MU festzustellen. Der Einfluss der steigenden DcuB-PhoA Konzentration auf die basale Expression von *dcuB-lacZ* ist nur sehr gering. Bei analogen Experimenten mit DctA konnten deutlich größere Effekte beobachtet werden (Steinmetz *et al.* 2014).

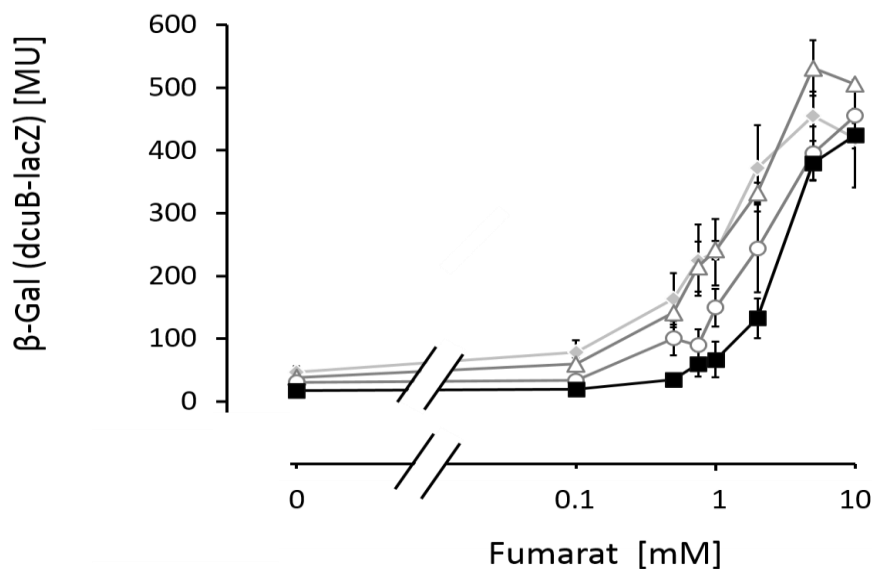


Abb. 15 Titration von DcuS mit DcuB. Die Expression von *dcuB-lacZ* in IMW503 ( $\Delta$ dcuB; *dcuB-lacZ*) wurde bestimmt nach anaerober Zucht in eM9 mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) mit steigenden Fumaratkonzentrationen (0-10 mM). Die DcuB Konzentration wurde über die L-Arabinosekonzentration eingestellt: 100  $\mu$ M Glucose (◆); 0  $\mu$ M Arabinose (△); 1  $\mu$ M Arabinose (○); 10  $\mu$ M Arabinose (■).

Bei steigender Fumaratkonzentration ist in jedem Fall auch eine eindeutige Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu beobachten. Bei etwa 10 mM Fumarat wird bei allen Induktionsbedingungen eine maximale Aktivität von etwa 420 bis 570 MU erreicht (Abb. 15). Die halbmaximale Induktion der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität lag dabei etwa zwischen 1 mM und 2 mM Fumarat. In dieser Größenordnung (0,45 bis 3 mM) lagen auch die apparenten  $K_m$ -Werte, die in früheren Untersuchungen für verschiedene Substrate bestimmt wurden (Kneuper *et al.* 2005).

Um die Aktivität von DcuS mit dem DcuB-PhoA Gehalt in Verbindung zu setzen, wurden die Gehalte von DcuB-PhoA mittels Immunoblot bestimmt. Die Bestimmung erfolgte über ein PhoA-Antiserum (Abb. 16). Die DcuB-PhoA Bande läuft bei etwas unter 100 kDa. Die Induktion durch 1  $\mu\text{M}$  L-Arabinose führt zu einer Zunahme der Bandenintensität im Vergleich zur Zucht ohne L-Arabinose (0  $\mu\text{M}$  Ara). Durch die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  L-Arabinose kann die Intensität der Bande weiter gesteigert werden. Die Intensität der Banden wurde mit der Software ImageJ analysiert (Schneider *et al.* 2012). Dabei wurde die Intensität der Bande nach Zucht in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  L-Arabinose auf 100% gesetzt. Um den Einfluss von DcuB-PhoA auf die Aktivität von DcuS zu veranschaulichen, wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität gegen die Expression von DcuB-PhoA aufgetragen (Abb. 16 B). In Abwesenheit von Fumarat zeigte der DcuB-defiziente Stamm IMW503 bereits eine hohe Aktivität von 965 MU. Wurde aber das Plasmid pMW2334 in den Stamm eingeführt, das das *dcuB-phoA* Gen trägt, kam es schon nach Zucht in Gegenwart von Glucose zu einem drastischen Einbruch in der Aktivität. Mit steigendem DcuB-PhoA Gehalt nahm die Aktivität zunehmend ab.

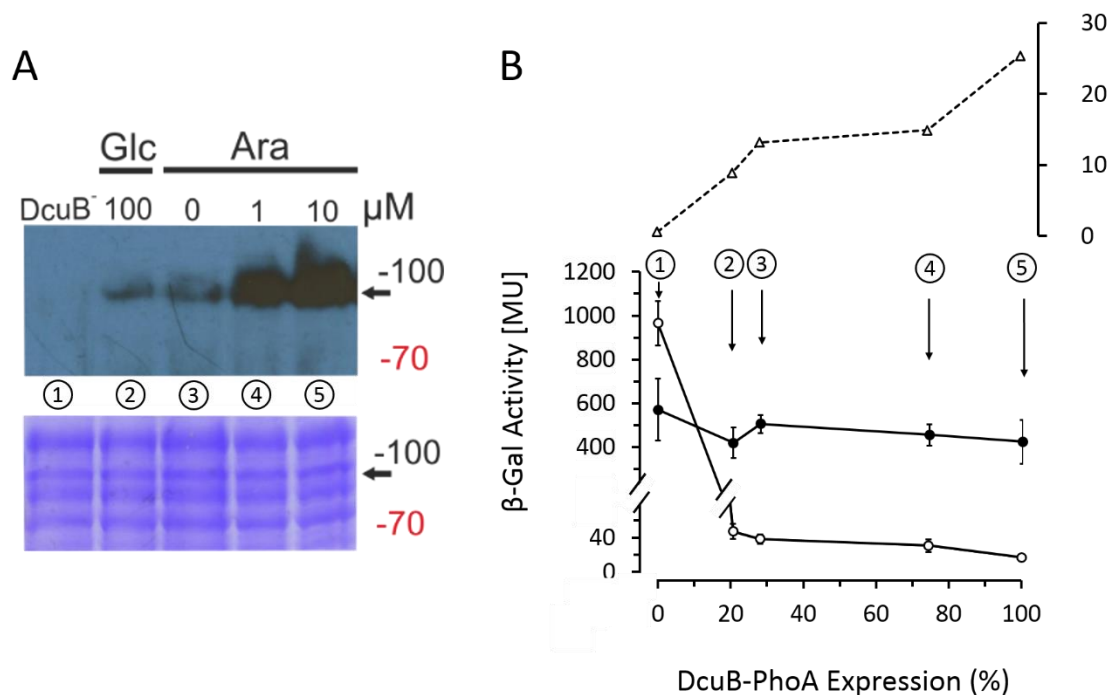


Abb. 16 Expression von DcuB-PhoA nach anaerober Zucht von IMW503 (1) oder IMW503 mit Plasmid pMW2334 (2-5). Die Zucht erfolgte in eM9 Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Durch die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Glucose wurde der pBAD Promotor reprimiert (2). Durch die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  L-Arabinose wurde der pBAD Promotor induziert (4 und 5). A: Expressionskontrolle von DcuB-PhoA mittels Immunoblot. Pro Spur wurde 30  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aufgetragen. DcuB-PhoA wurde über einen PhoA-Antikörper nachgewiesen. B: Verhältnis der Aktivität nach Zucht in Gegenwart von Fumarat zu der Aktivität nach Zucht in Abwesenheit von Fumarat.



Wie bereits oben bemerkt, ist dieser Effekt jedoch ziemlich klein. Auffallend ist, dass bereits bei der basalen Aktivität des pBAD-Promotors eine nahezu maximale Wirkung erzielt wurde. Das Verhältnis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nach Zucht mit Fumarat zur Aktivität nach Zucht ohne Fumarat (Kontroll-Faktor) steigert sich von 0,6 bei dem DcuB-defizienten Stamm IMW503 zu einem Kontroll-Faktor von 25 bei Zucht mit 10  $\mu$ M L-Arabinose. Bei vergleichbaren Messungen in wildtypischen Reporterstämmen lag der Faktor bei 11,2 (Zientz et al. 1998).

### 5.1.5 Titration von DcuB mit DcuS

In den Titrationsexperimenten mit DcuB sollte versucht werden, DcuS nach und nach in den inaktiven und somit sensitiven Zustand zu versetzen. Schon die basale Expression von DcuB-PhoA über den pBAD-Promotor reicht aus, um DcuS nahezu in den inaktiven Zustand zu versetzen. Aus diesem Grunde sollte im folgenden Experiment ein umgekehrter Ansatz versucht werden. Während die Expression von DcuS variiert wurde, sollte die DcuB-Konzentration konstant gehalten werden. Hierzu wurde DcuS von einem pBAD-Promotor in IMW503 exprimiert. IMW503 verfügt zwar über chromosomales *dcuS*, dies sollte den grundlegenden Ablauf des Versuches jedoch nicht stören, da DcuS normalerweise unabhängig von Fumarat konstitutiv niedrig gebildet wird. Dies wurde auch durch absolute Quantifizierung von DcuS mittels SRM bestätigt (vgl. 5.2). Um DcuB aus dem regulatorischen Kreislauf zu entfernen wurde ein Stamm gewählt, der über eine chromosomale Deletion  $\Delta$ *dcuB* verfügt. DcuB wurde über einen pET28a-Vektor (pMW228) in den Stamm eingeführt. Für den Versuch wurde nur die basale Expression von *dcuB* über den nicht induzierten T7 Promotor verwendet. Entgegen den Erwartungen, sinkt die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit steigender Expression von DcuS (Abb. 17). Dies wird sowohl ohne DcuB, als auch mit DcuB deutlich. Dies gilt auch für Zuchten, bei denen Fumarat im Medium präsent war. Insgesamt fallen die im Vergleich zu vorherigen Messungen verhältnismäßig niedrigen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten auf. Vergleicht man die Expression von *dcuB-lacZ* in IMW503 und IMW503 mit dem Plasmid pMW2543 ist ein deutlicher Rückgang der Aktivität zu beobachten, obwohl davon auszugehen ist, dass DcuS in höherem Maße vorliegt. Offensichtlich hat die übermäßige Expression von DcuS einen hemmenden Einfluss auf die Expression von *dcuB-lacZ*.

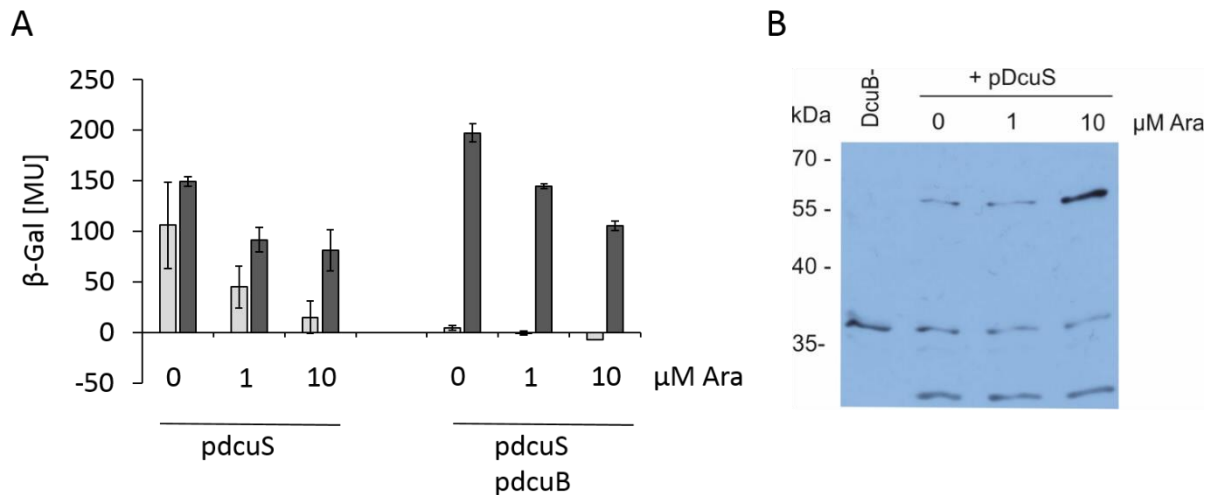


Abb. 17 Titration von DcuB mit DcuS. A: Expression von *dcuB-lacZ* nach anaerober Zucht von IMW503 ( $\Delta$ *dcuB*; *dcuB-lacZ*) mit plasmidkodiertem DcuS oder mit plasmidkodiertem DcuS (pMW2543) und DcuB (pMW280) in eM9 mit 20 mM DMSO und 50 mM Glycerin unter Zusatz von 0 mM oder 20 mM Fumarat. Die DcuS-Konzentration wurde über die Arabinosekonzentration erhöht. B: Immunoblot zum Nachweis der steigenden DcuS-Konzentration mit steigender Arabinosekonzentration. Als Kontrolle wurde IMW503 ohne Plasmid aufgetragen. 1. Antikörper: Anti-DcuS-PD (1:10000), 2. Antikörper Anti-Rabbit (1:10000).

Hierzu wurden einige Kontrolllexperimente durchgeführt. So wurde der Effekt der beiden für das Experiment benutzten Vektoren auf die Expression von *dcuB-lacZ* untersucht. Sowohl pET28a als auch pBAD33 führten zu einer leicht verringerten Expression von *dcuB-lacZ* im Vergleich zu dem Stamm ohne Plasmid (Abb. 18). Dennoch war eine eindeutige Aktivität zu beobachten, die unabhängig von der Zugabe von Fumarat war. Der *dcuB*-Effekt wurde durch die Leervektoren also nicht aufgehoben. In Gegenwart des Plasmids pMW228, das *dcuB* unter Kontrolle des T7 Promotors exprimiert, konnte eine deutliche Abnahme der Aktivität nach Zucht ohne Fumarat beobachtet werden. In Gegenwart von Fumarat war die Expression von *dcuB-lacZ* zwar etwas geringer als beim Wildtyp, lag aber in einer vergleichbaren Höhe. Als weitere Kontrolle wurde der Einfluss des Transporters DcuA getestet, der homolog zu DcuB ist, aber keine regulatorische Aktivität aufweist (Kleefeld *et al.* 2009). In Gegenwart des Plasmids pMW449, das für DcuA kodiert, konnte eine Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität festgestellt werden. Der Effekt war etwas stärker, als der Effekt den die beiden Leervektoren hatten, dennoch war das Aktivitätsmuster vergleichbar. In Abwesenheit von Fumarat war immer noch eine höhere Aktivität zu beobachten, als nach Zugabe von Fumarat. DcuA hatte also keinen regulatorischen Einfluss auf DcuS. In Gegenwart von plasmidkodiertem DcuS sank die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität hingegen unabhängig von der Zugabe von Fumarat auf ein niedriges Niveau. Dies deckt sich mit den oben beschriebenen Ergebnissen (Abb. 17). Es handelt sich demnach um einen für DcuS spezifischen Effekt. Diese Beobachtung lässt sich mit

dem bisherigen Modell nicht vollständig erklären. Offenbar spielt die richtige DcuS-Konzentration eine wichtige Rolle für die korrekte Funktion des DcuSR Systems.

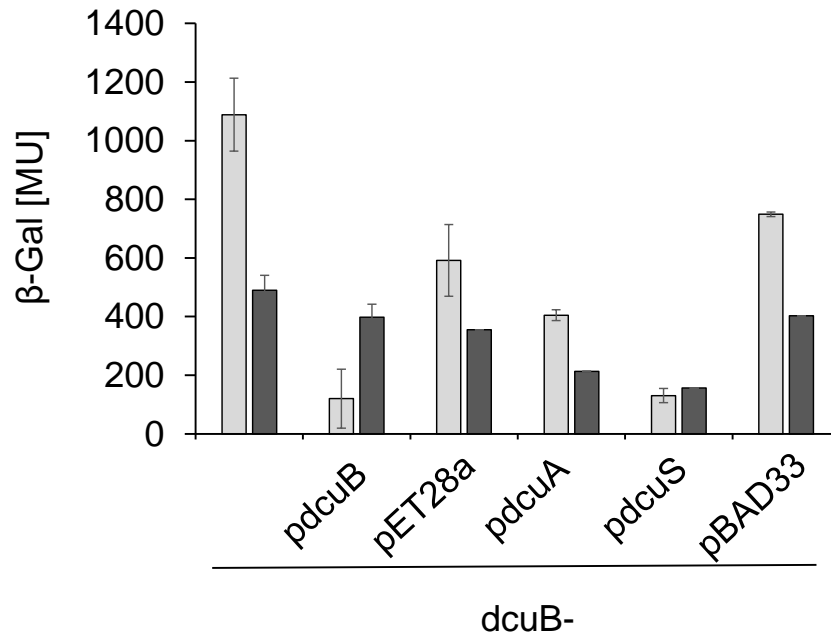


Abb. 18 Expression von *dcuB-lacZ* nach anaerober Zucht in eM9 mit 20 mM DMSO und 50 mM Glycerin unter Zusatz von 0 mM oder 20 mM Fumarat. In allen Fällen wurde für die Messung der Stamm IMW503 ( $\Delta$ *dcuB*; *dcuB-lacZ*) verwendet. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener plasmidkodierter Proteine sowie der Leervektoren pET28a und pBAD33 auf die Expression des Reportergens untersucht.

## 5.2 Die Absolute Quantifizierung der Transporter DcuB und DctA und des Sensors DcuS

Das Zweikomponentensystem DcuSR induziert in Gegenwart von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten wie Fumarat oder L-Malat die Expression der essentiellen Gene des C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsels. Unter aeroben Bedingungen ist dies vor allem *dctA* das für den aeroben Transporter DctA kodiert (Golby *et al.* 1999). Unter anaeroben Bedingungen sind dies die Gene *frdABCD*, *fumB* sowie *dcuB* das für den den anaeroben Transporters DcuB kodiert (Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999). Die Gene *dcuS* und *dcuR* dagegen werden nicht durch DcuSR reguliert (Abo-Amer *et al.* 2004; Goh *et al.* 2005; Oyamada *et al.* 2007). Die beiden Gene *dctA* und *dcuB* sind dabei nicht nur die Zielgene des Antwortregulators DcuR; die Transporter DctA und DcuB spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Sensorhistidinkinase DcuS selbst. Es konnte für beide Transporter gezeigt werden, dass ihre Deletion zu einer konstitutiven Aktivität von DcuS führt (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009). Unter aeroben Bedingungen bildet der Sensor DcuS mit dem Transporter DctA einen DcuS/DctA-Sensorkomplex (Witan *et al.* 2012a; Steinmetz *et al.* 2014). Unter anaeroben Bedingungen wird mit dem anaeroben Transporter DcuB ein ähnlicher DcuS/DcuB-Sensorkomplex gebildet (Wörner *et al.* 2016). Da DcuS in Abwesenheit der Transporter im aktiven Zustand vorliegt, benötigt ein funktionaler Sensorkomplex selbst in Abwesenheit von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten eine geringe Menge der Transporter um einen inaktiven, aber responsiven Sensorkomplex zu bilden (Wörner *et al.* 2016; Unden *et al.* 2016a). Zudem konnte in Lokalisierungsstudien gezeigt werden, dass in Stämmen mit chromosomalen *dcuS-mvenus* der aerobe Transporter DctA über die gesamte Zelle verteilt ist, während DcuS am Zellpol sitzt (Scheu *et al.* 2014). Wird DcuS jedoch von einem Plasmid überproduziert, wird DctA an die Zellpole rekrutiert (Scheu *et al.* 2014). Dies weist auf die Bedeutung des richtigen Verhältnisses des Transporters DctA und des Sensors DcuS für die Ausbildung eines funktionalen DcuS/DctA-Sensorkomplexes hin. In den im Folgenden beschriebenen Versuchen sollten die Proteine DcuS, DctA und DcuB unter induzierenden (Fumarat) und nicht induzierenden Bedingungen (Glycerin) quantifiziert werden, um einen Bezug zwischen den Gehalten der Proteine und ihrem Funktionszustand herzustellen.

Die absolute Quantifizierung erfolgte dabei nach der AQUA Strategie (Gerber *et al.* 2003; Kirkpatrick *et al.* 2005) in Kombination mit der hoch sensitiven und selektiven SRM Massenspektrometrie (Gallien *et al.* 2011). Für das Zweikomponentensystem KdpDE und den

durch KdpDE regulierten Transporterkomplex KdpFABC sowie für das Cpx-System konnten die absolute Konzentration der beteiligten Proteine unter induzierenden auf diese Art bestimmt werden (Surmann *et al.* 2014; Surmann *et al.* 2016). Dabei wird dem Zellysat beim proteolytischen Verdau ein interner Peptidstandard in bekannter Konzentration hinzugefügt. Diese synthetischen Standardpeptide entsprechen den proteotypischen Peptiden der zu quantifizierenden Proteine, enthalten jedoch einen Lysin- oder Arginin-Rest, welcher mit den schweren Isotopen  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiert wurde. Durch die Massendifferenz lassen sich natives und synthetisches Peptid im Massenspektrum unterscheiden. Die bekannte Konzentration des Standardpeptids erlaubt es zudem die Konzentration des nativen Peptids zu bestimmen, das repräsentativ für das Zielprotein steht.

### 5.2.1 Identifizierung proteotypischer Peptide für die absolute Quantifizierung

Für eine absolute Quantifizierung werden demnach zunächst für alle zu quantifizierenden Proteine proteotypische Peptide benötigt. Dies sind einzigartige Peptide, die spezifisch für die untersuchten Proteine sind (Kuster *et al.* 2005; Mallick *et al.* 2007). Aufgrund der Anfälligkeit für Modifikationen sollten proteotypische Peptide außerdem keine Cystein- oder Methioninreste enthalten.

Um proteotypische Peptide für die absolute Quantifizierung von DcuS, DcuB und DctA zu finden, wurde *E. coli* IMW503 entweder mit plasmidkodiertem DcuB (pMW2334) oder mit plasmidkodiertem DctA (pMW1194) anaerob gezüchtet, und entweder Zellen geerntet oder die Membranen der Bakterien isoliert. Die folgenden massenspektrometrischen Untersuchungen mittels Shotgun MS und SRM wurden an der Universität Greifswald durch Dr. Elke Hammer und Dr. Kristin Surmann durchgeführt. Nach einem tryptischen Verdau wurde mittels Shotgun MS überprüft, welche Proteine in den Zellpellets und welche nur den isolierten Membranen detektiert werden konnten. In den Membranpräparationen konnten, je nach Zuchtbedingung, Peptide aller erwarteten Proteine nachgewiesen werden. In den Zellpellets konnten jedoch nur Peptide von DcuB und DctA nachgewiesen werden. Lediglich in einer Probe wurde auch ein DcuS Peptid gefunden. Da dies für eine Quantifizierung ungenügend ist, wurden für die nachfolgenden Untersuchungen stets Membranpräparationen verwendet.

Durch die Voruntersuchungen mittels Shotgun-MS konnten proteotypische Peptide (PTP) für alle Proteine identifiziert werden, die für die absolute Quantifizierung als interner Standard geeignet sind (Tab. 8). Für alle drei Proteine wurden jeweils drei bis vier Peptide ausgewählt, die als schwere Peptide bestellt wurden. In Abb. 19 ist die Lage der Peptide in den drei Proteinen dargestellt.

Für DcuS wurden die drei Peptide LLLINTVPVR, ALNGEENVAINR und TLADSPEIR ausgewählt. Diese wiesen bei SRM Messungen die höchste Intensität auf, und waren somit gute Kandidaten für absolute Quantifizierung. Für DcuB wurden die vier Peptide NYAEGAGGFFK, LTGDQTAALR, FISVPENR und SGTTHIGR ausgewählt. Dabei gehören die ersten beiden Peptide zu dem PhoA-Fusionsprotein des für die Vorversuche verwendeten DcuB-PhoA Konstruktes, und nur die letzteren beiden tatsächlich zu DcuB. Für DctA wurden die vier Peptide ALTNLVGNGVATIVVAK, ATGFSIFK, LDDVLNNR und AVAVYADQAK ausgewählt und als schwere Standardpeptide verwendet.

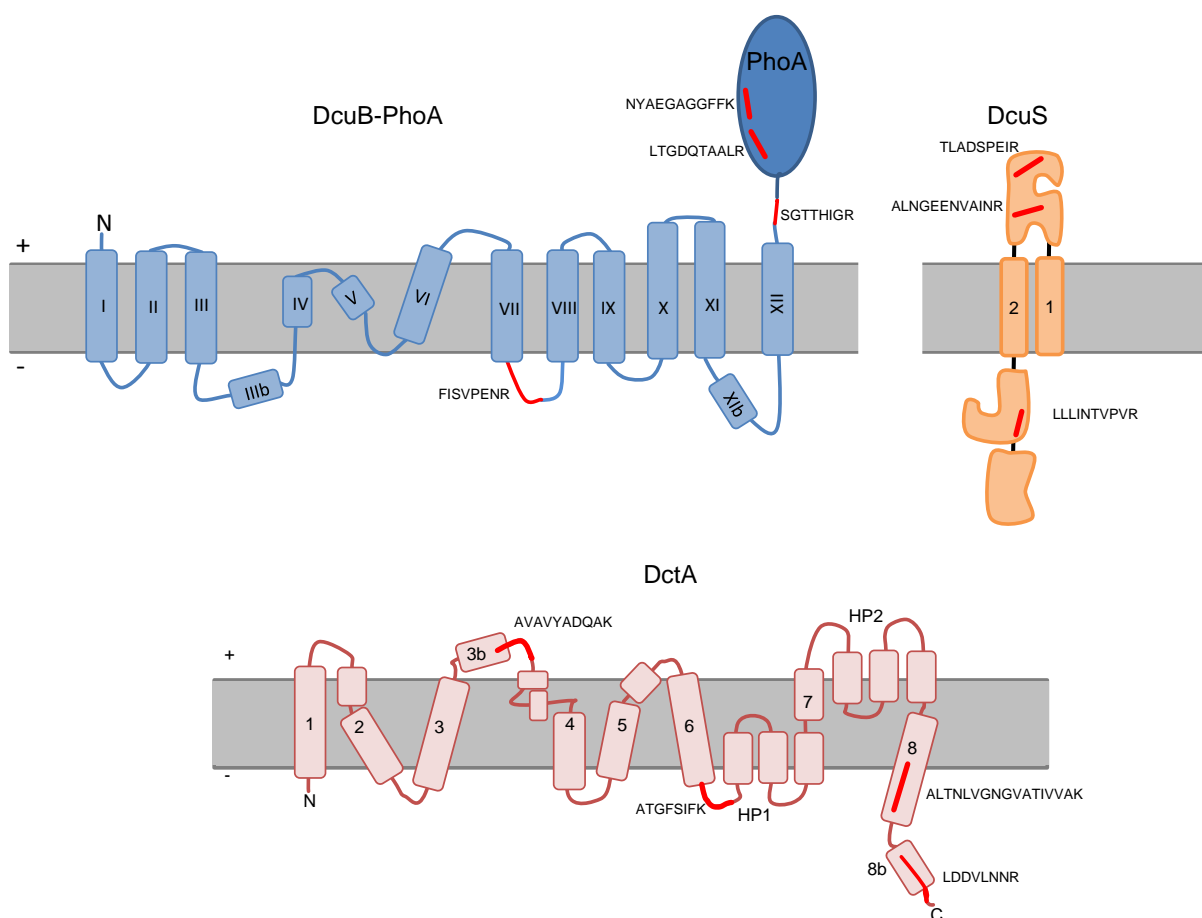


Abb. 19 Lage der verwendeten Peptide (rot) in DcuB-PhoA, DcuS und DctA. Die Topologie von DcuB wurde nach Bauer *et al.* (2011) und die Topologie von DctA nach Witan *et al.* (2012a) dargestellt.

Für die ausgewählten schweren Peptide wurden Eichgeraden zur Wiederfindung der Peptide aus den Membranen oder Zellen erstellt. Hierzu wurde von jedem schweren Peptid eine Verdünnungsreihe in Probenhintergrund gemessen. Dabei dient der Probenhintergrund dazu, die Testbedingungen möglichst realistisch zu simulieren (Surmann *et al.* 2014; Surmann *et al.* 2016). Die drei Peptide für DcuS (Anhang Abb. A 2) zeigen alle eine lineare Korrelation von

$R^2 > 0,99$ . Sie sind somit alle für die absolute Quantifizierung geeignet. Aufgrund des besten Signal-Rausch-Verhältnisses wurde das Peptid TLADSPEIR für die weiteren Experimente ausgewählt. Bei den für DctA ausgewählten Peptiden wurden alle vier Peptide in den Membranproben in unterschiedlichen Mengen gefunden. Auch ein anderes Extraktionsprotokoll (Schmidt *et al.* 2010) führte zu gleichen Ergebnissen. Das Peptid ATGFSIFK hatte nur ein sehr geringes Signal. Darüber hinaus war es auch erst ab einer Menge von 5 bis 10 fmol identifizierbar. Bei dem Peptid ALTNLVGNGVATIVVAK kam es zudem zu Desaminierung. Beide Peptide waren daher ungeeignet als schwere Standardpeptide für die absolute Quantifizierung. Darüber hinaus wurde eine alternative Schnittstelle entdeckt, sodass neben dem Peptid LDDVLNNR auch LDDVLNNRK vorlag. Da sich dies auf die Signalstärke auswirkt, wurde auch dieses Peptid nicht für die Quantifizierung verwendet. Das übrige Peptid AVAVYADQAK dagegen, konnte als einziges für die Quantifizierung von DctA eingesetzt werden. Bei DcuB-PhoA schließlich zeigten die drei Peptide FISVPENR, LTGDQTAALR und NYAEGAGGFFK gute Eigenschaften. Für die Quantifizierung wurde aber nur das für DcuB spezifische Peptid FISVPENR genutzt, um eine Verfälschung durch das wildtypische *E. coli* PhoA zu vermeiden.

### 5.2.2 Absolute Quantifizierung von DcuS und DcuB in *E. coli* W3110 nach anaerober Zucht

Zunächst sollten die Konzentrationen von DcuS und DcuB im wildtypischen *E. coli* Stamm W3110 (Bachmann 1972) untersucht werden. Für die absolute Quantifizierung der Sensor kinase DcuS und des Transporters DcuB wurde *E. coli* W3110 unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium gezüchtet. Dem Medium wurden Glycerin als Kohlenstoffquelle und DMSO als Elektronenakzeptor hinzugefügt. Die Zucht erfolgt entweder mit oder ohne die Zugabe von 20 mM Fumarat als weiterem Elektronenakzeptor und Effektor für das DcuSR-System.

Nach anaerober Zucht ohne Fumarat lag DcuS in einer Konzentration von 1,2 fmol/ $\mu$ g Gesamtprotein vor (Abb. 20). Nach anaerober Zucht unter Zusatz von 20 mM Fumarat betrug die Konzentration 1,1 fmol DcuS/ $\mu$ g Gesamtprotein. Fumarat scheint also keinen größeren Effekt auf die Expression und Gehalte von DcuS zu haben. Die Konzentration von DcuB dagegen steigt von 13,3 fmol/ $\mu$ g nach Zucht ohne Fumarat auf 217,4 fmol/ $\mu$ g nach Zucht mit Fumarat. Die Zugabe von Fumarat als Effektor führt demnach zu einem Anstieg der DcuB-Konzentration um den Faktor 16,3. Ohne Fumarat besteht ein Verhältnis von DcuS zu DcuB von 1:11,1. In Gegenwart von Fumarat beträgt dieses Verhältnis 1:197,6.

Wie die meisten Sensorhistidinkinasen, bildet DcuS wahrscheinlich funktionelle Dimere (Scheu *et al.* 2010b). Auch Tetramere wurden in Crosslinking-Experimenten in geringen Gehalten nachgewiesen (Scheu *et al.* 2010b). Für DcuB ist der oligomere Zustand bisher nicht bekannt. Viele sekundäre Transporter bilden im nativen Zustand Dimere oder Trimere (Veenhoff *et al.* 2002). Auch für DcuB wird daher ein dimerer oder trimerer Zustand angenommen.

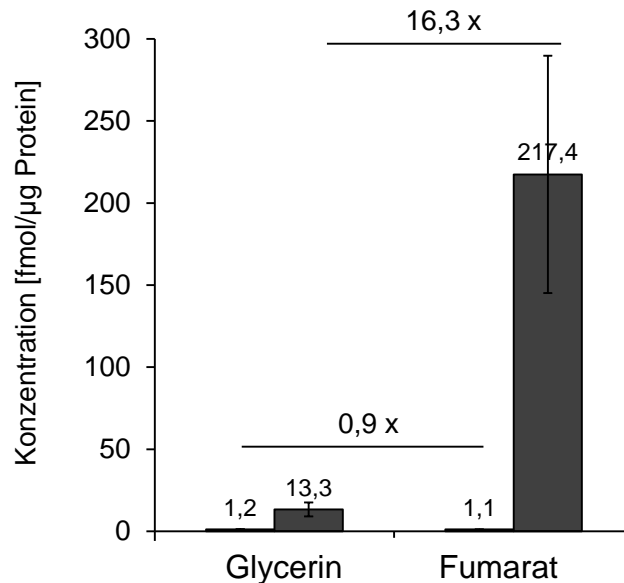


Abb. 20 Absolute Quantifizierung von DcuS (□) und DcuB (■) nach Zucht des Wildtyp Stammes *E. coli* W3110 in eM9 mit 20 mM DMSO, 50 mM Glycerin sowie 0 mM oder 20 mM Fumarat. Die Quantifizierung erfolgte über die Peptide TLADSPEIR (DcuS) und FISVPENR (DcuB). Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 BR.

Um eine anschauliche Größe für den Gehalt der Proteine zu erhalten, wurde der zelluläre Gehalt an DcuS und DcuB abgeschätzt. Hierzu wurde die Zellzahl nach anaerober Zucht in eM9 mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Zucht erfolgte unter vergleichbaren Bedingungen, wie bei der Präparation für die absolute Quantifizierung. Für die Zucht ohne Fumarat wurden  $9,2 \times 10^8$  Zellen/ml/OD gefunden, mit 20 mM Fumarat  $12,2 \times 10^8$  Zellen/ml/OD (Anhang Tab. A 1). Die Zellzahl pro ml und OD-Einheit ist nach der Zucht mit Fumarat etwa um den Faktor 1,3 höher. Die Abschätzung der Molekülzahl pro Zelle veranschaulicht sehr gut die vorliegenden Verhältnisse. In Abwesenheit von Fumarat wurden etwa 24 Moleküle DcuS pro Zelle gefunden (Abb. 21). Nach Zucht mit Fumarat waren es etwa 19 DcuS-Moleküle pro Zelle. Wie bereits bei der auf das Gesamtprotein bezogenen Konzentration festgestellt wurde, bleibt also auch die Molekülzahl pro Zelle weitestgehend unabhängig von Fumarat. Wenn man davon ausgeht, dass DcuS hauptsächlich als funktionelles Dimer vorliegt, kann mit etwa 9-11 funktionellen DcuS-Sensoreinheiten pro Zelle gerechnet werden.



Die Zahl der DcuB Moleküle pro Zelle ist mit etwa 273 Molekülen pro Zelle schon in Abwesenheit von Fumarat deutlich höher. Dies entspricht 137 DcuB<sub>2</sub> oder 91 DcuB<sub>3</sub> Oligomeren. Nach Zucht in Gegenwart von Fumarat ist eine eindeutige Induktion (3396 DcuB Monomere pro Zelle) zu beobachten. Dies entspräche 1698 DcuB<sub>2</sub> oder 1132 DcuB<sub>3</sub>-Komplexen.

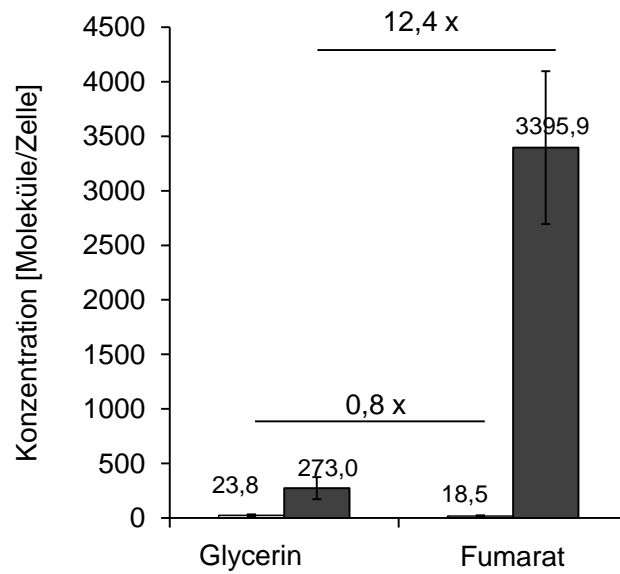


Abb. 21 Moleküle DcuS (□) und DcuB (■) pro Zelle nach anaerober Zucht von *E. coli* W3110 in eM9 mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO ohne Zusatz oder mit Zusatz von 20 mM Fumarat. Nach der absoluten Quantifizierung wurde die Zellzahl pro OD-Einheit bestimmt und so die Molekülzahl pro Zelle abgeschätzt.

Neben der absoluten Kopienzahl pro Zelle, wurde für DcuB auch die Aufnahmeaktivität für radioaktiv markiertes [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat bestimmt. Hierzu wurde *E. coli* W3110 anaerob in eM9-Medium mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) gezüchtet. Die Zucht erfolgte, wie auch für die absolute Quantifizierung, entweder unter nicht induzierenden Bedingungen (0 mM Fumarat) oder unter induzierenden Bedingungen (20 mM Fumarat). Für die Aufnahmemessung wurde die Zellsuspension mit 100 µM markiertem Fumarat versetzt und für 0,5 min inkubiert (Abb. 22). Interessanterweise konnte bei dem wildtypischen Stamm *E. coli* W3110 kein Unterschied zwischen beiden Bedingungen beobachtet werden. Unter beiden Bedingungen lag die Aktivität nach Zucht unter induzierenden und induzierenden bei etwa 4,5 U/g TG bzw. 4,9 U/g TG. Wenn die Zellsuspensionen mit 1 mM markiertem Fumarat versetzt wurden, war die Aktivität zwar etwas höher (8,2 U/g TG bzw. 7,9 U/g TG), aber auch hier war kein bedeutender Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen zu beobachten (Anhang Abb. A 3). Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon in früheren Experimenten gemacht (Six *et al.* 1994; Zientz *et al.* 1999). Da die Zelle neben DcuB auch über die beiden

C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter DcuA und DcuC verfügt, wurden beide Transporter über Resistenzkassetten ausgeschaltet (IMW658). In diesem Stamm ist die Transportaktivität alleine von DcuB abhängig. Tatsächlich konnte hier nach Zucht unter nicht induzierenden Bedingungen nur eine schwache Transportaktivität von 0,3 U/g TG gemessen werden. Nach Zucht unter induzierenden Bedingungen war eine um etwa 13,2 fach höhere Aktivität von 3,9 U/g TG zu beobachten. Diese Aktivität ist fast so hoch, wie die im Wildtyp gemessenen Aktivitäten. Die Steigerung um den Faktor 13,2 der Aufnahmeaktivität durch die Fumaratbedingte Induktion von *dcuB* ist etwas größer, aber vergleichbar mit der Zunahme des DcuB-Gehaltes nach Zucht unter induzierenden Bedingungen (Faktor 12,4).

Im Stamm IMW659 wurde außerdem *dcuB* durch eine Resistenzkassette ausgeschaltet. Hier war sowohl nach Zucht unter nicht induzierenden als auch nach Zucht unter induzierenden Bedingungen nur eine geringe Aufnahmeaktivität zu beobachten. Die Steigerung der Aufnahmeaktivität im Stamm IMW658, der noch über *dcuB* verfügt, ist demnach klar auf die Induktion der Expression von *dcuB* zurückzuführen.

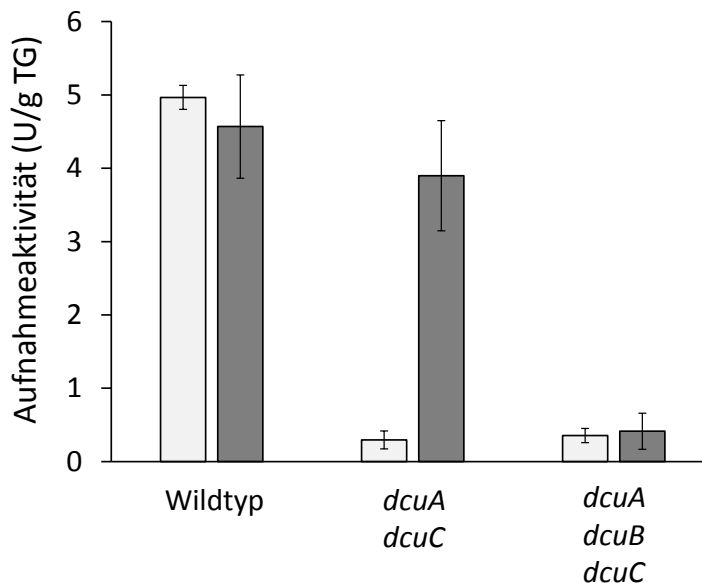


Abb. 22 Aufnahmeaktivität für Fumarat. Für die Bestimmung der Aufnahmeaktivität wurde *E. coli* W3110, IMW658 (*dcuA*, *dcuC*) oder IMW659 (*dcuA*, *dcuB*, *dcuC*) anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) gezüchtet. Die Zucht erfolgte in Abwesenheit von Fumarat (■) oder in Gegenwart von 20 mM Fumarat (■). Für die Messung der Aufnahmeaktivität wurde die Zellsuspension energetisiert und anschließend für 0,5 min mit 100  $\mu$ M [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat inkubiert. Nicht aufgenommenes Substrat wurde durch Filtration und zwei anschließende Waschschrte abgetrennt.

### 5.2.3 Absolute Quantifizierung von DcuS und DctA in *E. coli* W3110 nach aerober Zucht

Analog zu dem anaeroben Transporter DcuB wurde auch der aerobe Transporter DctA absolut quantifiziert. Auch hier wurde der Stamm *E. coli* W3110 verwendet, der aerob in eM9-Medium kultiviert wurde. Als Kohlenstoffquelle diente entweder 50 mM Glycerin oder aber 50 mM Fumarat.

Nach aerober Zucht mit Glycerin als Kohlenstoffquelle wurde DcuS in einer Konzentration von 0,6 fmol/ $\mu$ g Protein gefunden (Abb. 23). Nach Zucht in Gegenwart von Fumarat wurde ein 1,5-facher Anstieg des DcuS-Gehaltes auf eine Konzentration von 0,9 fmol DcuS/ $\mu$ g Protein festgestellt. Dies ist eine um den Faktor 0,5 bis 0,8 niedrigere Konzentration, als nach Zucht unter anaeroben Bedingungen gefunden wurde (Abb. 20). Die Konzentration des aeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporters DctA lag nach Zucht auf Glycerin bei 18,8 fmol/ $\mu$ g Protein. Nach Zucht auf Fumarat wurde ein um das 3,2fach erhöhter DctA-Gehalt von 60,7 fmol/ $\mu$ g Protein festgestellt. Unter nicht induzierenden Bedingungen (Glycerin) lag das Verhältnis DcuS/DctA etwa bei 1:31. Unter induzierenden Bedingungen (Fumarat) stieg das Verhältnis von DcuS/DctA auf etwa 1:67 an.

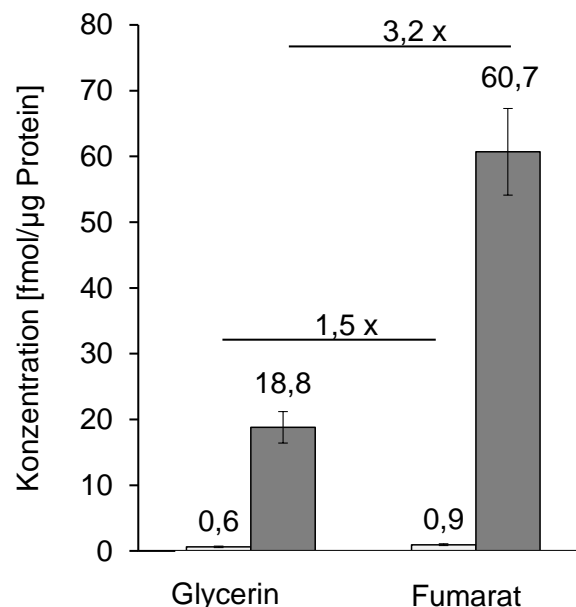


Abb. 23 Absolute Quantifizierung von DcuS (■) und DctA (■) in der Membranfraktion nach aerober Zucht von *E. coli* W3110 in eM9 mit Glycerin (50 mM) oder Fumarat (50 mM) als Kohlenstoffquelle. Für Quantifizierung mittels SRM wurden die schweren Standardpeptide TLADSPEIR (DcuS) und (DctA) verwendet.

Um auch für die aerobe Zucht die Molekülzahl von DcuS und DctA pro Zelle abzuschätzen, wurde hier ebenfalls die Zellzahl pro OD<sub>578</sub> bestimmt. Nach aerober Zucht auf Glycerin waren 11,8x10<sup>8</sup> Zellen pro OD<sub>578</sub> und nach Zucht auf Fumarat waren es 13,0x10<sup>8</sup> Zellen pro OD<sub>578</sub> (Anhang Tab. A 1). Nach Zucht auf Glycerin wurden hier 6,5 Moleküle DcuS pro Zelle gefunden (Abb. 24). Nach Zucht mit Fumarat wurden 9,1 Moleküle DcuS pro Zelle gefunden. Dies entspricht einem 1,4-fachen Anstieg des DcuS-Gehaltes. DctA lag nach Zucht auf Glycerin mit 197,6 Kopien pro Zelle vor. Nach Zucht auf Fumarat wurde der DctA-Gehalt um den Faktor 2,95 auf 583,0 Moleküle pro Zelle gesteigert. Die Induktion von DctA durch Fumarat unter aeroben Bedingungen ist damit deutlich schwächer, als die Induktion von DcuB unter anaeroben Bedingungen.

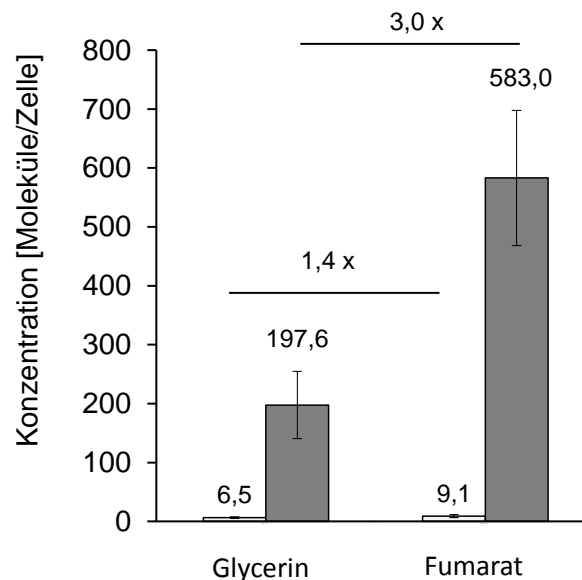


Abb. 24 Kopienzahl von DcuS (■) und DctA (■) pro Zelle. Die Zucht von *E. coli* W3110 erfolgte aerob in eM9 mit 50 mM Glycerin oder 50 mM Fumarat. Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch mittels einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Über die Zellzahl wurde die Molekülzahl pro Zelle abgeschätzt.

Da DcuS wahrscheinlich ein funktionelles Dimer bildet (Scheu *et al.* 2010b), liegen etwa 3,3 bis 4,6 DcuS-Sensoreinheiten pro Zelle vor. Im Gegensatz zu DcuB kann für DctA angenommen werden, dass es als Trimer vorliegt (Groeneveld *et al.* 2010). Damit lägen pro Zelle unter nicht induzierenden Bedingungen etwa 65,9 Trimere und unter induzierenden Bedingungen etwa 194,3 Trimeren pro Zelle vor. Dies entspricht einem Verhältnis von DcuS<sub>2</sub> zu DctA<sub>3</sub> von etwa 1:20 unter nicht induzierenden Bedingungen und von etwa 1:43 unter induzierenden Bedingungen. Sowohl der aerobe Transporter DctA als auch der anaerobe

Transporter DcuB liegen aerob bzw anaerob unter nicht induzierenden Bedingungen bereits im Überschuss gegenüber dem Sensor DcuS vor. Da DcuS unter diesen Bedingungen weitestgehend inaktiv ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Transportergehalte ausreichen, um DcuS vollständig in den inaktiven DcuS/Transporter-Komplex zu überführen.

### 5.2.4 Titration von DcuS mit den Koregulatoren DcuB und DctA

Unter wildtypischen Bedingungen ist immer genug DcuB oder DctA vorhanden, um einen inaktiven aber sensitiven DcuS/Transporter-Komplex zu bilden. Da unter wildtypischen Bedingungen der DcuB-Gehalt einen direkten Einfluss auf die Expression des *dcuB*-Gens hat, lässt sich hier immer nur eine Situation untersuchen, in der die vorhandenen DcuB-Moleküle ausreichen, damit DcuS weitestgehend im inaktiven DcuS/DcuB-Sensorkomplex vorliegt. Um den Einfluss des Transporters DcuB auf den Sensor DcuS genauer charakterisieren zu können, sollte die Expression von *dcuB* aus diesem regulatorischen Keislauf entkoppelt werden. Durch die Expression von *his6-dctA-his6* oder *dcuB-phoA* von einem pBAD-Promotor konnte DcuS mit His6-DctA-His6 oder DcuB-PhoA titriert werden (Steinmetz *et al.* 2014; Wörner *et al.* 2016 vgl. 5.1.3). Da in diesen Experimenten die Expression des *dcuB-lacZ* Reporters mit steigenden Gehalten von DcuB-PhoA oder His6-DctA-His6 weiter abnahm, sollten die Transportergehalte unter nicht induzierenden Bedingungen noch nicht ausreichen, um DcuS vollständig in den DcuS/Transporter-Komplex zu überführen. Aus diesem Grund wurde für diese Bedingungen der absolute Gehalt von DcuS, DcuB und DctA bestimmt.

#### 5.2.4.1 Titration von DcuS mit DcuB

Für dieses Experiment wurde IMW503 mit pMW2334 anaerob in eM9 mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO gezüchtet. Um den Gehalt an DcuB-PhoA zu variieren, wurde dem Medium entweder 100  $\mu$ M Glucose oder 0, 1 oder 10  $\mu$ M L-Arabinose hinzugefügt. Die Bestimmung erfolgte mittels SRM (vgl 5.2) aus drei bis vier biologischen Replikaten. Die Konzentration von DcuS war dabei unabhängig von der Zugabe von Glucose (100  $\mu$ M) oder der Zugabe von L-Arabinose (1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M) und lag im Bereich von 2 fmol/ $\mu$ g Protein. Dies liegt etwas höher als bei den Untersuchungen im Wildtyp *E. coli* W3110, die Werte liegen aber in einer vergleichbaren Größenordnung (vgl. 5.2.2). Der Transporter DcuB-PhoA liegt nach Zugabe von Glucose, 0  $\mu$ M oder 1  $\mu$ M L-Arabinose in einer Konzentration von etwa 16 bis 23 fmol/ $\mu$ g Protein vor. Auch hier wurde die Zellzahl von IMW503 mit pMW2334 nach anaerober Zucht unter vergleichbaren Bedingungen bestimmt (Anhang Tab. A 1).

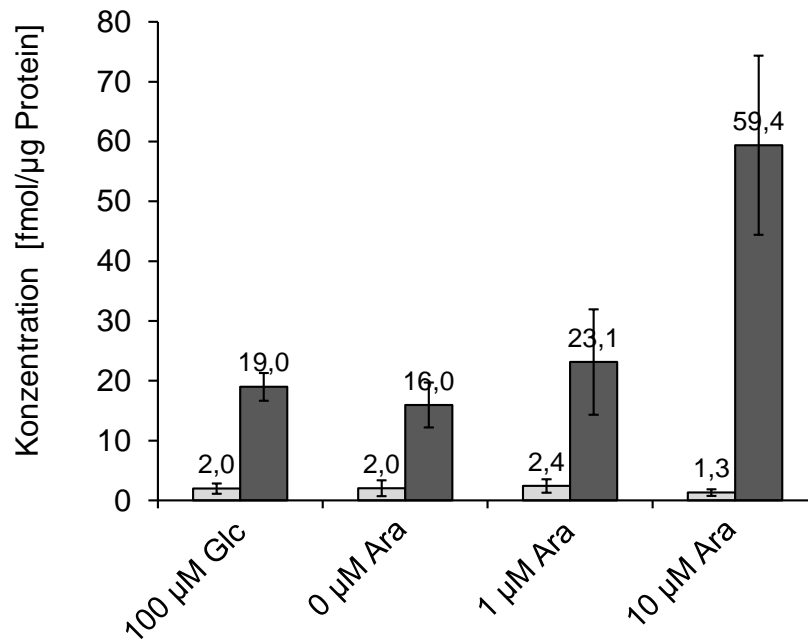


Abb. 25 Absolute Konzentration von DcuS (■) und DcuB (■) nach anaerober Zucht. Der Stamm IMW503 mit dem Plasmid pMW2334 (pdcuB-phoA) wurde anaerob in eM9 Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO gezüchtet. Zur Repression des pBAD Promotors wurde dem Medium 100 μM Glucose hinzugegeben (100Glc). Zur Induktion des pBAD Promotors erfolgte die Zucht unter Zugabe von 1 μM oder 10 μM L-Arabinose.

So konnten auch die Anzahl an DcuB und DcuS Molekülen pro Zelle abgeschätzt werden. Für DcuB wurden Gehalte von 223 bis 268 Kopien pro Zelle bei fehlender oder geringer Induktion gefunden (Abb. 26). Erst in Gegenwart von 10 μM L-Arabinose nahm die Kopienzahl auf etwa 853 Kopien pro Zelle zu. Die DcuS-Kopienzahl pro Zelle betrug 28 (100 μM Glc), 29 (0 μM Ara), 25 (1 μM Ara) und 19 (10 μM Ara) pro Zelle. Im Gegensatz zu der Abschätzung der DcuB-PhoA Gehalte mittels Immunoblot, konnte hier keine eindeutige Zunahme des DcuB-PhoA Gehaltes durch die Zugabe von 1 μM L-Arabinose zum Zuchtmedium festgestellt werden. Erst die Zugabe von 10 μM L-Arabinose führte zu einer eindeutigen Zunahme des DcuB-PhoA Gehaltes. Dies entspricht etwa einer Steigerung um den Faktor 3,8 zwischen 0 μM Arabinose und 10 μM Arabinose oder einer Steigerung von 3,5 zwischen den Bedingungen 1 μM Arabinose und 10 μM Arabinose. Im Immunoblot wurde zwischen den Bedingungen 0 μM Arabinose und 10 μM Arabinose eine ähnliche Steigerung des DcuB-PhoA Gehaltes um den Faktor 3,5 gefunden (vgl. Abb. 13). Bei dem Vergleich der Bedingungen 0 μM Arabinose und 1 μM Arabinose wurde aber eine größere Steigerung im Immunoblot gefunden (Faktor 2,6) als im SRM Experiment (Faktor 1,1).

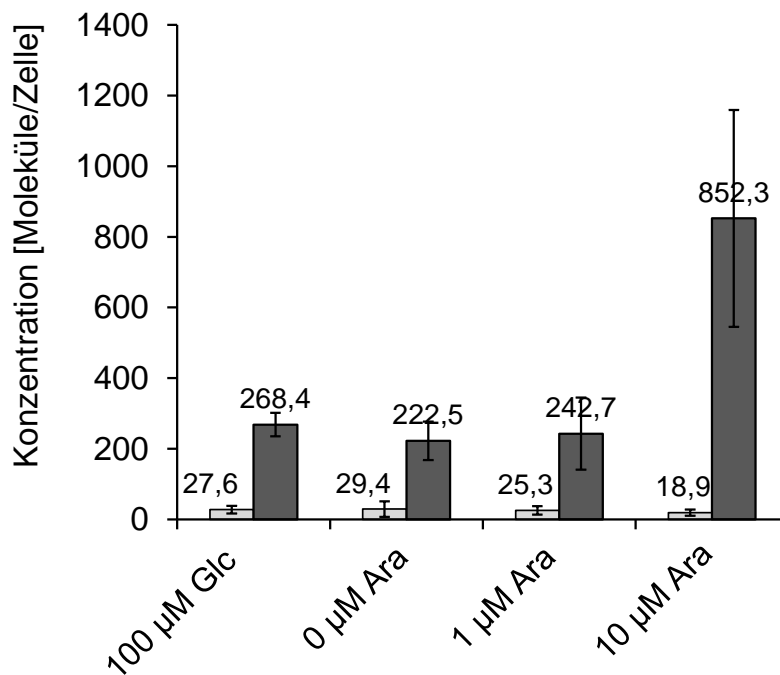


Abb. 26 DcuS (■) und DcuB-Kopienzahl (■) pro Zelle nach anaerober Zucht von IMW503 mit pMW2234 (*pdcuB-phoA*) in eM9 Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Zur Repression des pBAD Promotors wurde dem Medium 100 µM Glucose hinzugefügt. Zur Induktion wurde 1 µM oder 10 µM L-Arabinose zum Medium hinzugefügt.

Unter keiner Bedingung konnte ein Zustand gefunden werden, in dem DcuS im Überschuß vorlag. Unter allen Bedingungen lag der DcuB-Gehalt mindestens um den Faktor 8 bis 10 höher als der DcuS-Gehalt. Schon die basale Expression des pBAD-Promotors ohne Induktion durch L-Arabinose reicht also aus, um DcuB in regulatorisch aktiver Menge zu bilden.

#### 5.2.4.2 Titration von DcuS mit dem aeroben Transporter DctA

Wie hier für DcuB-PhoA gezeigt, konnte DcuS auch mit dem aeroben Transporter DctA titriert werden (Steinmetz *et al.* 2014). Hierzu wurde DctA-His über pBAD33 in IMW503 anaerob exprimiert. DctA ist zwar ein aerober Transporter, künstlich exprimiert kann er aber anaerob einen *dcuB*-negativen Stamm komplementieren (Witan *et al.* 2012a; Steinmetz *et al.* 2014). Durch Zugabe von Glucose oder L-Arabinose wurde der DctA-Gehalt variiert. Wie für DcuB sollten auch für DctA die absoluten Gehalte bestimmt werden.

Die DcuS-Gehalte lagen bei 0,7 bis 0,8 fmol/µg Protein und zeigten kaum Variation zwischen den verschiedenen Bedingungen. Dies sind vergleichbare Werte, wie sie auch in den oben beschriebenen Experimenten gefunden wurden (vgl. 5.2.3). Die DctA Gehalte steigen von 45,7 fmol/µg Protein (100 µM Glucose) auf einen Gehalt von 97,1 fmol/µg Protein (10 µM L-Arabinose) und damit insgesamt um den Faktor 2,1 (Abb. 27).

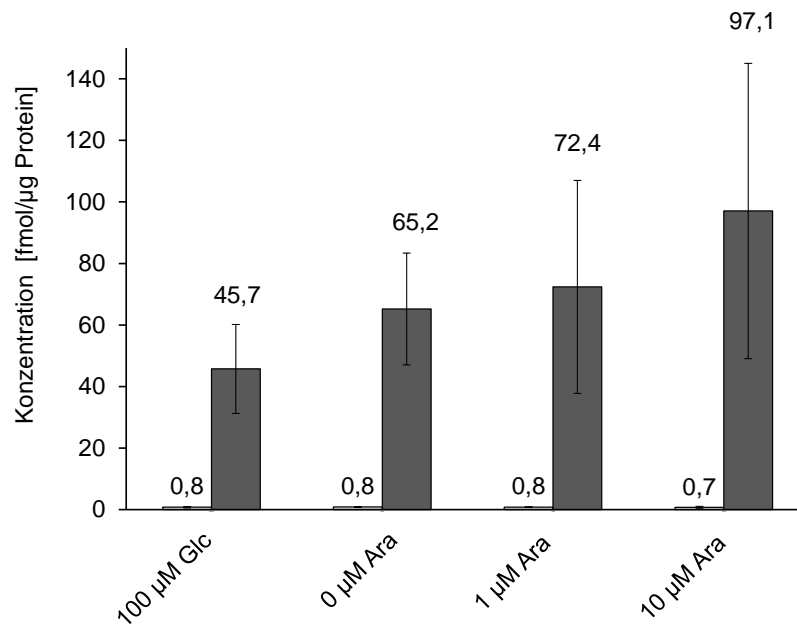


Abb. 27 Absolute Quantifizierung von DcuS (□) und DctA (■) nach anaerober Zucht von IMW503 ( $\Delta$ *dcuB*, *dcuB-lacZ*) mit pMW1194 (*pdctA*) in eM9 mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO. Dem Medium wurden außerdem 100  $\mu$ M Glucose, 0  $\mu$ M Arabinose, 1  $\mu$ M Arabinose oder 10  $\mu$ M Arabinose zugesetzt.

Analog zu den oben beschriebenen Experimenten wurde aus den Proteinkonzentrationen und der Zellzahl pro OD<sub>578</sub> die Kopienzahl pro Zelle abgeschätzt (Abb. 28). Nach Zucht mit 100  $\mu$ M Glucose lagen bereits 621 Moleküle DctA vor. Nach Zucht ohne Effektor (0  $\mu$ M Ara) lagen 587 Moleküle pro Zelle vor. Durch Zugabe von 1  $\mu$ M oder 10  $\mu$ M L-Arabinose konnte der

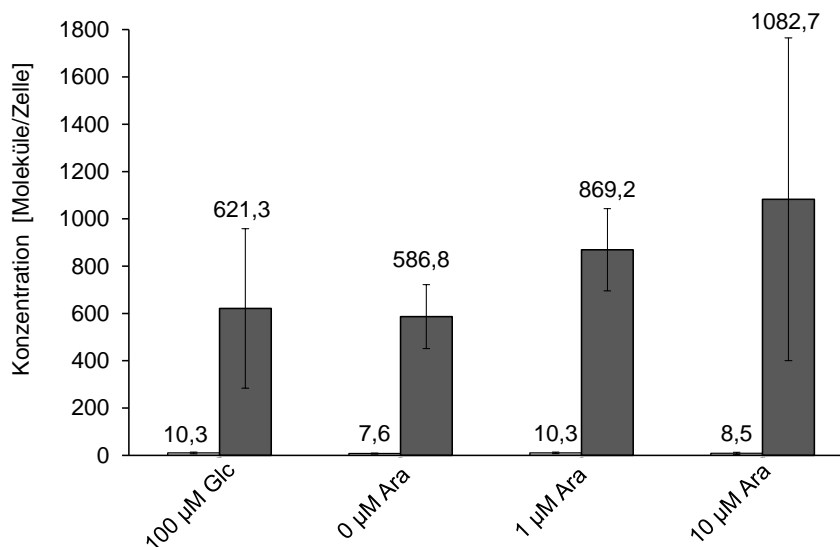


Abb. 28 Absolute Quantifizierung von DcuS und DctA nach anaerober Zucht von IMW503 ( $\Delta$ *dcuB*, *dcuB-lacZ*) mit pMW1194 (*pdctA*) in eM9 mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO. Dem Medium wurden außerdem 100  $\mu$ M Glucose, 0  $\mu$ M Arabinose, 1  $\mu$ M Arabinose oder 10  $\mu$ M Arabinose zugesetzt. Zur Bestimmung der Kopienzahl pro Zelle wurde die Zellzahl pro OD<sub>578</sub> bestimmt.



DctA-Gehalt auf 869, respektive 1083 Moleküle pro Zelle gesteigert werden. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 1,48 von 0  $\mu\text{M}$  zu 1  $\mu\text{M}$  L-Arabinose und einer Steigerung um den Faktor 1,85 von 0  $\mu\text{M}$  zu 10  $\mu\text{M}$  L-Arabinose.

Es gab nur einen geringen Unterschied zwischen dem DctA-Gehalt nach Zucht mit 100  $\mu\text{M}$  Glucose (100  $\mu\text{M}$  Glc) und dem DctA-Gehalt nach Zucht in Abwesenheit von L-Arabinose und Glucose (0  $\mu\text{M}$  Ara). Dies deutet darauf hin, dass die geringe Glucosekonzentration von 100  $\mu\text{M}$  womöglich keinen Effekt auf die Expression von DctA über den pBAD-Promotor hat. Im Vergleich zur Zucht mit 0  $\mu\text{M}$  L-Arabinose nahm die Bandenintensität nach Zucht mit 1  $\mu\text{M}$  L-Arabinose um den Faktor 2,24 zu. Dies entspricht etwa dem 1,5-fachen der mittels SRM bestimmten Zunahme des DctA-Gehaltes (Abb. 29). Von 0  $\mu\text{M}$  zu 10  $\mu\text{M}$  L-Arabinose nahm die Bandenintensität etwa um den Faktor 3,68 zu. Die Intensität im Immunoblot nahm zwischen 0  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  L-Arabinose also etwa doppelt so stark zu, wie die absoluten DctA-Gehalte. Als Maß für die Funktion von DctA wurde außerdem die Aufnahmeaktivität von DctA für [2,3- $^{14}\text{C}$ ]-Succinat bestimmt (Abb. 30). Hierzu wurde der Stamm IMW505, der defizient für die drei Transporter DcuA, DcuB und DcuC ist, anaerob gezüchtet. Ohne Transporter lag die Aufnahme bei 0,83 U/g TG. Wurde DctA über ein Plasmid eingeführt, kam es schon nach Zucht in Gegenwart von Glucose zu einer deutlich gesteigerten Aufnahme von [2,3- $^{14}\text{C}$ ]-Succinat.

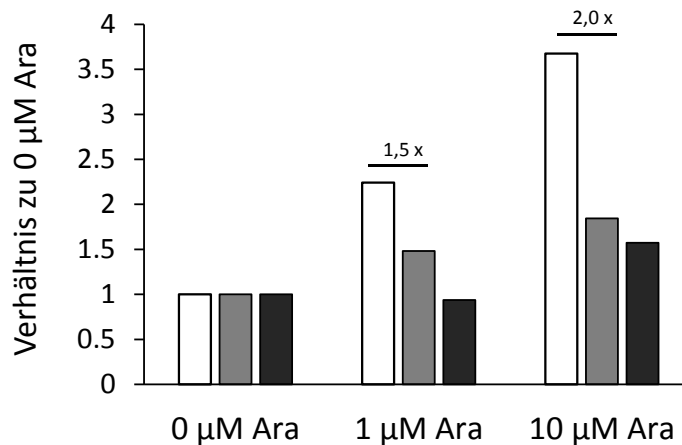


Abb. 29 Vergleich der Zunahme des DctA-Gehaltes durch Induktion mit L-Arabinose bestimmt durch Immunoblot (weiße Balken; Steinmetz *et al.* 2014) und durch absolute Quantifizierung mittels SRM (graue Balken). Außerdem wurde die relative Zunahme der Aufnahmeaktivität dargestellt (dunkelgraue Balken). Die relativen Gehalte sind bezogen auf den Gehalt nach Zucht mit 0  $\mu\text{M}$  L-Arabinose.

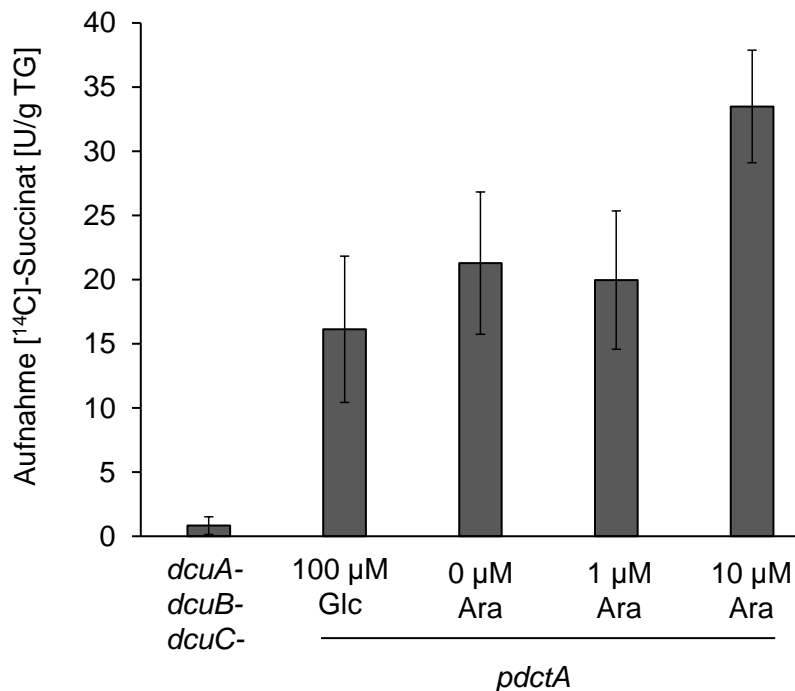


Abb. 30 Aufnahme von [2,3-<sup>14</sup>C]-Succinat in IMW505 (*dcuB*-, *dcuA*-, *dcuC*-) und IMW505 mit pMW1194 (*pdctA*) nach anaerober Zucht in eM9-Medium. Dem Zuchtmedium wurde außerdem 100 µM Glucose oder 0, 1 oder 10 µM L-Arabinose hinzugefügt um den pBAD-Promotor zu induzieren.

Nach Zucht mit 0 µM L-Arabinose lag die Aufnahme bei 21,28 U/g TG. Die Zugabe von 1 µM L-Arabinose führte nicht zu einer Steigerung der Aufnahmeaktivität. Erst nach Zucht mit 10 µM L-Arabinose wurde die Aufnahme von [2,3-<sup>14</sup>C]-Succinat um den Faktor 1,57 gesteigert.

### 5.2.5 Beiträge von DcuS und DcuS/DcuB zur Expression des *dcuB*-Promotors

Der Sensor DcuS bildet einen Sensorkomplex mit dem Transporter DcuB. Schon geringe Mengen des Transporters DcuB reichen aus, um DcuS nahezu vollständig in den sensorisch aktiven Zustand zu versetzen (vgl. 5.1.3). Dabei untersteht die Expression des Transporters DcuB der Kontrolle des Sensors DcuS. Unter wildtypischen Bedingungen sollte DcuS also weitestgehend als inaktiver Sensorkomplex vorliegen. Um die Beiträge von DcuS und DcuS/DcuB zur Expression des *dcuB*-Gens zu untersuchen, wurden Stämme mit wildtypischen *dcuS* und inaktiviertem *dcuS* eingesetzt (Abb. 31). Im Wildtyp (IMW237) war in Abwesenheit von Fumarat eine geringe Expression der *dcuB-lacZ* Reporterfusion zu beobachten. Im *dcuS*-negativen Stamm (IMW260) nahm die Expression noch weiter ab (von 17 MU auf 3 MU). Offensichtlich wird *dcuB-lacZ* auch ohne Fumarat transkribiert, wobei es sich um eine

Induktion durch freies DcuS oder durch eine schwache Aktivität von DcuS im nicht durch Fumarat aktivierten DcuS/DcuB-Sensorkomplex handeln könnte. Bei der im *dcuS*-negativen Stamm beobachteten Restaktivität handelt sich um eine DcuS-unabhängige Transkription, die sehr niedrig ist. In einem Stamm, der nur die plasmidkodierte DcuS-Variante H349L, d.h. eine nicht phosphorylierbare Form von DcuS bildet, war die Expression auf einem ähnlich niedrigen Niveau. Die Aktivität des Promotors von 17 MU stellt eine basale und konstitutive Expression dar, die von Fumarat unabhängig ist. Diese basale Aktivität ist allerdings abhängig von freiem DcuS oder vom nicht aktivierten DcuS/DcuB-Komplex. Sie beträgt etwa 3 % der Fumarat-aktivierten Expression und sorgt dafür, dass die Zelle immer mit einem basalen Level an DcuB versorgt wird.

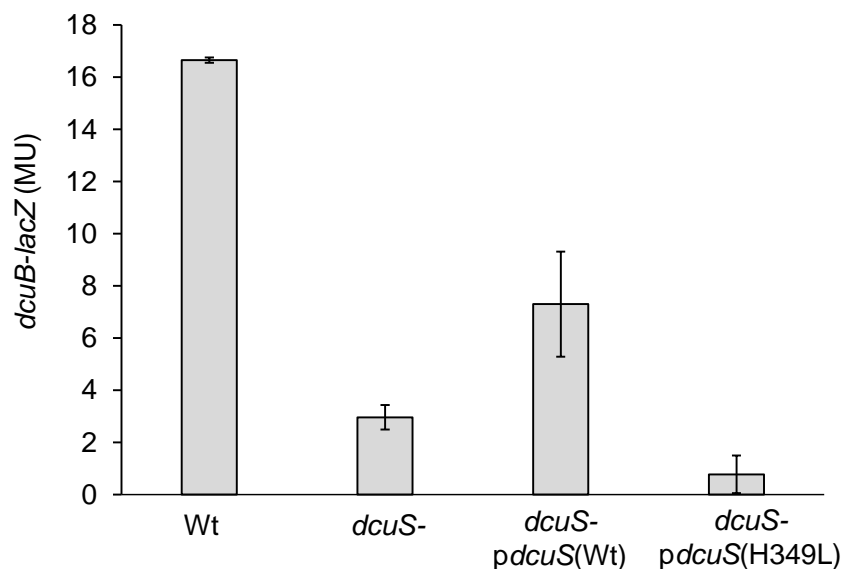


Abb. 31 Basale Expression von *dcuB-lacZ* nach anaerober Zucht in eM9 Medium mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Um die basale Aktivität von DcuS zu untersuchen wurde  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität des Wildtypes (IMW237) mit der eines DcuS-negativen Stammes (IMW260) verglichen. Außerdem wurde wildtypisches DcuS und die DcuS Variante H349L plasmidkodierte in IMW260 exprimiert.

Auch in Abwesenheit von Effektoren wird die *dcuB-lacZ* Reporterfusion in geringem Maße exprimiert, wobei diese Aktivität zu ca. 80 % von DcuS abhängt. Die restlichen 20 % kommen dabei durch eine unspezifische Transkription des Promotors zustande oder stellen den methodisch bedingten Hintergrund dar.

### 5.2.6 Vorkommen von freiem DcuS<sub>F</sub> neben dem DcuS/DcuB-Sensorkomplex

Unter der Annahme, dass in Abwesenheit eines Effektors nur freies DcuS die *dcuB-lacZ* Fusion induziert, kann der Anteil freien DcuS<sub>F</sub> abgeschätzt werden. Die basale Aktivität von DcuS beträgt 0,7 MU/DcuS. Wird außerdem die von DcuS unabhängige Grundaktivität berücksichtigt, beträgt die DcuS-abhängige Grundaktivität 0,6 MU/DcuS. Bei der DcuS-Aktivität in DcuB-defizienten Stämmen kann dagegen davon ausgegangen werden, dass der Anteil von DcuS<sub>F</sub> 100 % des gesamten DcuS entspricht. Die Aktivität von DcuS ohne Effektor in Abwesenheit von DcuB beträgt 38,1 MU/DcuS. Die Grundaktivität von DcuS macht etwa 1,6 % der maximalen Aktivität von freiem DcuS aus. Demnach liegen also ca. 0,4 Moleküle DcuS pro Zelle vor (23,8 Moleküle pro Zelle x 0,016). Dies bedeutet, dass auch unter nicht induzierenden Bedingungen (0 mM Fumarat) der größte Teil (> 98 %) aller DcuS Moleküle als DcuS/DcuB-Sensorkomplex vorliegt.

Analog hierzu wurde auf Basis der Aktivitäten aus Abschnitt 5.1.3 der Anteil DcuS<sub>F</sub> auch für die Titrationsexperimente abgeschätzt (Abb. 32). Nach dieser Abschätzung lag der Großteil aller DcuS-Moleküle als DcuS/DcuB Komplex vor. Nur ein jeweils kleiner Teil lag demnach als DcuS<sub>F</sub> vor.

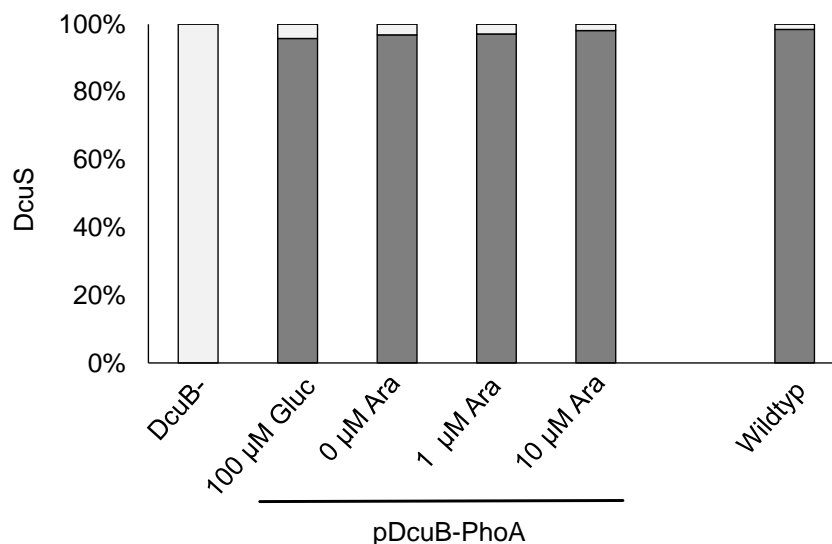


Abb. 32 Anteil DcuS<sub>F</sub> (hell) im Vergleich zu DcuS/DcuB (dunkel). Die Werte wurden über die DcuS-Aktivität in Abwesenheit von Fumarat berechnet. Als Grundlage dienten die Werte aus Abb. 15. Im DcuB-defizienten Stamm (IMW503) liegt DcuS zu 100 % als DcuS<sub>F</sub> vor. Wird DcuB-PhoA plasmidkodiert exprimiert (IMW503 mit pMW2334) oder wildtypisches DcuB chromosomal (IMW237), liegt nur ein kleiner Teil DcuS als DcuS<sub>F</sub> vor.

### 5.3 Die Konzentration von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Mäusedarm

Die Rolle des C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsels und dessen Regulation für die Fitness kommensaler *E. coli* Stämme ist wenig untersucht. Besiedlungsexperimente haben jedoch gezeigt, dass die Fumaratreduktase FrdABCD essentiell für die Besiedlung des Darms von mit Streptomycin behandelte Mäuse ist (Jones *et al.* 2007; Jones *et al.* 2011). Der anaerobe C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsel spielt hier offensichtlich eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund sollte die Verfügbarkeit von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Darm, dem natürlichen Lebensraum von *E. coli*, untersucht werden. Hierzu wurde der Darminhalt von Mäusen analysiert. Die Proben wurden durch Dr. Kerstin Nagel-Wolfrum (Institut für molekulare Physiologie, Mainz) an vier Positionen des Darms entnommen (Abb. 33 B) und anschließend wurde ein wässriges Extrakt hergestellt. Die so gewonnenen Proben wurden in Kooperation mit Dr. Hannes Link (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) mittels LC-MS/MS auf ihren Gehalt an Fumarat, Succinat, L-Aspartat und L-Malat untersucht.

Die Fumarat Konzentration war in allen vier untersuchten Abschnitten sehr niedrig (Abb. 33 A; Tab. A 2). Im Bereich des Dünndarms lag sie bei  $56 \pm 18 \mu\text{mol}$  (proximal) und  $42 \pm 20 \mu\text{mol}$  pro kg Darminhalt. Die Konzentration von L-Malat war im Dünndarm etwas höher und lag bei  $188 \pm 50 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (proximal) bzw.  $142 \pm 42 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (distal). Im Bereich des Dickdarms waren L-Malat und Fumarat kaum nachzuweisen. Die Succinat-Konzentration lag sowohl im Bereich des Dickdarms als auch im Bereich des Dünndarms höher als die Konzentration von Fumarat. Hier wurden Konzentrationen von  $293 \pm 212 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (proximal) und  $496 \pm 388 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (distal) im Dünndarm sowie  $104 \pm 113 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (proximal) und  $218 \pm 165 \mu\text{mol kg}^{-1}$  im Dickdarm. Die Aminosäure L-Aspartat war im Dünndarm in vergleichbar hoher Konzentration zu finden. Hier lagen Konzentrationen von  $4359 \pm 847 \mu\text{mol kg}^{-1}$  (proximal) und  $2451 \pm 793 \mu\text{mol kg}^{-1}$  vor. Im Dickdarm waren deutlich niedrigere Gehalte zu finden, die jedoch immer noch etwas über den Gehalten der anderen Metabolite lagen. Die Gehalte aller Metabolite unterlagen dabei starken Schwankungen zwischen den Proben. Es konnte jedoch die Tendenz festgestellt werden, dass die Konzentrationen von L-Aspartat, L-Malat und Fumarat mit zunehmender Darmpassage abnehmen. Insgesamt wurden die höchsten Konzentrationen im Bereich des Dünndarms gefunden. Im Bereich des Dickdarms waren von allen untersuchten C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten nur sehr geringe Konzentrationen zu finden. Auch der Gehalt von Succinat war im Dickdarm geringer als im Bereich des Dünndarms. Die Abnahme der Konzentration von Succinat im Dickdarm war jedoch weniger ausgeprägt als bei den anderen Metaboliten.

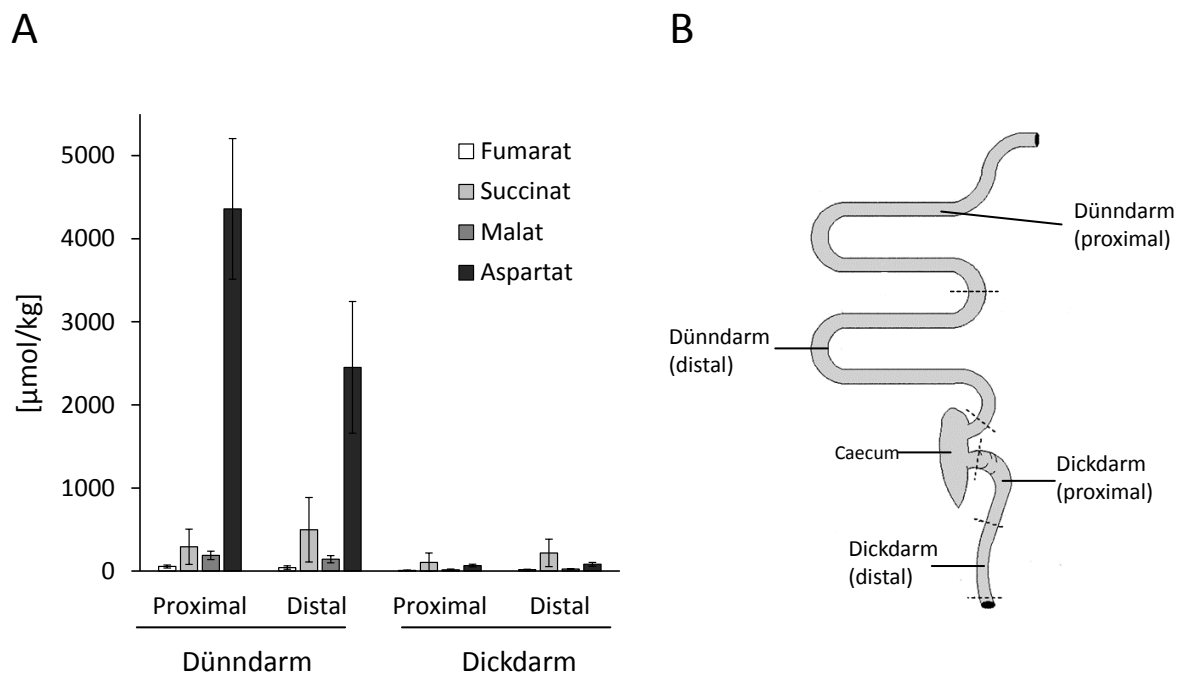


Abb. 33 A: Konzentration der C<sub>4</sub>-Dicarboxylate Fumarat, Succinat, Malat und Aspartat im Darminhalt von männlichen Mäusen. Es wurden für jede Position drei BR analysiert. B: Schematische Übersicht über den Mäusedarm und die Bereiche der Probenentnahme. Darstellung verändert aus Stephens *et al.* (2002).

Die Konzentrationen von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Darm lagen zum größten Teil in einem niedrigen mikromolaren Bereich. Nur im Dünndarm waren sogar bis zu 4 mM L-Aspartat zu finden. Aus diesem Grund sollte der Konzentrationsbereich des DcuSR-Systems charakterisiert werden. Hierzu wurde die Expression von *dcuB-lacZ* bei verschiedenen Effektorkonzentrationen untersucht. Der wildtypische Reporterstamm IMW237 (Zientz *et al.* 1998), der über eine *dcuB-lacZ* Promotor-Fusion verfügt, diente hier als Teststamm. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9 mit DMSO (20 mM) und Glycerin (50 mM). Um eine gleichbleibende Effektorkonzentration während der Zucht zu gewährleisten, wurde Maleinat als Effektor gewählt. Maleinat wird als *cis*-Isomer von Fumarat auch von DcuS erkannt, aber nicht verstoffwechselt. Die Zellen wurden entweder bis in die exponentielle Phase gezüchtet oder in der stationären Phase geerntet. Dies hatte jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Expression von *dcuB-lacZ* (Abb. 34). Bei niedrigen Maleinat-Konzentrationen unter 100  $\mu\text{M}$  ist die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität kaum höher als in Abwesenheit des Effektors. Ab 100  $\mu\text{M}$  Maleinat war bereits eine leichte Steigerung der Aktivität zu festzustellen. In den vorliegenden Versuchen wurde eine Sättigung zwar nicht erreicht; aus früheren Arbeiten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die maximale Aktivität etwa ab einer Effektorkonzentration von 10 mM erreicht wird (Kneuper *et al.* 2005). Die halbmaximale Aktivität, der apparente  $K_m$ -

Wert, liegt etwa bei 2 mM, was auch mit früheren Messungen übereinstimmt (Kneuper *et al.* 2005). Die Daten zeigen, dass der Sensor DcuS auch bei den im Mäusedarm gemessenen Konzentrationen bereits aktiv ist. Insbesondere im Dünndarm wurden Konzentrationen erreicht, die zu einer Aktivierung von DcuS führen. Im Dickdarm hingegen, dem Hauptlebensraum von *E. coli*, lagen nur niedrige Konzentrationen vor, sodass DcuS hier wahrscheinlich nur schwach aktiviert wird. Die Konzentrationen von Fumarat und L-Malat sind in diesem Bereich zu niedrig um einen Einfluss auf DcuS zu haben. In dem Konzentrationsbereich, in welchem L-Aspartat und L-Malat gefunden wurden, ist aber bereits eine geringe Induktion der *dcuB-lacZ* Expression zu beobachten.

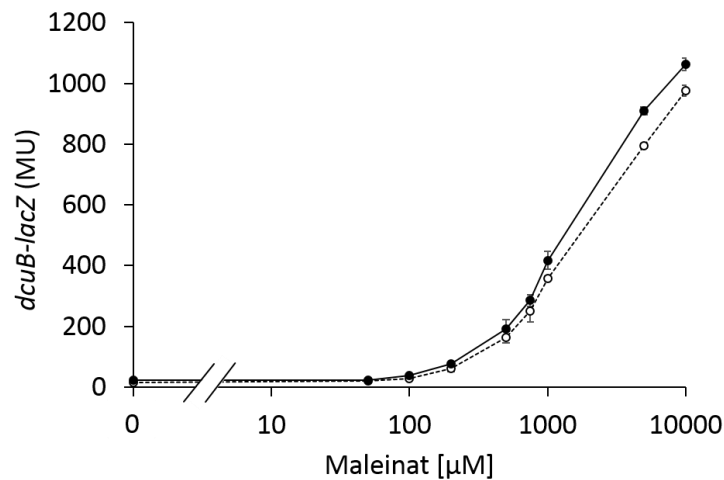


Abb. 34 Expression von *dcuB-lacZ*. IMW237 wurde anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM), DMSO (20 mM) und steigenden Konzentrationen von Maleinat gezüchtet. Die Zellen waren in der exponentiellen Phase (weiß) oder in der stationären Phase (schwarz).

## 6 Diskussion

### 6.1 Der DcuB/DcuS-Sensorkomplex

#### 6.1.1 Signalerkennung im DcuS/DcuB-Sensorkomplex

Die beiden C<sub>4</sub>-Dicarboxylat Transporter DcuB und DctA interagieren mit der Sensorkinase DcuS (Witan *et al.* 2012a; Witan 2012; Wörner *et al.* 2016). Dabei führt eine Deletion von *dctA* oder *dcuB* zu einer konstitutiven Aktivierung von DcuS (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009). Dies wurde als Hinweis auf eine Beteiligung des Transporters bei der Signalerkennung gewertet und eine Rolle als Fluxsensor diskutiert (Witan *et al.* 2012b). Um diese mögliche Rolle von DcuB für die Signalerkennung zu untersuchen, wurden die Substratspezifitäten von DcuS und DcuB bestimmt und miteinander verglichen. Beide Proteine erkennen dabei ein sehr breites Spektrum an Substraten. Sowohl DcuB, als auch DcuS erkennen L-Malat, D-Malat, L-Aspartat und D-Tartrat (Abb. 35). Das Substratspektrum des Sensors ist jedoch etwas breiter als das Substratspektrum des Transporters DcuB. So führen auch Maleinat, L-Tartrat und meso-Tartrat sowie 3-Nitropropionat und Citrat zu einer Induktion der *dcuB-lacZ* Reporterfusion. Diese Substrate führen jedoch nicht zu einer Hemmung der Aufnahme von [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat über DcuB. Bei einer Beteiligung des Transporters DcuB an der Signalerkennung, wäre eine Induktion von *dcuB-lacZ* nur bei Substraten zu erwarten, die auch von DcuB transportiert werden. Auch die Erhöhung der Konzentration von Maleinat und 3-Nitropropionat im Transportassay, hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von markiertem Fumarat. Demnach weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der DcuS/DcuB-Sensorkomplex das Signal über DcuS und nicht über den Transporter erkennt. Der Sensor DcuS weist außerdem eine deutlich niedrigere Affinität zu Substraten auf, als die Transporter DctA und DcuB. Für DcuS liegt der apparente K<sub>m</sub>, je nach Substrat, zwischen 0,45 mM (3-Nitropropionat) und etwa 3 mM (Kneuper *et al.* 2005). Für die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate L-Aspartat und Maleinat liegt die apparente K<sub>m</sub> bei 2 mM. Der K<sub>m</sub> von DcuB für die Aufnahme von Fumarat hingegen liegt bei etwa 100 bis 200 µM (Engel *et al.* 1994). Der K<sub>m</sub> Wert von DctA für die Aufnahme von Succinat liegt bei 30 µM bis 50 µM und ist damit sogar noch etwas niedriger (Kay & Kornberg 1971; Gutowski & Rosenberg 1975). Die Transporter sind also schon bei Konzentrationen aktiv, bei denen der Sensor den Effektor noch nicht erkennt. Die Bindung und Erkennung von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten erfolgt in DcuS dabei über die PAS<sub>P</sub>-Domäne (Pappalardo *et al.* 2003; Kneuper *et al.* 2005; Cheung & Hendrickson 2008). So konnte die Struktur der isolierten PAS<sub>P</sub> Domäne



in Gegenwart von gebundenem L-Malat kristallographisch gelöst werden (Cheung & Hendrickson 2008) und durch den gezielten Austausch von Resten, die an der Substratbindung beteiligt sind, konnte weiterhin die Substratspezifität von DcuS moduliert werden (Krämer *et al.* 2007; Kneuper *et al.* 2005; Wörner *et al.* 2016).

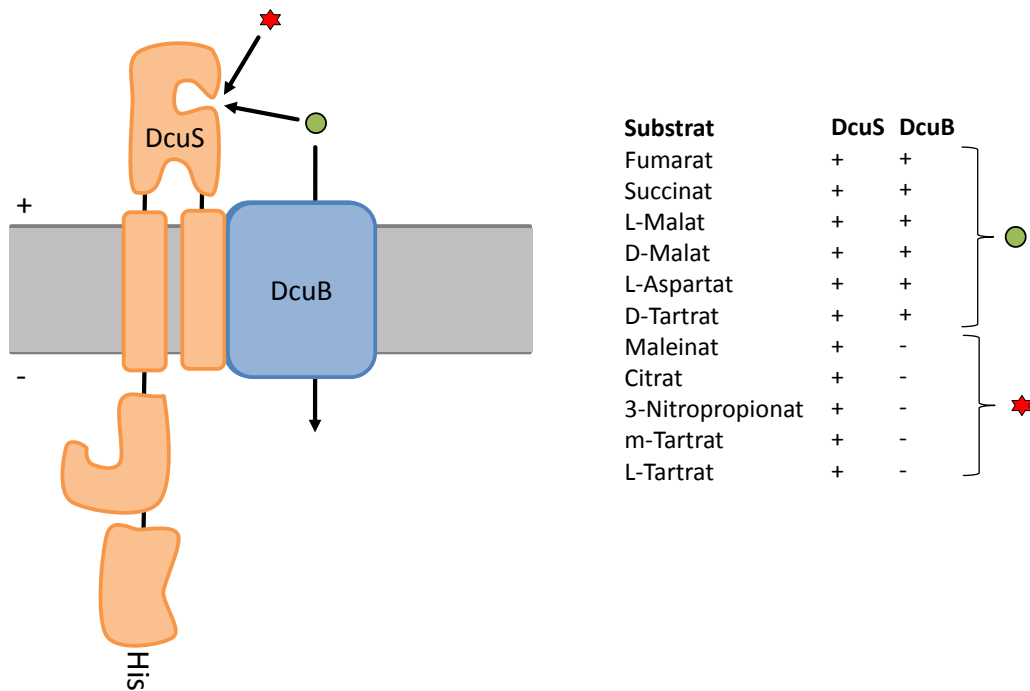


Abb. 35 Übersicht über Effektoren, die nur von DcuS erkannt werden (roter Stern) und Effektoren, die sowohl von DcuS als auch von DcuB erkannt werden (grüner Kreis). Es sind keine Effektoren bekannt, die nur von DcuB erkannt werden.

Für DcuB wurden außerdem die Varianten DcuB (E79A), DcuB (R83A) und DcuB (R183A) beschrieben, die in ihrer Transportfunktion eingeschränkt sind, aber weiterhin regulatorisch aktiv sind (Kleefeld *et al.* 2009). Aber auch der umgekehrte Fall wurde beschrieben, bei dem die DcuB-Varianten K353A, T394I und D398N eine wildtypische Transportfunktion aufweisen aber regulatorisch defizient sind (Kleefeld *et al.* 2009). Die Transportfunktion ist folglich nicht notwendig für die regulatorische Funktion von DcuB und beide Funktionen lassen sich gezielt ausschalten, ohne die jeweils andere Funktion zu beeinträchtigen. Zusammen mit den vorherigen Argumenten zeigt dies, dass die Signalerkennung durch DcuS erfolgt. Der Transporter DcuB dagegen ist für die Signalerkennung nicht direkt nötig. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für den aeroben Transporter DctA (Steinmetz *et al.* 2014). Auch hier ist DctA nicht direkt an der Signalerkennung beteiligt. Dennoch werden die Transporter DcuB und DctA für eine normale Funktion des Sensors benötigt.

Neben dem DcuSR mit den beiden Koregulatoren DcuB und DctA sind auch weitere Sensorsysteme bekannt, bei denen Transporter regulatorische Funktionen übernehmen. So kommen homologe DctA Transporter in vielen Bakterien vor und spielen oft eine Rolle bei der Regulation der Aktivität der zugehörigen Sensorkinasen. Eine regulatorische Funktion wurde zum Beispiel für DctA aus *Bacillus subtilis* und *Sinorhizobium meliloti* beschrieben (Asai *et al.* 2000; Yarosh *et al.* 1989).

In *Sinorhizobium meliloti* wird die Expression von DctA<sub>Sm</sub> durch das DctBD Zweikomponentensystem reguliert. Die Sensorkinase DctB ist nicht verwandt mit DcuS. Sie zeigt aber, ähnlich wie DcuS, in Abwesenheit von DctA<sub>Sm</sub> eine konstitutive Aktivität. Anhand dieses Systems wurde auch erstmals eine sensorische Funktion von DctA-Transportern postuliert (Yarosh *et al.* 1989). Bei genauer Betrachtung, ergeben sich aber auch hier Hinweise, die auf eine regulatorische Funktion von DctA<sub>Sm</sub>, nicht jedoch auf eine sensorische deuten. Ähnlich wie in *E. coli* induziert zum Beispiel Maleat die Expression von DctA<sub>Sm</sub>, wird aber von DctA<sub>Sm</sub> nicht erkannt (Yurgel *et al.* 2000).

Auch bei DctA<sub>Bs</sub> aus *Bacillus subtilis* wurde ein ähnlicher Einfluss von DctA<sub>Bs</sub> beobachtet. Die mit DcuS<sub>Ec</sub> nah verwandte Sensorkinase DctS<sub>Bs</sub> zeigt unabhängig von der Gegenwart eines Effektors eine konstitutive Aktivität in Abwesenheit von DctA<sub>Bs</sub> (Asai *et al.* 2000; Graf *et al.* 2014). Neben DctA wird hier aber auch das periplasmatische Bindeprotein DctB<sub>Bs</sub> für die Signalerkennung durch DctS<sub>Bs</sub> benötigt (Asai *et al.* 2000; Graf *et al.* 2014).

Demgegenüber stehen Systeme, bei denen der Transporter eine klare Rolle als Sensor übernimmt. Ein Beispiel hierfür ist das Zusammenspiel des Lysintransporters LysP mit dem pH-Sensor CadC (Tetsch *et al.* 2008; Tetsch & Jung 2009). Unter sauren Umgebungsbedingungen und in Gegenwart von Lysin aktiviert dieses System die Expression der Lysindecarboxylase CadA und des Lysin-Cadaverin Antiporters CadB. Bei der Decarboxylierung von Lysin im Cytoplasma werden Protonen verbraucht. Dabei erkennt CadC zwar den pH-Wert über ein Cluster negativ geladener Aminosäuren, kann selbst jedoch Lysin nicht detektieren (Haneburger *et al.* 2011). Hierzu ist CadC auf den Transporter LysP angewiesen, der Lysin transportiert. Es wird postuliert, dass LysP seinen Funktionszustand über Konformationsänderungen an CadC weitergibt (Tetsch & Jung 2009; Rauschmeier *et al.* 2014). Bei anderen Sensorsystemen haben die Transporter keinen direkten Einfluss auf die Regulation, weder als direkte sensorische Einheit, noch als akzessorischer Koregulator. Dies gilt zum Beispiel für die Regulation des Malatstoffwechsels in *Lactobacillus casei* durch MaeKR (Landete *et al.* 2010; Landete *et al.* 2013). *L. casei* verfügt über zwei L-Malatsensoren. Der wie DcuS zur CitA-Familie gehörende Sensor MaeK benötigt keine akzessorischen Proteine und

Koregulatoren. MleR, ein zweiter Malatsensor, weist hingegen eine cytosolische Lokalisierung auf (Landete *et al.* 2013). Er ist zwar nicht direkt von einem Transporter abhängig, auf Grund seiner cytosolischen Lokalisierung muss L-Malat allerdings zunächst in die Zelle transportiert werden, bevor es durch MleR erkannt werden kann.

Auch der Citratsensor CitA, der namensgebende Sensor der CitA-Familie, benötigt keine Transporter für seine Funktion (Scheu *et al.* 2012). Damit sind mit CitA und MaeK mindestens zwei sehr nahe mit DcuS verwandte Sensorkinasen bekannt, die nicht auf Koregulatoren wie DcuB angewiesen sind. Dies deutet darauf hin, dass für Sensorhistinkinasen der CitA-Familie keine grundsätzliche Notwendigkeit eines Koregulators besteht. Die komplizierte zweistufige Regulation von DcuS bietet wahrscheinlich vielmehr einen physiologischen Vorteil, der seine Entwicklung begünstigt haben könnte. C<sub>4</sub>-Dicarboxylate wie L-Malat, L-Aspartat und Fumarat stellen wichtige und wahrscheinlich gut verfügbare Substrate dar, die jedoch meist in nur niedrigen Konzentrationen auftreten. Ein Mechanismus, der einerseits eine basale Expression der benötigten Gene sicherstellt, andererseits die bedarfsgerechte Modulation der Expression erlaubt, bietet unter diesen Voraussetzungen möglicherweise einen entscheidenden Vorteil.

### 6.1.2 Die Interaktion zwischen DcuS und DcuB

Der anaerobe Transporter DcuB wird für die Funktion von DcuS benötigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass DcuB ähnlich wie DctA direkt mit DcuS interagiert (Witan *et al.* 2012a; Witan 2012; Wörner *et al.* 2016). Im Gegensatz zu DctA war es für DcuB deutlich aufwändiger die Interaktion experimentell zu bestätigen. Da sowohl der C- als auch der N-Terminus von DcuB eine periplasmatische Lokalisierung aufweisen (Bauer *et al.* 2011), wurde ein T25-Fragment in die cytoplasmatische Schleife zwischen Helix VII und Helix VIII kloniert (Witan 2012). Mit diesem sogenannten Sandwich-Konstrukt (DcuB<sub>SW</sub>) konnte die Interaktion zwischen DcuB und DcuS im BACTH-System nachgewiesen werden. Ergänzende Hinweise, dass es tatsächlich eine direkte Interaktion zwischen DcuS und DcuB gibt kommen von mHPINE Experimenten (Wörner *et al.*, 2016). Da die Effektorbindung einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Sensor und akzessorischem Transporter haben kann, wurde hier untersucht, welchen Effekt Fumarat auf die Interaktion zwischen DcuS und DcuB hat. Die Interaktion scheint dabei weitestgehend unabhängig von Fumarat zu sein. In BACTH Experimenten kommt es zwar zu unterschiedlichen Ergebnissen, je nachdem ob dem Medium Fumarat hinzugefügt wurde oder nicht. Dies ist jedoch von den verwendeten Fusionskonstrukten abhängig. Sowohl die Zunahme, als auch die Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nach Zugabe von Fumarat konnte beobachtet werden. Eine ähnliche Beobachtung für den aeroben Transporter DctA führte

zu der Vermutung, dass es zu einer Modulation der Interaktion kommt, nicht aber zu einer Auflösung (Witan 2012). In Untersuchungen der Lokalisierung von DcuS und DctA wurden außerdem keine Unterschiede in der Verteilung der beiden Proteine zwischen den Zellen festgestellt, die mit oder ohne Fumarat gezüchtet wurden (Scheu *et al.* 2014). Dies unterstützt die Annahme, dass die Interaktion von DcuS und DctA unabhängig von der Gegenwart von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten ist. Aus diesem Grund kommt es sehr wahrscheinlich auch zwischen DcuB und DcuS zu einer Effektor unabhängigen Interaktion.

Bei dem aeroben Transporter DctA dient die im Cytoplasma gelegene C-terminale Helix 8b als Interaktionsstelle für die Interaktion mit dem Sensor DcuS (Witan *et al.* 2012a). Das Sequenzmotiv LDxxLxxxL dient wahrscheinlich als Interaktion-vermittelndes Motiv (Witan *et al.* 2012a). Der anaerobe Transporter DcuB weist zwar keine C-terminale Helix mit cytoplasmatischer Orientierung auf, aber die zwischen Transmembranhelix XI und XII gelegene cytoplasmatische Schleife mit Helix XIb hat ein ähnliches Sequenzmotiv (Witan 2012). Dieses AxxxAxxxA Motiv, enthält drei Alaninreste, die jeweils im Abstand einer helikalen Windung zueinander auftreten und somit auf der gleichen Seite der Helix XIb liegen. In den vorliegenden Versuchen konnten keine eindeutigen Hinweise auf eine Bedeutung des Motivs für die Interaktion mit DcuS gefunden werden. Varianten von Helix XI b zeigten in den meisten Fällen ein wildtypisches Verhalten und konnten einen DcuB-defizienten Stamm komplementieren. Die wenigen Varianten, die nicht mehr in der Lage waren die regulatorische Funktion von DcuB zu komplementieren, waren auch in anderen funktionalen Aspekten gestört. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass sie nicht ordentlich gefaltet und in die Membran integriert wurden, sodass der beobachtete Regulationsdefekt nicht spezifisch auf eine Störung der Interaktion zurückgeführt werden kann. Dennoch scheint die Region um Helix XIb wichtig für die funktionale Interaktion mit DcuS zu sein. Bei den regulatorischen DcuB-Varianten T394I und D398A liegen die ausgetauschten Reste in unmittelbare Nähe von Helix XIb (Kleefeld *et al.* 2009; Bauer *et al.* 2011). Neben den beiden regulatorischen Varianten T394I und D398A existiert aber auch noch die dritte regulatorische Variante K353A (Kleefeld *et al.* 2009). Der Rest K353 liegt im transmembranen Bereich der Helix XI (Bauer *et al.* 2011).

Für den aeroben Transporter DctA wurde außerdem die periplasmatische Helix 3b vorhergesagt, die in der Struktur des homologen Glutamattransporters Glt<sub>Ph</sub> aus *Pyrococcus horikoshii* nicht vorkommt (Witan 2012). Einen Beitrag der Helix 3b zur Interaktion zwischen DcuS und DctA wurde bisher noch nicht untersucht, die Position bietet sich jedoch gut als Interaktionsstelle an. Für DcuB ist nach dem Topologie Modell von Bauer *et al.* (2011) keine

solche periplasmatische Helix bekannt, dennoch ist auch hier nicht auszuschließen, dass periplasmatische Bereiche von DcuB zur Interaktion mit DcuS beitragen.

### 6.1.3 Überführung von DcuS in den DcuS/DcuB-Sensorkomplex

Der Transporter DcuB besitzt zwar keine sensorische Funktion, wird aber für die ordnungsgemäße Funktion von DcuS benötigt (Wörner *et al.* 2016). Auf diese Weise reguliert DcuB durch die Interaktion mit DcuS seine eigene Expression negativ. Dies wurde bereits für den aeroben Transporter DctA näher untersucht, indem DctA von einem durch L-Arabinose induzierbaren pBAD-Promotor exprimiert wurde (Steinmetz *et al.* 2014). In ähnlicher Weise wurde hier DcuS mit dem anaeroben Transporter DcuB-PhoA titriert. Die Reduktion der basalen Expression von *dcuB-lacZ* durch die gesteigerten DcuB-Gehalte war nur gering. Die Erhöhung des DctA-Gehaltes hatte einen deutlich stärkeren Effekt (Steinmetz *et al.* 2014). Dennoch zeigt auch dieses Experiment, dass DcuB den Sensor in Abwesenheit von Fumarat in einen inaktiven Zustand versetzt. Die basale Expression von DcuB-PhoA über den pBAD-Promotor scheint dabei bereits einen Transportergehalt zu gewährleisten, der DcuS weitestgehend in den inaktiven Zustand versetzt. Dennoch lässt sich die Aktivität von DcuS durch eine stärkere Expression von DcuB-PhoA zu einem gewissen Teil weiter senken. Interessanterweise wird DcuS aber weiterhin durch die Zugabe von Fumarat nahezu maximal induziert. Dies bedeutet, dass DcuB in Gegenwart eines Effektors keinen negativen Einfluss auf die Aktivität von DcuS hat. Durch die Titration mit DcuB wird DcuS also in einen Standby-Zustand versetzt, in dem die Aktivität von der Präsenz von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten abhängt.

Der Versuch DcuB-PhoA über einen induzierbaren Promotor in so geringem Maß zu exprimieren, dass größere Anteile DcuS als freies DcuS<sub>F</sub> vorliegen, war dagegen nicht erfolgreich. Dies wurde auch durch die absolute Quantifizierung von DcuS und DcuB-PhoA bestätigt (siehe Abschnitt 6.2). Offenbar ist die basale Expression des pBAD-Promotors zu stark, um eine niedrigere DcuB-PhoA-Kopienzahl einzustellen.

Ein weiterer experimenteller Ansatz bestand darin, bei konstanter Expression von DcuB-PhoA die Expression von DcuS zu variieren. Dadurch sollte versucht werden den Anteil von freien DcuS<sub>F</sub> am gesamten DcuS zu erhöhen. Bei starker Expression von DcuS von einem induzierbaren Promotor war allerdings nur eine geringe DcuS-Aktivität zu messen. Im Vergleich mit anderen Stämmen (z.B. IMW503 mit pMW2334; vgl. Abb. 15) ist hier auch die Aktivität in Gegenwart von Fumarat eher niedrig. Hier spielen möglicherweise noch andere Effekte eine Rolle. So hat DcuS neben einer Kinaseaktivität auch eine Phosphataseaktivität (Gencheva 2016). Eine Überexpression von DcuS könnte möglicherweise dazu führen, dass

phosphoryliertes DcuR schneller dephosphoryliert wird. Dies könnte zu der niedrigen *dcuB-lacZ* Expression führen, die in den Experimenten beobachtet wurde. Hierzu sind aber weitere Untersuchungen nötig.

### 6.2 Absolute Quantifizierung des Sensors DcuS und der Transporter DcuB und DctA

Mit Hilfe der SRM-Methode konnte der zelluläre Gehalt der Sensorhistidinkinase DcuS sowie der Transporter DcuB und DctA über den Vergleich mit <sup>13</sup>C-markierten Standardpeptiden quantifiziert werden. Zuvor wurde nur die Expression von DcuS, DcuB und DctA auf transkriptioneller Ebene über Reportergergemessungen untersucht (Golby *et al.* 1998; Zientz *et al.* 1998; Golby *et al.* 1999; Oyamada *et al.* 2007). Bei diesen Messungen wurde nach Zucht auf Fumarat eine etwa 11-fach höhere  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gefunden, als nach Zucht auf eM9 mit Glycerin und DMSO (Zientz *et al.* 1998). Bei der Messung von Reportergergenaktivitäten wird jedoch nicht der tatsächliche Anstieg der Expression von *dcuB* bestimmt, sondern die Aktivität des als Reporter verwendeten  $\beta$ -Galaktosidase-Enzyms. Hier wurde nun die tatsächliche Zunahme des Transportergehaltes bestimmt.

Schmidt *et al.* (2016) haben für verschiedene Bedingungen bereits ein quantitatives *E. coli* Proteom bestimmt, das 2359 *E. coli* Proteine umfasst. Die von den Autoren verwendeten Bedingungen waren jedoch ausnahmslos aerob. So konnten sie zwar DctA nachweisen und quantifizieren, DcuS und DcuB waren aber nicht in ihrem Datensatz enthalten. Außerdem wurde eine absolute Quantifizierung nur für ausgewählte Proteine durchgeführt; die Quantifizierung der übrigen Proteine erfolgte über einen Vergleich mit diesen Referenzproteinen. In der vorliegenden Arbeit hingegen erfolgte eine gezielte Quantifizierung der Proteine DcuS, DcuB und DctA unter aeroben und anaeroben Bedingungen über den Vergleich mit schweren Standardpeptiden. Da es sich bei diesen drei Zielproteinen um Membranproteine handelt, erfolgte vor der Quantifizierung eine Anreicherung der Membranfraktion. Erst dies ermöglichte es den nur in kleiner Kopienzahl vorliegenden Sensor DcuS zu detektieren.

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob DcuB und DctA auch unter nicht induzierenden Bedingungen gebildet werden. In Abwesenheit von Fumarat ist auch in wildtypischen Reporterstämmen eine DcuS-abhängige Expression eines *dcuB-lacZ* Reportergergens zu beobachten. Da DcuS in Abwesenheit von DcuB und DctA konstitutiv aktiv ist (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009), müssten die Transporter immer in geringer Menge gebildet werden,

um DcuS in den inaktiven und responsiven Zustand zu überführen. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Vermutung. Bereits unter nicht induzierenden Bedingungen liegt ein Überschuss von DctA oder DcuB gegenüber DcuS vor. Dies unterstreicht, dass die Transporter DctA und DcuB auch in Abwesenheit von Fumarat als Koregulator benötigt werden.

Der Sensor DcuS liegt dabei nur in sehr niedriger Kopienzahl pro Zelle vor und die Gehalte liegen nahe an der Nachweisgrenze. Aus diesem Grund wurde DcuS wahrscheinlich nur in den angereicherten Membranen gefunden. In der Arbeit von Schmidt *et al.* (2016) wurde der Sensor DcuS zum Beispiel nicht gefunden, obwohl er unter aeroben Bedingungen gebildet werden sollte. Auch andere Sensorkinasen wie KdpD und CpxA (40 bzw. 41 Moleküle pro Zelle) kommen nur in geringer Kopienzahl pro Zelle vor, sodass die gefundenen DcuS-Gehalte plausibel erscheinen (Surmann *et al.* 2014; Surmann *et al.* 2016). Dabei variiert die DcuS-Kopienzahl zwar in geringem Maß zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen, ein Einfluss von Fumarat auf die Expression von DcuS wurde jedoch nicht gefunden. Dies passt auch zu Expressionsstudien, bei denen DcuS und C<sub>4</sub>-Dicarboxylate keinen Einfluss auf die Expression von *dcuS* hatten (Oyamada *et al.* 2007). Die Transporter DctA und DcuB hingegen werden beide eindeutig durch Fumarat im Zuchtmedium induziert. Im Wildtypstamm W3110 steigt der DctA-Gehalt nach Zucht auf Fumarat etwa um den Faktor 3,0. Für DctA wurden vergleichbare Kopienzahlen auch von Schmidt *et al.* (2016) berichtet. Die Autoren haben das quantitative Proteom von *E. coli* für verschiedene aerobe Zuchtbedingungen bestimmt. In den Daten sind auch die Gehalte von DctA, DcuR, FrdA sowie DcuA verfügbar, nicht aber die von DcuS und DcuB (Anhang Abb. A 4). Nach aerober Zucht in M9-Medium unter Zugabe von Glucose finden die Autoren nur 37 DctA-Kopien pro Zelle (vgl. Tab. 10). Dagegen konnten sie eine klare Induktion des aeroben Transporters DctA nach Zucht auf Succinat (567), Fumarat (596) und LB-Medium (623) beobachten. Die in der vorliegenden Untersuchung durch SRM bestimmte DctA-Kopienzahl nach Zucht auf Fumarat entspricht somit recht genau dem von Schmidt *et al.* (2016) abgeschätzten DctA-Gehalt nach Zucht auf C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-haltigen Medien. Nach Zucht in Gegenwart von Glycerin finden Schmidt *et al.* (2016) nur 97 Kopien. Dies ist weniger als in der vorliegenden Untersuchung. Bei Schmidt *et al.* (2016) erfolgte die Zucht jedoch in M9-Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle, während in der vorliegenden Untersuchung dem Medium stets AHC zu dem M9-Medium zugesetzt wurde. Tatsächlich finden die Autoren nach Zucht in M9 mit Glycerin und Aminosäuren 364 DctA-Kopien.

Die DcuB-Gehalte sind in Abwesenheit von Fumarat etwas höher als die DctA-Gehalte, liegen mit 273 DcuB-Molekülen pro Zelle aber auf einem ähnlichen Niveau. DcuB wird durch

Fumarat deutlich stärker induziert und erreicht nach Zucht mit Fumarat etwa 3396 Moleküle pro Zelle. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus Reporterstudien, in denen die Induktion von *dctA-lacZ* Fusionen stets schwächer war als die Induktion von *dcuB-lacZ* Fusionen (Zientz *et al.* 1998; Bauer 2010; Witan 2012).

Tab. 10 Absolute Gehalte von DctA, DcuS und DcuB. a: Werte wurden in dieser Arbeit bestimmt. Die Zucht erfolgte in eM9 (für DctA aerob, ansonsten anaerob). Bei aeroben Zuchten wurde entweder Glycerin (50 mM) oder Fumarat (50 mM) als Kohlenstoffquelle hinzugegeben. Bei anaeroben Zuchten (DcuS und DcuB), wurde stets Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) hinzugegeben und wo angegeben Fumarat (20 mM). b: Werte von Schmidt *et al.* (2016). Die Zucht erfolgte hier aerob in M9-Medium mit Aminosäuren (ohne Fumarat), mit 17,5 mM Fumarat (mit Fumarat) oder 27 mM Glucose (mit Glucose).

	<b>DctA<sup>a</sup></b> [Moleküle/Zelle]	<b>DctA<sup>b</sup></b> [Moleküle/Zelle]	<b>DcuS<sup>a</sup></b> [Moleküle/Zelle]	<b>DcuB<sup>a</sup></b> [Moleküle/Zelle]
<b>ohne Fumarat</b>	197,3	364	23,8	273,0
<b>mit Fumarat</b>	583,0	596	18,5	3395,9
<b>mit Glucose</b>	n.b.	37	n.b.	n.b.

Für DcuB wurde die Transportaktivität mit dem Gehalt an DcuB in Beziehung gesetzt. In einem Stamm, in dem die beiden Transporter *dcuA* und *dcuC* ausgeschaltet waren, korrelierte die Aufnahmeaktivität mit der Zunahme des DcuB-Gehaltes. Interessanterweise ist im wildtypischen Stamm W3110 eine solche Korrelation nicht zu beobachten. Offenbar sind die beiden Transporter DcuA und DcuC hier auch an der Aufnahme von Fumarat beteiligt. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die drei Dcu-Transporter sich in ihrer Transportfunktion gegenseitig ersetzen können (Six *et al.* 1994).

Um das Verhältnis zwischen dem Sensor DcuS und dem Transporter genau einzustellen, wurden DcuB und DctA analog zu dem Titrationsexperiment (Steinmetz *et al.* 2014; Wörner *et al.* 2016; vgl. Abb. 15) von einem pBAD-Vektor exprimiert. Dies erlaubt es den Gehalt des Transporters einzustellen, ohne dass die Gehalte von DcuB und DctA einen Einfluss auf die Expression der Strukturgene *dcuB* oder *dctA* haben. Die absolute Quantifizierung der Transporter DcuB und DctA nach Expression über den pBAD-Vektor bestätigt die oben beschriebene Vermutung (vgl. 6.1.3). Obwohl der pBAD-Promotor als streng reguliert gilt (Guzman *et al.* 1995), wird auch ohne L-Arabinose genügend Transporter gebildet, um den Sensor DcuS in den DcuS/Transporter-Komplex zu überführen ( $DcuB/DcuS = 7,6$ ). Die Gehalte unter nicht induzierenden Bedingungen entsprechen dabei etwa den Transportergehalten, die auch im Wildtyp unter nicht induzierenden Bedingungen zu finden sind. Tatsächlich scheint es mit dem pBAD-Promotor nicht möglich zu sein, die



Transportergehalte so weit abzusenken, dass nicht genügend DcuB zur Komplexierung von DcuS vorliegt.

### 6.3 Stöchiometrie des DcuS/DcuB-Komplexes

Mit den absoluten Gehalten von DcuS, der Transporter DctA und DcuB und ihrer Korrelation mit dem Funktionszustand von DcuS können neue Informationen zu Aufbau und Funktion von DcuS gewonnen werden. Nahezu alle DcuS-Moleküle liegen also in Form eines DcuS/Transporter-Komplexes vor. Der Sensor liegt dabei sehr wahrscheinlich als  $\text{DcuS}_2$  vor (Scheu *et al.* 2010b). Während für DctA über den Vergleich mit homologen Proteinen eine trimere Form anzunehmen ist (Groeneveld *et al.* 2010; Boudker *et al.* 2007), ist der Oligomerisierungsgrad von DcuB bisher unbekannt. Da Membrantransporter häufig als Dimere (Veenhoff *et al.* 2002) oder Trimere vorliegen, ist auch im Fall von DcuB die Bildung von  $\text{DcuB}_2$  oder  $\text{DcuB}_3$  wahrscheinlich. Demnach wären unter nicht induzierenden Bedingungen etwa 10 % des gesamten DctA an der Bildung des DcuS-DctA-Komplexes beteiligt (Abb. 36). Wenn von einem  $[\text{DcuB}_2]_2[\text{DcuS}_2]$ -Komplex ausgegangen wird, lägen etwa 17,4 % der DcuB-Moleküle im Sensorkomplex vor. Wird analog zu DctA ein DcuB-Trimer angenommen, lägen 91  $\text{DcuB}_3$  vor. Hier wären sogar 26,2 % der DcuB-Moleküle an der Bildung des DcuS-Transporter-Komplexes beteiligt. Selbst bei einer vollständigen Komplexierung von DcuS sind immer nur 10 bis 26 % der DcuB- oder DctA-Moleküle an der Ausbildung des Komplexes beteiligt. Dies deckt sich mit Experimenten zur Lokalisierung von DcuS und DctA mittels Fluoreszenzmikroskopie: Wird *DcuS-mvenus* chromosomal von einem wildtypischen Promotor exprimiert, ist DctA über die komplette Zelle verteilt, wird *DcuS-mvenus* jedoch von einem Plasmid überproduziert, kommt es zu einer Rekrutierung von DctA an die Zellpole (Scheu *et al.* 2014). Dies weist darauf hin, dass DctA sowohl in freier Form, als auch in Form des DcuS/DctA Komplexes vorliegt.

Da in Reporter-Experimenten auch in Abwesenheit eines Effektors eine geringe Aktivität von DcuS feststellbar ist, ist anzunehmen, dass auch in Gegenwart von DcuB geringe Mengen freies  $\text{DcuS}_F$  vorkommen. Unter der Annahme, dass in Abwesenheit des Effektors nur freies  $\text{DcuS}_F$  aktiv ist, wurde der Gehalt von  $\text{DcuS}_F$  abgeschätzt. Nach dieser Rechnung liegt in Abwesenheit von Fumarat etwa 1,6 % der gesamten DcuS-Moleküle als freies  $\text{DcuS}_F$  vor. Dies bedeutet, dass DcuS größtenteils als DcuS/DcuB-Komplex vorliegt. Sowohl die absolute Quantifizierung, als auch die Messung der Reporteragenaktivität können aber immer nur Aufschluss auf das Resultat einer bereits erfolgten Regulation liefern. Wird *E. coli* in Abwesenheit von  $\text{C}_4$ -Dicarboxylaten gezüchtet, dürfte es aber immer auch zu Situationen in einzelnen Zellen kommen, in denen die

DcuB bzw. DctA Gehalte nicht ausreichen, um DcuS<sub>F</sub> vollständig in einen inaktiven Komplex zu überführen. Bei den vorliegenden Experimenten wurden jedoch nicht einzelne Zellen, sondern immer Bakterienkulturen untersucht.

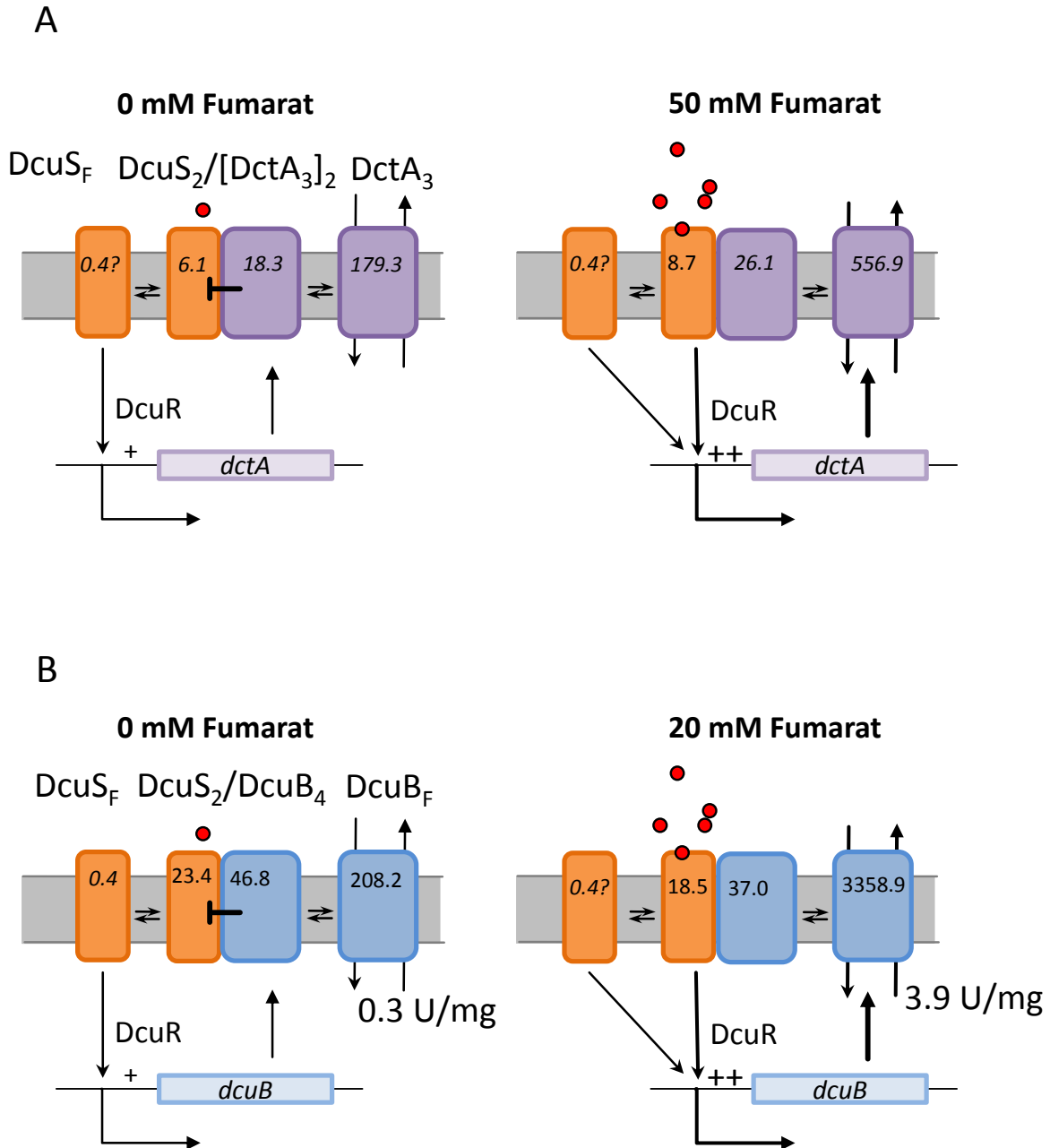


Abb. 36 Gehalte von DcuS und DctA (A) sowie DcuS und DcuB (B) unter nicht induzierenden (0 mM Fumarat) und induzierenden Bedingungen (50 bzw. 20 mM Fumarat). In Abwesenheit von Fumarat (0 mM Fumarat) ist nur freies DcuS<sub>F</sub> aktiv und induziert die Expression von *dctA* (aerob) oder *dcuB* (anaerob). Durch die Interaktion mit dem Transporter wird DcuS in den inaktiven DcuS/Transporter-Sensorkomplex überführt. Wahrscheinlich kommt DcuS nur in sehr geringen Mengen als freies DcuS<sub>F</sub> vor, die ausreichen um eine basale Expression von *dcuB* zu gewährleisten. Niedrige Konzentrationen von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten können so auch ohne Induktion durch DcuS genutzt werden. Liegen höhere C<sub>4</sub>-Dicarboxylatkonzentrationen (50 bzw. 20 mM Fumarat) vor, wird der DcuS/DcuB-Sensorkomplex aktiviert und es kommt zu starker Expression von *dctA* bzw. *dcuB*.

## 6.4 Verfügbarkeit von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Darm und physiologische Rolle des DcuS/DcuB-Sensorkomplexes

C<sub>4</sub>-Dicarboxylate wie L-Malat, L-Aspartat und Fumarat stellen zentrale Substrate im Stoffwechsel von *E. coli* dar. Über die Reaktionen des Citratzyklus kann L-Malat zu Fumarat umgesetzt werden. L-Aspartat wird über die Aspartase unter Abspaltung von Ammoniak direkt zu Fumarat umgesetzt (Guest *et al.* 1984). Fumarat dient in der Fumaratatmung als terminaler Elektronenakzeptor (Kröger *et al.* 1992). Die Fumaratatmung spielt für viele intestinale Bakterien eine wichtige Rolle; so zeigen *E. coli* Stämme mit inaktivierter Fumaratreduktase A bei der Kolonisierung von Mäusedärmen einen Fitnessnachteil gegenüber wildtypischen Stämmen (Jones *et al.* 2007; Jones *et al.* 2011) und in einer Analyse von 254 bakteriellen Genomen des menschlichen Darms fanden Ravcheev & Thiele (2014), dass Fumaratreduktasen die häufigsten anaeroben terminalen Reduktasen sind (vorhanden in 93 Genomen). In dieser Arbeit wurden daher die Konzentrationen von Fumarat, Succinat, Malat und Aspartat im Darminhalt von Mäusen bestimmt. Die höchsten Konzentrationen aller vier Metabolite wurden im Dünndarm gefunden. Fumarat und L-Malat lagen aber auch hier nur in geringen Mengen vor. So wurden im proximalen Teil des Dünndarms pro kg Darminhalt nur 56 µmol Fumarat und 188 µmol L-Malat gefunden. Auch in anderen Studien konnte Fumarat nicht oder nur in einer geringen Konzentration nachgewiesen werden (Cummings *et al.* 1987; Miranda *et al.* 2004). Für L-Malat sind in der Literatur keine Werte zu finden, jedoch berichten Cummings *et al.* (1987), dass Sie im menschlichen Darm nur wenig L-Malat (< 1 mmol l<sup>-1</sup>) finden konnten. Die Aminosäure L-Aspartat lag im proximalen Dünndarm in Konzentrationen von ca. 5 mmol pro kg vor. Bei Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung des Inhalts des menschlichen Jejunums fanden Adibi & Mercer (1973) mit 1,3 mmol l<sup>-1</sup> L-Aspartat vergleichbare Gehalte, wenn die Probanden 3 h vor der Beprobung eine Testmahlzeit zu sich genommen hatten. Die hier untersuchten Mäuse unterlagen keiner Diät und hatten jederzeit Zugang zu Nahrung.

Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate lagen fast alle in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Hinzu kommt eine große Schwankung der Konzentrationen zwischen den Proben. Nur L-Aspartat und Succinat kamen in höheren Konzentrationen vor. Mit zunehmender Darmpassage nahm aber auch die Konzentration von L-Aspartat ab. Dies entspricht dem, was über die Aufnahme von Nährstoffen im Darm bekannt ist: Einfache Metabolite werden im Dünndarm entweder über das Epithel aufgenommen oder von den Mikroorganismen des Dünndarms verbraucht (Zoetendal *et al.* 2012; Pereira & Berry 2017; Donaldson *et al.* 2016). Im Dünndarmepithel dient vor allem der

eukaryotische Na<sup>+</sup>/C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter NaDC1 für die Aufnahme von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten (Pajor 2000). Er hat etwa einen K<sub>m</sub> von 500 µM für Succinat. Dies liegt in einer vergleichbaren Größenordnung wie der K<sub>m</sub> von DcuB, der bei 100 bis 200 µM liegt. Auch die im Dünndarm vorhandenen Mikroorganismen tragen zur Verwertung einfacher Zucker und Nährstoffe bei. Gerade für Mikroorganismen im Dünndarm ist eine schnelle Aufnahme solcher einfachen Nährstoffe von großer Bedeutung, um mit dem Wirt konkurrieren zu können (Zoetendal *et al.* 2012).

Da die meisten einfachen Metabolite im Dünndarm aufgenommen werden, enthält der Nahrungsbrei, der den Dickdarm erreicht, vor allem komplexe Nahrungsbestandteile, wie Kohlenhydrate, pflanzliche Zellwände und Proteine (Gibson & Roberfroid 1995; Macfarlane & Macfarlane 1997). Tatsächlich wurden im Dickdarm nur sehr niedrige Konzentrationen aller C<sub>4</sub>-Dicarboxylate gefunden. Fumarat und L-Malat waren kaum nachzuweisen. Auch die L-Aspartat Konzentration ist mit etwa 60 µmol pro kg stark erniedrigt. Es liegt also ein klarer Konzentrationsgradient vom proximalen Teil des Dünndarms bis zum distalen Teil des Dickdarms vor. Von den hier untersuchten Metaboliten war Succinat im Dickdarm am höchsten konzentriert. Succinat fällt auch als Produkt der anaeroben Atmung oder eines fermentativen Stoffwechsels an, das unter anaeroben Bedingungen von *E. coli* und vielen anderen Bakterien nicht weiter verstoffwechselt werden kann. So kann es zu einer Akkumulation von Succinat kommen. Im Bereich des Dickdarms wurden aber auch nur geringe Mengen Succinat (100-200 µM) gefunden. Im Dickdarm kann Succinat auch von einigen Mikroorganismen weiter zu Propionat verstoffwechselt werden (Macy *et al.* 1978; Louis & Flint 2017; Fischbach & Sonnenburg 2011). Offenbar herrscht hier aber eine große Variabilität, sodass in manchen Fällen von einer Akkumulation von Succinat im Darm berichtet wird, in anderen Fällen kann, wie hier, aber nur eine geringe Menge gefunden werden (Louis & Flint 2017). Dies ist wahrscheinlich auch von der individuellen Zusammensetzung der mikrobiellen Population abhängig.

Vermutlich gelangt nur ein geringer Anteil des Aspartats als freies Aspartat in den Dickdarm. Im Dickdarm kann Aspartat aber aus noch unverdaulichem Proteinen hydrolytisch freigesetzt werden. Den menschlichen Dickdarm erreichen beispielsweise täglich etwa 6-15 g Protein (Hughes *et al.* 2000; Conlon & Bird 2014). Dabei kann Aspartat auch über Asparagin gewonnen werden. Dafür stehen *E. coli* die zwei Isoenzyme AnsA und AnsB der L-Asparaginase zur Verfügung (Schwartz *et al.* 1966). Die nur unter anaeroben Bedingungen gebildete und hochaffine L-Asparaginase AnsB wird dabei ins Periplasma exportiert (Cedar & Schwartz 1967); Aspartat, das aus der Hydrolyse von L-Asparagin im Periplasma hervorgeht, kann über

DcuB in die Zelle aufgenommen werden und so als Quelle für Fumarat genutzt werden (Srikhanta *et al.* 2013).

Eine andere Nahrungsquelle für Mikroorganismen im Dickdarm stellen die Bestandteile der Mucusschicht dar. Die vom Darmepithel stetig sekretierten Mucusproteine, hauptsächlich Glycoproteine, enthalten sowohl Zucker- als auch Proteinbestandteile, die von Bakterien zersetzt und als Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden können. Insbesondere Vertreter der *Bacteriodes spec.*, die oft die Darmflora dominieren, verfügen über Glykosylasen und Proteasen (Macfarlane & Gibson 1991; Gibson & Macfarlane 1988).

Im Dickdarm werden ständig verwertbare Nährstoffe freigesetzt, es herrscht jedoch eine starke Konkurrenz um diese Substrate. In einer Untersuchung von Jones *et al.* (2011) über die Rolle der anaeroben Nitrat- und Fumaratatmung für die Besiedlung des Mäusedarms durch *E. coli* wurde der Nitratgehalt im Mäusedarm bestimmt. In Mäusen, die mit wildtypischen *E. coli* Stämmen besiedelt wurden, lag die Nitrat-Konzentration unter 3  $\mu\text{M}$ . Bei Kolonisierung mit einer *narG narZ napDA* Mutante wurden jedoch Nitrat-Gehalte von 2,8 mM gefunden. Ähnliche Mechanismen verhindern vermutlich auch eine Akkumulation höherer Konzentrationen von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Darm.

Es ist grundsätzlich davon auszugehen, dass es sich bei dem Ökosystem Darm um ein sehr dynamisches System handelt. Trotz der niedrigen Konzentrationen, die hier im Dickdarm gefunden wurden, scheinen C<sub>4</sub>-Dicarboxylate eine wichtige Rolle für die bakterielle Gemeinschaft des Darms zu spielen. Da C<sub>4</sub>-Dicarboxylate aus der Nahrung zum größten Teil im Dünndarm resorbiert werden, dient vermutlich vor allem L-Aspartat, das bei der Hydrolyse von Proteinen freigesetzt wird, als Quelle für Fumarat im Dickdarm.

Über die C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DcuB und DctA ist *E. coli* in der Lage auch niedrige Konzentrationen von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten zu nutzen. Das DcuSR-System wird aber erst ab einer Konzentration von ca. 100  $\mu\text{M}$  aktiviert. Die im Dickdarm gefundenen Konzentrationen von L-Aspartat und L-Malat könnten *in vivo* zu einer leichten Induktion des DcuSR-Systems führen. Diese Konzentrationen liegen aber an der unteren Grenze von DcuS. Auf Grund dieser niedrigen Konzentrationen ist es für *E. coli* wahrscheinlich wichtig, eine von der Effekorkonzentration unabhängige Grundausrüstung der Enzyme zu besitzen, die für die Aufnahme und Verwertung von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten benötigt werden. Die zweistufige Regulation durch DcuS gewährleistet dies. Bei einem erhöhten Angebot an C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten erlaubt DcuS außerdem eine bedarfsgerechte Modulation dieser Grundausrüstung.

## 6.5 Der Transporter DcuB als molekularer Schalter zwischen Modus II- und Modus I-Regulation

Der Sensor DcuS ist auf den aeroben Transporter DctA oder den anaeroben Transporter DcuB als Koregulator angewiesen (Steinmetz *et al.* 2014; Unden *et al.* 2016a; Wörner *et al.* 2016). Dabei weisen die Transporter keine sensorische Funktion auf. Ist keiner der beiden Transporter vorhanden, ist DcuS aktiv und induziert die Expression der Transporter. Diese versetzen nun DcuS in einen inaktiven aber responsiven Zustand. Befindet sich DcuS im DcuS/Transporter-Komplex erfolgt die Aktivierung ausschließlich durch Effektorbindung in der PAS<sub>P</sub>-Domäne von DcuS. Piepenbreier *et al.* (2017) vergleichen den Sensor DcuS mit einem logischen ODER-Gatter. Bei einem einfachen ODER-Gatter gibt es zwei mögliche Signaleingänge und einen Signalausgang der durch Verarbeitung der Signale im Gatter berechnet wird. Demnach wäre die Aktivierung von DcuS durch zwei Signale möglich. Das erste Signal ist die Präsenz von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten. Dies entspricht der klassischen Funktionsweise eines Sensors, die auch als Modus I bezeichnet wird (Unden *et al.* 2016a): Der Sensor bindet den Effektor, wodurch es zur Signaltransduktion kommt. Das zweite Signal wäre hiernach die Abwesenheit des Transporters: Reicht der Transportergehalt nicht aus, um DcuS in einen DcuS/Transporter-Komplex zu überführen, ist DcuS unabhängig von der Gegenwart von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten aktiv (Davies *et al.* 1999; Kleefeld *et al.* 2009). Die Abwesenheit von DcuS stellt jedoch kein direktes Signal dar. Vielmehr dient DcuB als strukturelle Komponente eines funktionalen DcuS/DcuB-Komplexes. Dieser Mechanismus wird auch als Modus II-Regulation bezeichnet (Unden *et al.* 2016a). Der DcuS/Transporter-Komplex stellt dabei den Normalzustand dar (Abb. 37). Freies DcuS<sub>F</sub> kommt höchstens transient vor. Die Modus II-Regulation sorgt sofort dafür, dass die Expression der Transporter induziert wird, auch wenn keine C<sub>4</sub>-Dicarboxylate vorhanden sind. Damit wird DcuS wieder in den inaktiven DcuS/Transporter-Komplex überführt. Im Gegensatz zur Modus I Regulation unterliegt die Regulation im Modus II einer negativen Rückkopplung. Die konstitutive Aktivität von DcuS wird durch die Komplexbildung mit DcuB (oder DctA) inaktiviert. Dies verdeutlicht, dass die Abwesenheit des Transporters und die Effektorbindung über PAS<sub>P</sub> keine gleichwertigen Signale darstellen. Die Bildung des DcuS/Transporter-Komplexes dient somit als ein funktioneller Schalter zwischen den zwei grundlegenden Funktionsweisen von DcuS. Einerseits die Bereitstellung einer Grundausstattung an C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transportern. Andererseits die bedarfsgerechte Modulation des Transportergehaltes durch eine Regulation der Aktivität von DcuS über die Effektorbindung in PAS<sub>P</sub>. Mit dem basalen Transportergehalt, den die Modus II-Regulation gewährleistet, ist die

Zelle in der Lage niedrige Konzentrationen an C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten zu nutzen. Diese niedrigen Konzentrationen würden DcuS nicht oder nur schwach induzieren, da DcuS einen apparenten K<sub>m</sub> im Bereich von ca. 2 mM aufweist (Kneuper *et al.* 2005). Die Transporter DctA bzw. DcuB dagegen haben einen K<sub>m</sub> von 30 bis 50 μM bzw. 100 bis 200 μM (Kay & Kornberg 1971; Gutowski & Rosenberg 1975; Six *et al.* 1994). Die Transporter sind hier bereits in der Lage C<sub>4</sub>-Dicarboxylate zu transportieren. Somit können auch niedrige C<sub>4</sub>-Dicarboxylatgehalte von der Zelle genutzt werden. Während im Labor häufig C<sub>4</sub>-Dicarboxylatkonzentrationen von 20 mM verwendet werden, um eine maximale Induktion zu erzielen, ist unter physiologischen Bedingungen im Darm mit deutlich niedrigeren Konzentrationen zu rechnen (50 μM bis ca. 5 mM), sodass eine solche Regulation für die Zelle sinnvoll erscheint, um effektiv um die knappen C<sub>4</sub>-Dicarboxylate konkurrieren zu können.

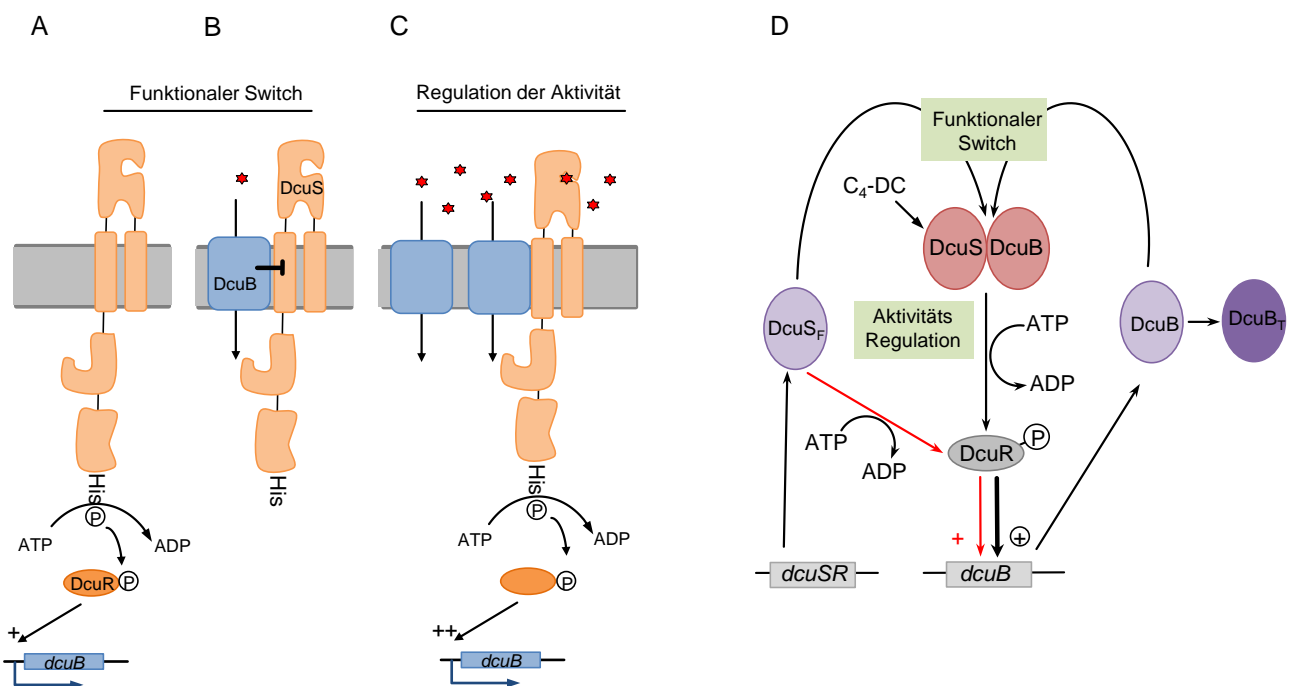


Abb. 37 Modell für die zweistufige Regulation des DcuSR-Systems durch den Transporter DcuB und durch C<sub>4</sub>-Dicarboxylate (roter Stern). A: In Abwesenheit des Transporters DcuB ist der Sensor konstitutiv aktiv (Modus II). Dies führt zu Expression von *dcuB*. B: Der Transporter DcuB interagiert mit dem Sensor DcuS und inaktiviert diesen. Diese negative Rückkopplung verhindert eine unnötige Expression von *dcuB* wenn keine oder nur wenige C<sub>4</sub>-Dicarboxylate vorliegen, gewährleistet aber eine basale Expression von DcuB: Niedrige Mengen an C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten können so von der Zelle genutzt werden, obwohl DcuS diese noch nicht erkennt. C: Liegen höhere Konzentrationen von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten vor (> 100 μM) erkennt DcuS diese über die periplasmatische PAS<sub>P</sub>-Domäne; es kommt zu einer effektorabhängigen Aktivierung von DcuS. D: Die Bildung eines DcuS/DcuB-Sensorkomplexes (Funktionaler Switch, rot) überführt das konstitutiv aktive DcuS<sub>F</sub> (helles violett) in eine responsive Form. Diese kann durch C<sub>4</sub>-Dicarboxylate aktiviert werden. Der Responseregulator DcuR wird so entweder durch DcuS<sub>F</sub> (roter Pfeil) oder durch einen aktivierten DcuS/DcuB-Komplex (schwarzer Pfeil) phosphoryliert und aktiviert die Transkription von *dcuB*. Der Transporter DcuB (helles violett) wird entweder zur Komplexierung von freiem DcuS gebraucht, oder dient als Transporter für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate (DcuB<sub>T</sub>, dunkles violett). In Abwesenheit von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten oder in Gegenwart niedriger C<sub>4</sub>-Dicarboxylatkonzentrationen kommt es über DcuS<sub>F</sub> zu einer Standby-Expression von *dcuB*, die die Bildung DcuS/DcuB Komplexes und basaler DcuB-Level sicherstellt.

Hinzu kommt, dass negativ autoregulierte Systeme eine gewisse Stabilität zu besitzen und somit eine konstante basale Expression des Zielgens gewährleisten (Brandman & Meyer 2008). Die negative Autoregulation erfolgt auf Ebene der Protein-Protein-Interaktion zwischen DcuS und dem Transporter. Eine solche Regulation auf dieser Ebene ist relativ schnell und erlaubt somit unmittelbar auf den zellulären Transportergehalt zu reagieren.

### 6.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Sensor DcuS und der anaerobe Transporter DcuB einen DcuS/DcuB-Sensorkomplex bilden, wobei DcuS durch DcuB in eine responsive Form überführt wird. Der Transporter ist dabei nicht direkt an der Signalerkennung beteiligt. Die Bildung dieses Sensorkomplexes ist unabhängig von der Gegenwart eines Effektors. Es bleibt aber weiterhin unklar, wo die Interaktionsflächen der beiden Proteine liegen und wie genau DcuB den Sensor in seine responsive Form überführt. Die Helix XIb von DcuB und die PAS<sub>C</sub>-Domäne von DcuS gelten als gute Kandidaten. Möglicherweise lassen sich die Interaktionsdomänen besser über ortsspezifische Crosslinking-Experimente identifizieren. Die Kenntnis der Interaktionsflächen, könnte einen tieferen Einblick in den Mechanismus ermöglichen, über den DcuS durch DctA oder DcuB vom permanent aktiven in den C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-responsiven Zustand überführt wird. Auch eine Beteiligung transmembraner und periplasmatischer Bereiche von DcuB (oder DctA) an einer (funktionellen) Interaktion mit DcuS sollte überprüft werden. Es gab erste Hinweise, dass DctA TM2 von DcuS von der periplasmatischen (ON) Position in die cytoplasmatische Position (RES) überführt und damit den responsiven Zustand einstellt. Diese Hinweise müssen aber noch bestätigt werden.

Neben diesen mechanistischen Aspekten sollte außerdem die physiologische Rolle von DcuSR und DcuB in der natürlichen Umwelt untersucht werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Fumaratreduktase eine wichtige Rolle bei der Besiedlung des Mäusedarms spielt (Jones *et al.* 2007; 2011). Hier könnte außerdem die Rolle des Sensors DcuS und des Transporters DcuB bei Besiedlungs- oder Fitnessexperimenten näher untersucht werden.



## 7 Literaturverzeichnis

- 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.
- Adibi, S. A.; Mercer, D. W. (1973): Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J Clin Invest* 52, 1586–1594.
- Asai, K.; Baik, S. H.; Kasahara, Y.; Moriya, S.; Ogasawara, N. (2000): Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146 (Pt 2), 263–271.
- Bachmann, B. J. (1972): Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 36, 525–557.
- Barrett, E. L.; Kwan, H. S. (1985): Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annu Rev Microbiol* 39, 131–149.
- Bauer, J. (2010): The C4-Dicarboxylate Carriers DcuB and DctA of *Escherichia coli*: Function as Cosensors and Topology. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Bauer, J.; Fritsch, M. J.; Palmer, T.; Unden, G. (2011): Topology and accessibility of the transmembrane helices and the sensory site in the bifunctional transporter DcuB of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 50, 5925–5938.
- Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293–300.
- Bilous, P. T.; Weiner, J. H. (1985): Dimethyl sulfoxide reductase activity by anaerobically grown *Escherichia coli* HB101. *J Bacteriol* 162, 1151–1155.
- Blount, Z. D. (2015): The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* 4.
- Bock, V. (2004): Substratspezifität und Signaltransduktion des Sensors DcuS von *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Boudker, O.; Ryan, R. M.; Yernool, D.; Shimamoto, K.; Gouaux, E. (2007): Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* 445, 387–393.
- Brandman, O.; Meyer, T. (2008): Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* 322, 390–395.
- Cadwell, R. C.; Joyce, G. F. (1992): Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome Res* 2, 28–33.
- Cedar, H.; Schwartz, J. H. (1967): Localization of the two-L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 242, 3753–3755.
- Cheung, J.; Hendrickson, W. A. (2008): Crystal structures of C4-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *J Biol Chem* 283, 30256–30265.
- Clark, D. (1989): The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 63, 223–234.
- Conlon, M. A.; Bird, A. R. (2014): The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* 7, 17–44.
- Cummings, J. H.; Pomare, E. W.; Branch, W. J.; Naylor, C. P.; Macfarlane, G. T. (1987): Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221–1227.

- Davies, S. J.; Golby, P.; Omrani, D.; Broad, S. A.; Harrington, V. L.; Guest, J. R.; Kelly, D. J.; Andrews, S. C. (1999): Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 5624–5635.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* 16, 6127–6145.
- El Aidy, S.; Derrien, M.; Merrifield, C. A.; Levenez, F.; Doré, J.; Boekschoten, M. V.; Dekker, J.; Holmes, E.; Zoetendal, E. G.; van Baarlen, P.; Claus, S. P.; Kleerebezem, M. (2013): Gut bacteria-host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *ISME J* 7, 743–755.
- Engel, P.; Krämer, R.; Uden, G. (1992): Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. *J Bacteriol* 174, 5533–5539.
- Engel, P.; Krämer, R.; Uden, 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.
- Escherich, T. (1886): Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. Stuttgart: Ferdinand Enke, zuletzt geprüft am 25.08.2017.
- Etzkorn, M.; Kneuper, H.; Dunnwald, P.; Vijayan, V.; Kramer, J.; Griesinger, C.; Becker, S.; Uden, G.; Baldus, M. (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.
- Fischbach, M. A.; Sonnenburg, J. L. (2011): Eating for two. How metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe* 10, 336–347.
- Gallien, S.; Duriez, E.; Domon, B. (2011): Selected reaction monitoring applied to proteomics. *J Mass Spectrom* 46, 298–312.
- Gencheva, S. (2016): Das ExxN-Motiv und die Phosphataseaktivität der Sensorkinase DcuS von *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. (2003): Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6940–6945.
- Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401–1412.
- Gibson, S. A.; Macfarlane, G. T. (1988): Studies on the proteolytic activity of *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol* 134, 19–27.
- Goh, E.-B.; Bledsoe, P. J.; Chen, L.-L.; Gyaneshwar, P.; Stewart, V.; 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.; 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.
- Golby, P.; Kelly, D. J.; Guest, J. R.; Andrews, S. C. (1998): Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C4-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 6586–6596.

- Graf, S.; Schmieden, D.; Tschauener, K.; Hunke, S.; Uden, G. (2014): The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C4-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 196, 1084–1093.
- Gray, C. H.; Tatum, E. L. (1944): X-Ray Induced Growth Factor Requirements in Bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30, 404–410.
- Griffith, K. L.; Wolf, R. E. (2002): Measuring beta-galactosidase activity in bacteria. Cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 397–402.
- Groeneveld, M.; Weme, R. G. J. D. O.; Duurkens, R. H.; Slotboom, D. J. (2010): Biochemical characterization of the C4-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 192, 2900–2907.
- Guder, J. C.; Schramm, T.; Sander, T.; Link, H. (2017): Time-Optimized Isotope Ratio LC-MS/MS for High-Throughput Quantification of Primary Metabolites. *Anal Chem* 89, 1624–1631.
- Guest, J. R.; Roberts, R. E.; Wilde, R. J. (1984): Cloning of the aspartase gene (aspA) of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 130, 1271–1278.
- Gunsalus, R. P. (1992): Control of electron flow in *Escherichia coli*. Coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J Bacteriol* 174, 7069–7074.
- Gutowski, S. J.; Rosenberg, H. (1975): Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12. *Biochem J* 152, 647–654.
- Guzman, L. M.; Belin, D.; Carson, M. J.; Beckwith, J. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177, 4121–4130.
- Haneburger, I.; Eichinger, A.; Skerra, A.; Jung, K. (2011): New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 286, 10681–10689.
- Hsieh, Y.-J.; Wanner, B. L. (2010): Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol* 13, 198–203.
- Hughes, R.; Magee, E. A.; Bingham, S. (2000): Protein degradation in the large intestine. Relevance to colorectal cancer. *Curr Issues Intest Microbiol* 1, 51–58.
- Jacob, F.; Monod, J. (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3, 318–356.
- Jacob, F.; Perrin, D.; Sanchez, C.; Monod, J. (1960): Operon: A group of genes with the expression coordinated by an operator. *C R Hebd Seances Acad Sci* 250, 1727–1729.
- Janausch, I.; Zientz, E.; Tran, Q.; Kröger, A.; Uden, G. (2002b): C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1553, 39–56.
- Janausch, I. G.; Garcia-Moreno, I.; Lehnen, D.; Zeuner, Y.; Uden, 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.
- Janausch, I. G.; Garcia-Moreno, I.; Uden, G. (2002a): Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 277, 39809–39814.
- Jones, S. A.; Chowdhury, F. Z.; Fabich, A. J.; Anderson, A.; Schreiner, D. M.; House, A. L.; Autieri, S. M.; Leatham, M. P.; Lins, J. J.; Jorgensen, M.; Cohen, P. S.; Conway, T. (2007): Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* 75, 4891–4899.
- Jones, S. A.; Gibson, T.; Maltby, R. C.; Chowdhury, F. Z.; Stewart, V.; Cohen, P. S.; Conway, T. (2011): Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* 79, 4218–4226.

- Jordan, P. A.; Thomson, A. J.; Ralph, E. T.; Guest, J. R.; Green, J. (1997): FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve. *FEBS Lett* 416, 349–352.
- Jourlin, C.; Bengrine, A.; Chippaux, M.; Méjean, V. (1996): An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 20, 1297–1306.
- Kanehisa, M.; Goto, S. (2000): KEGG. Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucl Acids Res* 28, 27–30.
- Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A.; Ladant, D. (1998): A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5752–5756.
- Karinou, E.; Compton, E. L. R.; Morel, M.; Javelle, A. (2013): The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. *Mol Microbiol* 87, 623–640.
- Kay, W. W.; Kornberg, H. L. (1971): The Uptake of C4-Dicarboxylic Acids by *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 18, 274–281.
- Khademian, M.; Imlay, J. A. (2017): *Escherichia coli* cytochrome c peroxidase is a respiratory oxidase that enables the use of hydrogen peroxide as a terminal electron acceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E6922-E6931.
- Kim, O. B.; Lux, S.; Uden, G. (2007): Anaerobic growth of *Escherichia coli* on D-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the L-tartrate carrier TtdT and L-tartrate dehydratase. *Arch Microbiol* 188, 583–589.
- Kim, O. B.; Reimann, J.; Lukas, H.; Schumacher, U.; Grimpo, J.; Dunnwald, P.; Uden, G. (2009): Regulation of tartrate metabolism by TtdR and relation to the DcuS-DcuR-regulated C4-dicarboxylate metabolism of *Escherichia coli*. *Microbiology* 155, 3632–3640.
- Kim, O. B.; Uden, G. (2007): The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189, 1597–1603.
- Kirkpatrick, D. S.; Gerber, S. A.; Gygi, S. P. (2005): The absolute quantification strategy. A general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* 35, 265–273.
- Kleefeld, A. (2006): Der Carrier DcuB als zweiter Sensor des Zweikomponentensystems DcuSR in *Escherichia coli*. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Kleefeld, A.; Ackermann, B.; Bauer, J.; Kramer, 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.
- Koser, S. A. (1924): Correlation of citrate utilization by members of the colon-aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. *J Bacteriol* 9, 59–77.
- 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.
- Kröger, A. (1978): Fumarate as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Biochim Biophys Acta Rev Bioenergetics* 505, 129–145.
- Kröger, A.; Geisler, V.; Lemma, E.; Theis, F.; Lenger, R. (1992): Bacterial fumarate respiration. *Arch Microbiol* 158, 311–314.

- Kuster, B.; Schirle, M.; Mallick, P.; Aebersold, R. (2005): Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 577–583.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Landete, J. M.; Ferrer, S.; Monedero, V.; Zúñiga, M. (2013): Malic enzyme and malolactic enzyme pathways are functionally linked but independently regulated in *Lactobacillus casei* BL23. *Appl Environ Microbiol* 79, 5509–5518.
- Landete, J. M.; García-Haro, L.; Blasco, A.; Manzanares, P.; Berbegal, C.; Monedero, V.; Zúñiga, M. (2010): Requirement of the *Lactobacillus casei* MaeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Appl Environ Microbiol* 76, 84–95.
- Lederberg, J. (2004): *E. coli* K-12. *Microbiology Today* 31, 116.
- Lin, E. C.; Iuchi, S. (1991): Regulation of gene expression in fermentative and respiratory systems in *Escherichia coli* and related bacteria. *Annu Rev Genet* 25, 361–387.
- Louis, P.; Flint, H. J. (2017): Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 19, 29–41.
- Lukas, H.; Reimann, J.; Kim, O. B.; Grimpo, J.; Uden, G. (2010): Regulation of aerobic and anaerobic D-malate metabolism of *Escherichia coli* by the LysR-type regulator DmlR (YeaT). *J Bacteriol* 192, 2503–2511.
- Macfarlane, G. T.; Gibson, G. R. (1991): Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett* 77, 289–294.
- Macfarlane, G. T.; Macfarlane, S. (1997): Human colonic microbiota. Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl* 222, 3–9.
- Macy, J. M.; Ljungdahl, L. G.; Gottschalk, G. (1978): Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 134, 84–91.
- Mallick, P.; Schirle, M.; Chen, S. S.; Flory, M. R.; Lee, H.; Martin, D.; Ranish, J.; Raught, B.; Schmitt, R.; Werner, T.; Kuster, B.; Aebersold, R. (2007): Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 25, 125–131.
- Malpica, R.; Franco, B.; Rodriguez, C.; Kwon, O.; Georgellis, D. (2004): Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13318–13323.
- Méjean, V.; Iobbi-Nivol, C.; Lepelletier, M.; Giordano, G.; Chippaux, M.; Pascal, M.-C. (1994): TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*. Involvement of the tor operon. *Mol Microbiol* 11, 1169–1179.
- Miller, J. H. (1992): Short course in bacterial genetics. A handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. [Place of publication not identified]: Cold Spring Harbor Lab.
- Miranda, R. L.; Conway, T.; Leatham, M. P.; Chang, D. E.; Norris, W. E.; Allen, J. H.; Stevenson, S. J.; Laux, D. C.; Cohen, P. S. (2004): Glycolytic and Gluconeogenic Growth of *Escherichia coli* O157. H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the Mouse Intestine. *Infect Immun* 72, 1666–1676.
- Monzel, C.; Degreif-Dunnwald, P.; Gropper, C.; Griesinger, C.; Uden, G. (2013): The cytoplasmic PASC domain of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction. *Microbiologyopen* 2, 912–927.
- Monzel, C.; Uden, G. (2015): Transmembrane signaling in the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: A long-range piston-type displacement of transmembrane helix 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11042–11047.
- Müller, M. (2007): Funktionskomplementierung des Fumaratsensors DcuS von *Escherichia coli* durch Hybriddimere. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.

- Norris, K. P.; Powell, E. O. (1961): Improvements in determining total counts of bacteria. *J R Microsc Soc* 80, 107–119.
- Oyamada, T.; Yokoyama, K.; Morinaga, M.; Suzuki, M.; Makino, K. (2007): Expression of *Escherichia coli* DcuS-R two-component regulatory system is regulated by the secondary internal promoter which is activated by CRP-cAMP. *J Microbiol* 45, 234–240.
- 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.
- Park, S. J.; Gunsalus, R. P. (1995): Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*. Role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J Bacteriol* 177, 6255–6262.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004): UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605–1612.
- Piepenbreier, H.; Fritz, G.; Gebhard, S. (2017): Transporters as information processors in bacterial signalling pathways. *Mol Microbiol* 104, 1–15.
- Pos, K. M.; Dimroth, P.; Bott, M. (1998): The *Escherichia coli* citrate carrier CitT. A member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *J Bacteriol* 180, 4160–4165.
- Poulsen, L. K.; Lan, F.; Kristensen, C. S.; Hobolth, P.; Molin, S.; Krogh, K. A. (1994): Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun* 62, 5191–5194.
- Rauschmeier, M.; Schüppel, V.; Tetsch, L.; Jung, K. (2014): New insights into the interplay between the lysine transporter LysP and the pH sensor CadC in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 426, 215–229.
- Ravcheev, D. A.; Thiele, I. (2014): Systematic genomic analysis reveals the complementary aerobic and anaerobic respiration capacities of the human gut microbiota. *Front Microbiol* 5, 674.
- Reed, J. L.; Patel, T. R.; Chen, K. H.; Joyce, A. R.; Applebee, M. K.; Herring, C. D.; Bui, O. T.; Knight, E. M.; Fong, S. S.; Palsson, B. O. (2006): Systems approach to refining genome annotation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17480–17484.
- Saier, M. H. (2000): A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 354–411.
- Salmon, K.; Hung, S.-p.; Mekjian, K.; Baldi, P.; Hatfield, G. W.; Gunsalus, R. P. (2003): Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* 278, 29837–29855.
- Salvi, M.; Schomburg, B.; Giller, K.; Graf, S.; Unden, G.; Becker, S.; Lange, A.; Griesinger, C. (2017): Sensory domain contraction in histidine kinase CitA triggers transmembrane signaling in the membrane-bound sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 3115–3120.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sa-Pessoa, J.; Paiva, S.; Ribas, D.; Silva, I. J.; Viegas, S. C.; Arraiano, C. M.; Casal, M. (2013): SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochem J* 454, 585–595.
- Scheu, P. D.; Liao, Y.-F.; Bauer, J.; Kneuper, H.; Basche, T.; Unden, G.; Erker, W. (2010b): Oligomeric sensor kinase DcuS in the membrane of *Escherichia coli* and in proteoliposomes: chemical cross-linking and FRET spectroscopy. *J Bacteriol* 192, 3474–3483.

- Scheu, P. D.; Steinmetz, P. A.; Dempwolff, F.; Graumann, P. L.; Uden, G. (2014): Polar localization of a tripartite complex of the two-component system DcuS/DcuR and the transporter DctA in *Escherichia coli* depends on the sensor kinase DcuS. *PLoS One* 9, e115534.
- Scheu, P. D.; Witan, J.; Rauschmeier, M.; Graf, S.; Liao, Y.-F.; Ebert-Jung, A.; Basche, T.; Erker, W.; Uden, G. (2012): CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system in vivo. *J Bacteriol* 194, 636–645.
- Schmidt, A.; Kochanowski, K.; Vedelaar, S.; Ahrne, E.; Volkmer, B.; Callipo, L.; Knoops, K.; Bauer, M.; Aebersold, R.; Heinemann, M. (2016): The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome. *Nat Biotechnol* 34, 104–110.
- Schmidt, C.; Lenz, C.; Grote, M.; Lührmann, R.; Urlaub, H. (2010): Determination of protein stoichiometry within protein complexes using absolute quantification and multiple reaction monitoring. *Anal Chem* 82, 2784–2796.
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. (2012): NIH Image to ImageJ. 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671–675.
- Schwartz, J. H.; Reeves, J. Y.; Broome, J. D. (1966): Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1516–1519.
- Sevvana, M.; Vijayan, V.; Zweckstetter, M.; Reinelt, S.; Madden, D. R.; Herbst-Irmer, R.; Sheldrick, G. M.; Bott, M.; Griesinger, C.; Becker, S. (2008): A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J Mol Biol* 377, 512–523.
- Shreiner, A. B.; Kao, J. Y.; Young, V. B. (2015): The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 31, 69–75.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539.
- Simon, G.; Méjean, V.; Jourlin, C.; Chippaux, M.; Pascal, M. C. (1994): The torR gene of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the trimethylamine N-oxide reductase genes. *J Bacteriol* 176, 5601–5606.
- 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.
- Srikhanta, Y. N.; Attack, J. M.; Beacham, I. R.; Jennings, M. P. (2013): Distinct physiological roles for the two L-asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 436, 362–365.
- Steinmetz, P. A.; Wörner, S.; Uden, G. (2014): Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C4-dicarboxylate sensor. *Mol Microbiol* 94, 218–229.
- Stephens, R. H.; Talianis-Hughes, J.; Higgs, N. B.; Humphrey, M.; Warhurst, G. (2002): Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters. In vitro studies in *mdr1a(-/-)* mouse intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 1095–1101.
- Stern, J. R.; Hegre, C. S. (1966): Inducible D-Malic Enzyme in *Escherichia coli*. *Nature* 212, 1611–1612.
- Stewart, V. (1993): Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 9, 425–434.
- Stock, A. M.; Robinson, V. L.; Goudreau, P. N. (2000): Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183–215.

- Stopp, M. (2017): Dimerisierung und Signaltransduktion innerhalb der Transmembrandomäne der Sensor-Histidinkinase DcuS aus *Escherichia coli*. Masterarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Surmann, K.; Cudic, E.; Hammer, E.; Hunke, S. (2016): Molecular and proteome analyses highlight the importance of the Cpx envelope stress system for acid stress and cell wall stability in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* 5, 582–596.
- Surmann, K.; Laermann, V.; Zimmann, P.; Altendorf, K.; Hammer, E. (2014): Absolute quantification of the Kdp subunits of *Escherichia coli* by multiple reaction monitoring. *Proteomics* 14, 1630–1638.
- Tatum, E. L.; Lederberg, J. (1947): Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 53, 673–684.
- Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. (2010): The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207–217.
- Tetsch, L.; Jung, K. (2009): The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol Microbiol* 73, 982–991.
- Tetsch, L.; Koller, C.; Haneburger, I.; Jung, K. (2008): The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol Microbiol* 67, 570–583.
- The UniProt Consortium (2017): UniProt. The universal protein knowledgebase. *Nucl Acids Res* 45, D158-D169.
- Tolner, B.; Ubbink-Kok, T.; Poolman, B.; Konings, W. N. (1995): Cation-selectivity of the L-glutamate transporters of *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldolenax*. Dependence on the environment in which the proteins are expressed. *Mol Microbiol* 18, 123–133.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354.
- Uden, G.; Becker, S.; Bongaerts, J.; Holighaus, G.; Schirawski, J.; Six, S. (1995): O<sub>2</sub>-Sensing and O<sub>2</sub>-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 164, 81–90.
- Uden, G.; Bongaerts, J. (1997): Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*. Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320, 217–234.
- Uden, G.; Strecker, A.; Kleefeld, A.; Kim, O. B. (2016b): C<sub>4</sub>-Dicarboxylate Utilization in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus* 7.
- Uden, G.; Wörner, S.; Monzel, C. (2016a): Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling. The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* 68, 139–167.
- Upadhyay, A. A.; Fleetwood, A. D.; Adebali, O.; Finn, R. D.; Zhulin, I. B. (2016): Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *PLoS Comput Biol* 12, e1004862.
- Veenhoff, L. M.; Heuberger, E. H.; Poolman, B. (2002): Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem Sci* 27, 242–249.
- Wadolkowski, E. A.; Laux, D. C.; Cohen, P. S. (1988): Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain. Role of growth in mucus. *Infect Immun* 56, 1030–1035.
- Witan, J. (2012): Funktion der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS in *Escherichia coli*. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.



- Witan, J.; Bauer, J.; Wittig, I.; Steinmetz, P. A.; Erker, W.; Uden, G. (2012a): Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol Microbiol* 85, 846–861.
- Witan, J.; Monzel, C.; Scheu, P. D.; Uden, G. (2012b): The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biol Chem* 393, 1291–1297.
- Wörner, S. (2013): Substratspezifität des Sensors DcuS und der Transporter DcuB und DctA. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für Mikrobiologie und Weinforschung.
- Wörner, S.; Strecker, A.; Monzel, C.; Zeltner, M.; Witan, J.; Ebert-Jung, A.; Uden, G. (2016): Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C4 -dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environ Microbiol* 18, 4920–4930.
- 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.
- Yarosh, O. K.; Charles, T. C.; Finan, T. M. (1989): Analysis of C4 -dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* 3, 813–823.
- Yernool, D.; Boudker, O.; Jin, Y.; Gouaux, E. (2004): Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 431, 811–818.
- Yurgel, S.; Mortimer, M. W.; Rogers, K. N.; Kahn, M. L. (2000): New Substrates for the Dicarboxylate Transport System of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 182, 4216–4221.
- Zientz, E.; Bongaerts, J.; Uden, 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.; Uden, G. (1999): Functioning of DcuC as the C4-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 3716–3720.
- Zientz, E.; Six, S.; Uden, 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.
- Zoetendal, E. G.; Raes, J.; van den Bogert, B.; Arumugam, M.; Booiijink, C. C. G. M.; Troost, F. J.; Bork, P.; Wels, M.; Vos, W. M. de; Kleerebezem, M. (2012): The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* 6, 1415–1426.

## A Anhang

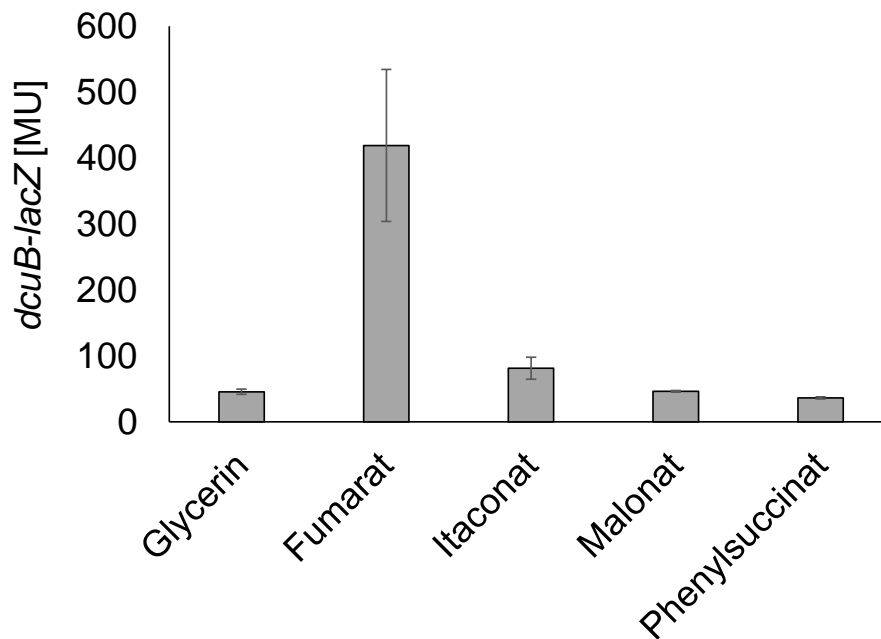


Abb. A 1 Expression von *dcuB-lacZ* in IMW260 mit pMW181 (*pdcuS*) nach anaerober Zucht in eM9 mit Glycerin (50 mM), DMSO (20 mM) sowie den Effektoren Fumarat, Itaconat, Malonat und Phenylsuccinat (je 20 mM). Als Kontrolle wurde die Expression ohne zusätzlich Effektoren (Glycerin) gemessen. Die Daten stammen aus Wörner (2013).

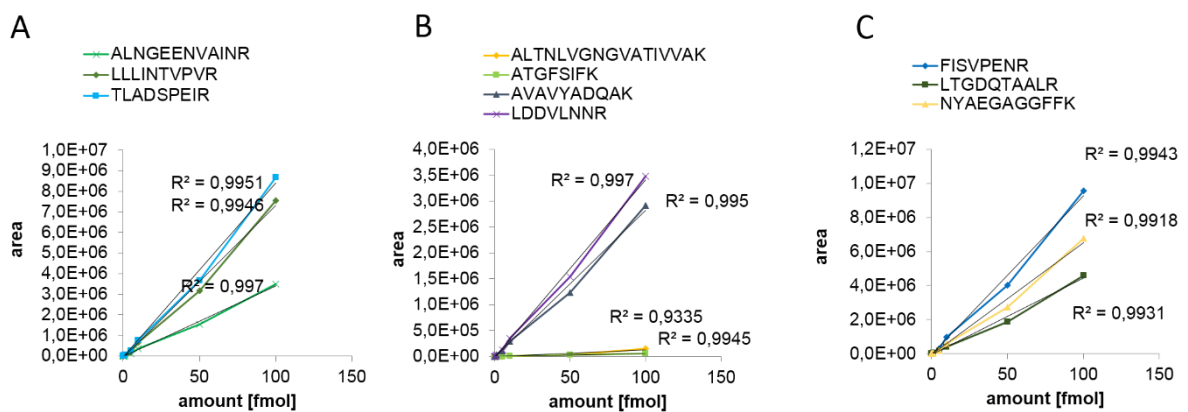


Abb. A 2 Eichgeraden der schweren Standardpeptide für A) DcuS, B) DctA-6His und C) DcuB-PhoA. Die Eichgeraden wurden in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 100 fmol mit Probenhintergrund erstellt. Für jedes Peptid wurden 3 unabhängige Verdünnungsreihen erstellt und vermessen.

Tab. A 1 Korrelation der Zellzahl mit der OD<sub>578</sub> nach Zucht des wildtypischen *E. coli* W3110 unter aeroben oder anaeroben Bedingungen. Anaerob erfolgte die Zucht in eM9 mit 50 mM Glycerin und 20 mM DMSO. Dem Medium wurde entweder kein zusätzlicher Elektronenakzeptor hinzugefügt oder 20 mM Fumarat. Unter aeroben Bedingungen erfolgte die Zucht in eM9 entweder mit 50 mM Glycerin oder mit 50 mM Fumarat. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mikroskopisch in einer Thoma-Zählkammer. VK: Varianzkoeffizient

Stamm und Zuchtbedingung	OD <sub>578nm</sub>	Konzentration [Zellen ml <sup>-1</sup> ]	Concentration [Zellen ml <sup>-1</sup> pro OD]	Protein Konzentration in Membranfraktion [µg ml <sup>-1</sup> pro OD]	Protein Konzentration VK [%]
IMW503 mit pMW1194 (DctA) 10 µM L-Arabinose	0.372	3.40E+08	9.14E+08	17.3	25.7
IMW503 mit pMW1194 (DctA) 1 µM L-Arabinose	0.362	3.34E+08	9.23E+08	19.3	17.9
IMW503 mit pMW1194 (DctA) 0 µM L-Arabinose	0.383	4.31E+08	1.13E+09	17.2	20.6
IMW503 mit pMW1194 (DctA) 100 µM Glucose	0.374	3.50E+08	9.30E+08	20.7	11.8
IMW503 mit pMW2334 (DcuB) 10 µM L-Arabinose	0.325	3.66E+08	1.13E+09	25.5	27.0
IMW503 mit pMW2334 (DcuB) 1 µM L-Arabinose	0.385	4.58E+08	1.19E+09	20.5	4.0
IMW503 mit pMW2334 (DcuB) 0 µM L-Arabinose	0.407	3.83E+08	9.40E+08	21.7	9.0
IMW503 mit pMW2334 (DcuB) 100 µM Glucose	0.4	4.20E+08	1.05E+09	25.7	16.1
<i>E. coli</i> W 3110 anaerob ohne Fumarat	0.726	6.69E+08	9.21E+08	31.1	6.7
<i>E. coli</i> W3110 anaerob mit 20 mM fumarate	0.892	10.90E+08	1.22E+09	32.5	13.4
<i>E. coli</i> W3110 aerob ohne Fumarat (Glycerin)	3.59	42.50E+08	1.18E+09	20.4	19.1
<i>E. coli</i> W3110 aerob mit 50 mM Fumarat	1.86	24.13E+08	1.30E+09	20.6	13.7

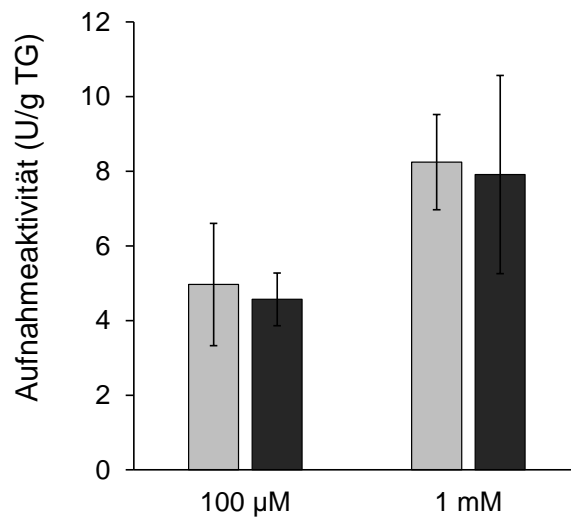


Abb. A 3 Aufnahmeaktivität für Fumarat. Für die Bestimmung der Aufnahmeaktivität wurde *E. coli* W3110, anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) gezüchtet. Die Zucht erfolgte in Abwesenheit von Fumarat (helle Balken) oder in Gegenwart von 20 mM Fumarat (dunkle Balken). Für die Messung der Aufnahmeaktivität wurde die Zellsuspension energetisiert und anschließend für 0,5 min mit 100 µM oder 1 mM [2,3-<sup>14</sup>C]-Fumarat inkubiert. Nicht aufgenommenes Substrat wurde durch Filtration und zwei anschließende Waschschritte abgetrennt. Die Messung bei 1 mM ist eine Doppelbestimmung von nur einem biologischen Replikat.

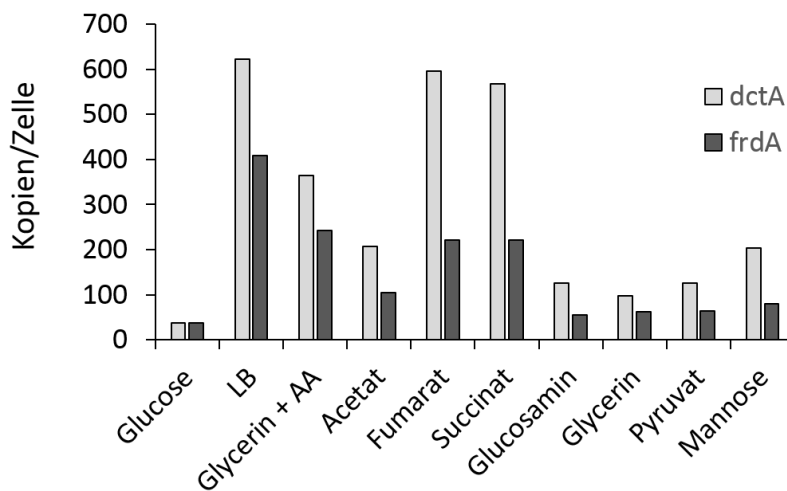


Abb. A 4 Kopienzahl von DctA und FrdA nach Zucht unter Zugabe verschiedener Effektoren. Die Daten stammen aus Schmidt *et al.* (2016).

Tab. A 2 Konzentrationen von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Darminhalt von Mäusen. Die Konzentration ist angegeben in  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  Darminhalt.

	<b>Fumarat</b>	<b>Succinat</b>	<b>Malat</b>	<b>Aspartat</b>
<b>Dünndarm (proximal)</b>	56 ± 18	293 ± 212	188 ± 50	4359 ± 847
<b>Dünndarm (distal)</b>	42 ± 20	496 ± 388	142 ± 42	2451 ± 793
<b>Dickdarm (proximal)</b>	9 ± 0	104 ± 113	15 ± 8	66 ± 15
<b>Dickdarm (distal)</b>	17 ± 6	218 ± 165	24 ± 5	82 ± 22

## B Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AHC	säurehydrolysiertes Casein (acid hydrolysed casein)
Amp <sup>R</sup>	Ampicilin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara	L-Arabinose
Arc	Aerobic Respiration Control
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	Bacterial Two Hybrid System
BR	biologische Replikat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cam <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CAP	Catabolite Activator Protein
Cit	Citrat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CZ	Citratzyklus
DauA	Dicarboxylic Acid Uptake System A
DctA	Dicarboxylate Transporter A
DcuA	Dicarboxylate Uptake Protein A
DcuB	Dicarboxylate Uptake Protein B
DcuC	Dicarboxylate Uptake Protein C
DcuR	Dicarboxylate Uptake Regulator
DcuS	Dicarboxylate Uptake Sensor
D-Mal	D-Malat
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-Tar	D-Tartrat
DTT	Dithiothreitol
dpm	desintegrations per minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eM9	enriched M9-Medium
FNR	Fumarat-Nitrat-Regulator

Frd	Fumarat-Reduktase
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
Fum	Fumarat
FumB	Fumarase B
HRP	Horse Radish Peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
Kb	Kilobase
L-Asp	L-Aspartat
LB	Lysogeny Broth
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
L-Mal	L-Malat
L-Tar	L-Tartrat
Male	Maleinat
mHPINE	Membrane His Protein Interaction Experiment
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m-Tar	meso-Tartrat
MTP	Mikrotiterplatte
Ntrp	3-Nitropropionat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PTP	proteotypische Peptide
RES	Responsiver Zustand
SRM	Single Reaction Monitoring
Suc	Succinat
TG	Zelltrockengewicht
MU	Miller Units
NADH	Nicotinamidadenosindinucleotid
OD	optische Dichte
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bei 578 nm
ONPG	ortho-Nitrophenyldigalaktosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per-ARNT-SIM
PAS <sub>C</sub>	cytoplasmatische PAS-Domäne

PAS <sub>P</sub>	periplasmatische PAS-Domäne
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDC	Natriumdesoxycholat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	Super optimal growth
SOC	Super optimal growth with catabolic repressor
Spc <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
TBS	Tris Buffered Saline
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TM	Transmembranhelix
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid



## C Veröffentlichungen und Präsentationen

### Veröffentlichungen

Wörner, Sebastian, Surman, Kristin, Ebert-Jung, Andrea, Völker, Uwe, Hammer, Elke, Uden, Gottfried (2017) Cellular concentrations of the transporters DctA, DcuB, and the sensor DcuS of *Escherichia coli* and the contributions of free and complexed DcuS to transcriptional regulation by DcuR. Manuskript eingereicht

Wörner, Sebastian, Strecker, Alexander, Monzel, Christian, Witan, Julian, Ebert-Jung, Andrea, Uden, Gottfried (2016) Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C<sub>4</sub>-dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environmental microbiology* 18, 4920–4930.

Uden, Gottfried, Wörner, Sebastian, Monzel, Christian (2016) Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling. The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of *Escherichia coli*. *Advances in microbial physiology* 68, 139-167.

Steinmetz, Philipp Aloysius, Wörner, Sebastian, and Uden, Gottfried (2014) Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*. Function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C<sub>4</sub>-dicarboxylate sensor. *Molecular Microbiology*, 94, 218-229

### Vorträge

Wörner, Sebastian, Monzel, Christian, Zeltner, Matthias, Uden, Gottfried (2016) Regulation of the C<sub>4</sub>-Dicarboxylate Sensor Kinase DcuS by the Transporters DcuB and DctA. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena

### Poster

Wörner, Sebastian, Monzel, Christian, Zeltner, Matthias, Uden, Gottfried (2016) Signal Perception and Signal Transduction in the DcuB/DcuS Sensor Complex of *E. coli*. Young Microbiologists Symposium on Microbe Signalling, Organisation and Pathogenesis, Dundee, UK

Wörner, Sebastian, Steinmetz, Philipp Aloysius, Zeltner, Mathias, Uden, Gottfried (2014). Sensing of C<sub>4</sub>-Dicarboxylates in the DcuB/DcuS and the DctA/DcuS Sensor complexes. 30th Symposium „Mechanisms of Gene Regulation“, Düsseldorf

## D Lebenslauf

## E Danksagung

## F Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst angefertigt wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, Oktober 2017