

**Der Carrier DcuB als zweiter Sensor
des Zweikomponentensystems DcuSR
in *Escherichia coli***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Alexandra Kleefeld
geb. am 17.08.1977 in Wiesbaden

Mainz, August 2006

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2006

Inhalt

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methode	8
3.1 Verwendete Stämme von <i>E. coli</i>	8
3.2 Medien und Zucht.....	12
3.3 Molekulargenetische Methoden.....	16
3.4 Two-Hybrid Systeme zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.....	28
3.5 Biochemische Methoden.....	33
4. Ergebnisse	37
4.1 Einfluss von DcuB auf die DcuSR-abhängige Genexpression.....	37
4.2 Ungerichtete Mutagenese von <i>dcuB</i> mit Hydroxylamin Hydrochlorid.....	50
4.3 Gerichtete Mutagenese konservierter Aminosäuren in DcuB.....	60
4.5 Komplementation des <i>dcuB</i> Defekts mit <i>dcuB</i> aus <i>Wolinella succinogenes</i>	65
4.6 Suche nach kompensatorischen <i>dcuS</i> Mutanten.....	67
4.7. Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuSR.....	74
4.8 Überexpression von DcuB als Fusionsprotein mit N-terminalem 6xHis-tag.....	80
5. Diskussion	84
DcuB als zweiter „Fumarat-Sensor“ in der DcuSR-abhängigen Regulation.....	84
Mögliche Wechselwirkungen zwischen DcuB und DcuS.....	87
Suche nach dem Interaktionspartner von DcuB.....	88
Vergleiche zwischen den Dcu-Carriern.....	90
DctA als „Sensor“ im aeroben Stoffwechsel.....	95
Carrier als Sensoren.....	97
Signalerkennung durch das Cit-System.....	100
Ausblick.....	102
6. Literatur	104
7. Veröffentlichungen	112

1. Zusammenfassung

Escherichia coli kann C₄-Dicarboxylate und andere Carbonsäuren als Substrate für den aeroben und anaeroben Stoffwechsel nutzen. Die Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten im Außenmedium wird über das Zweikomponentensystem DcuSR, bestehend aus der membranständigen Sensor kinase DcuS und dem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR, erkannt. Die Bindung von C₄-Dicarboxylaten an die periplasmatische Domäne von DcuS führt zu einer Induktion der Zielgene. Hierzu zählen die Gene für den anaeroben Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB (*dcuB*), die anaerobe Fumarase (*fumB*) und die Fumaratreduktase (*frdABCD*). Unter aeroben Bedingungen stimuliert DcuSR die Expression des *dctA* Gens, das für den aeroben C₄-Dicarboxylat-Carrier DctA kodiert.

Für den Carrier DcuB konnte eine regulatorische Funktion bei der Expression der DcuSR-regulierten Gene gezeigt werden. Die Inaktivierung des *dcuB* Gens führte bereits ohne Fumarat zu einer maximalen Expression einer *dcuB'*-*lacZ* Reporter genfusion und anderer DcuSR-abhängiger Gene. Diese Stimulierung erfolgte nur in einem *dcuS*-positiven Hintergrund. DcuB unterscheidet sich damit von den alternativen Carriern DcuA und DcuC, die diesen Effekt nicht zeigten. Mithilfe ungerichteter Mutagenese wurden DcuB-Punktmutanten hergestellt (Thr394Ile und Asp398Asn), die eine Geninduktion verursachten, aber eine intakte Transportfunktion besaßen. Dies zeigt, dass der regulatorische Effekt von DcuB unabhängig von dessen Transportfunktion ist. Durch gerichtete Mutagenese wurde die Funktion einer Punktmutation (Thr394) näher charakterisiert. Es werden zwei Modelle zur Membrantopologie von DcuB und der Lage der Punktmutationen im Protein vorgestellt. Da DcuB seine regulatorische Funktion über eine Interaktion mit DcuS vermitteln könnte, wurden mögliche Wechselwirkungen zwischen DcuB und DcuS als auch DcuR mithilfe von Two-Hybrid-Systemen untersucht. Für biochemische Untersuchungen von DcuB wurde außerdem die Expression des Proteins *in vivo* und *in vitro* versucht.

Unter aeroben Bedingungen beeinflusst der C₄-Dicarboxylat-Carrier DctA die Expression der DcuSR-abhängigen Gene. Eine Mutation des *dctA* Gens bewirkte eine stärkere Expression einer *dctA'*-*lacZ* Reporter genfusion im Vergleich zum Wildtyp. Diese Expression nahm in einem *dcuS*-negativen Hintergrund ab, die Succinat-abhängige Induktion blieb jedoch erhalten. Unter anaeroben Bedingungen kann das *dctA* Gen auch durch Inaktivierung von DcuB induziert werden. Es wird ein Modell vorgestellt, das die Beteiligung beider Carrier an der DcuSR-abhängigen Regulation erklärt.

2. Einleitung

Regulation des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels durch das Zweikomponentensystem

DcuSR

Escherichia coli kann als fakultativ anaerobes Enterobakterium sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen C₄-Dicarboxylate wie Fumarat, Succinat, Aspartat und Malat als Kohlenstoff- und Energiequellen nutzen (Unden & Kleefeld, 2004). In der aeroben Atmung werden C₄-Dicarboxylate durch die Enzyme des Citratzyklus vollständig zu CO₂ oxidiert. Bei Wachstum auf C₄-Dicarboxylaten wird speziell der C₄-Dicarboxylat-Carrier DctA (dicarboxylate transport; *dctA* Gen) zur Aufnahme von Succinat benötigt.

Im anaeroben Stoffwechsel kann Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden. Fumarat wird durch die Fumaratreduktase (*frdABCD* Operon) zu Succinat reduziert. Succinat kann nicht weiter umgesetzt werden und wird als Stoffwechselendprodukt ausgeschieden. Die Expression der Gene der Fumaratatmung wird durch Fumarat stimuliert; hierzu zählen die Strukturgene *frdABCD* der Fumaratreduktase, *fumB* der anaerob gebildeten Fumarase und *dcuB* (dcu = dicarboxylate uptake) des anaeroben Fumarat/Succinat-Antiporters.

Die Induktion von *frd* und *dcuB* durch Fumarat erfolgt durch das Zweikomponentensystem DcuSR (Zientz *et al.*, 1998). Es setzt sich aus einer membranständigen Sensorkinase (DcuS) und einem cytoplasmatischen Responseregulator (DcuR) zusammen (Abb. 1). Der Sensor besteht aus einer N-terminalen Inputdomäne, die aus zwei Transmembranhelices und einer dazwischen liegenden periplasmatischen Sensordomäne aufgebaut ist, sowie einer C-terminalen Domäne. Diese enthält eine Transmitterdomäne, die einen konservierten Histidinrest trägt und der Signalweiterleitung dient, sowie eine PAS-Domäne, deren Funktion noch nicht bekannt ist. PAS-Domänen sind Bestandteile von einigen pro- und eukaryotischen Sensorproteinen und sind an der Wahrnehmung von Sauerstoff, Licht, des Redoxpotentials und einigen anderen Stimuli beteiligt (Taylor *et al.*, 1999). Extrazelluläres Fumarat wird durch die periplasmatische Sensordomäne erkannt. Die Bindung von Fumarat erzeugt ein Signal, das auf unbekannte Weise über die Membran weitergeleitet wird. Dies führt zu einer Autophosphorylierung der Sensorkinase an dem konservierten Histidinrest der Transmitterdomäne. Dieser Phosphatrest wird dann auf einen konservierten Aspartatrest des Responseregulators DcuR übertragen. Dieser besteht aus einer Empfänger- oder Receiverdomäne, in der sich der konservierte Aspartatrest befindet, und einer DNA-Bindedomäne, die ein Helix-turn-Helix Bindemotiv enthält. Nach Phosphorylierung bindet

der Responseregulator an seine Zielpromotoren und induziert die Expression der Gene des anaeroben C₄-Dicarboxylatstoffwechsels, beispielsweise *dcuB*.

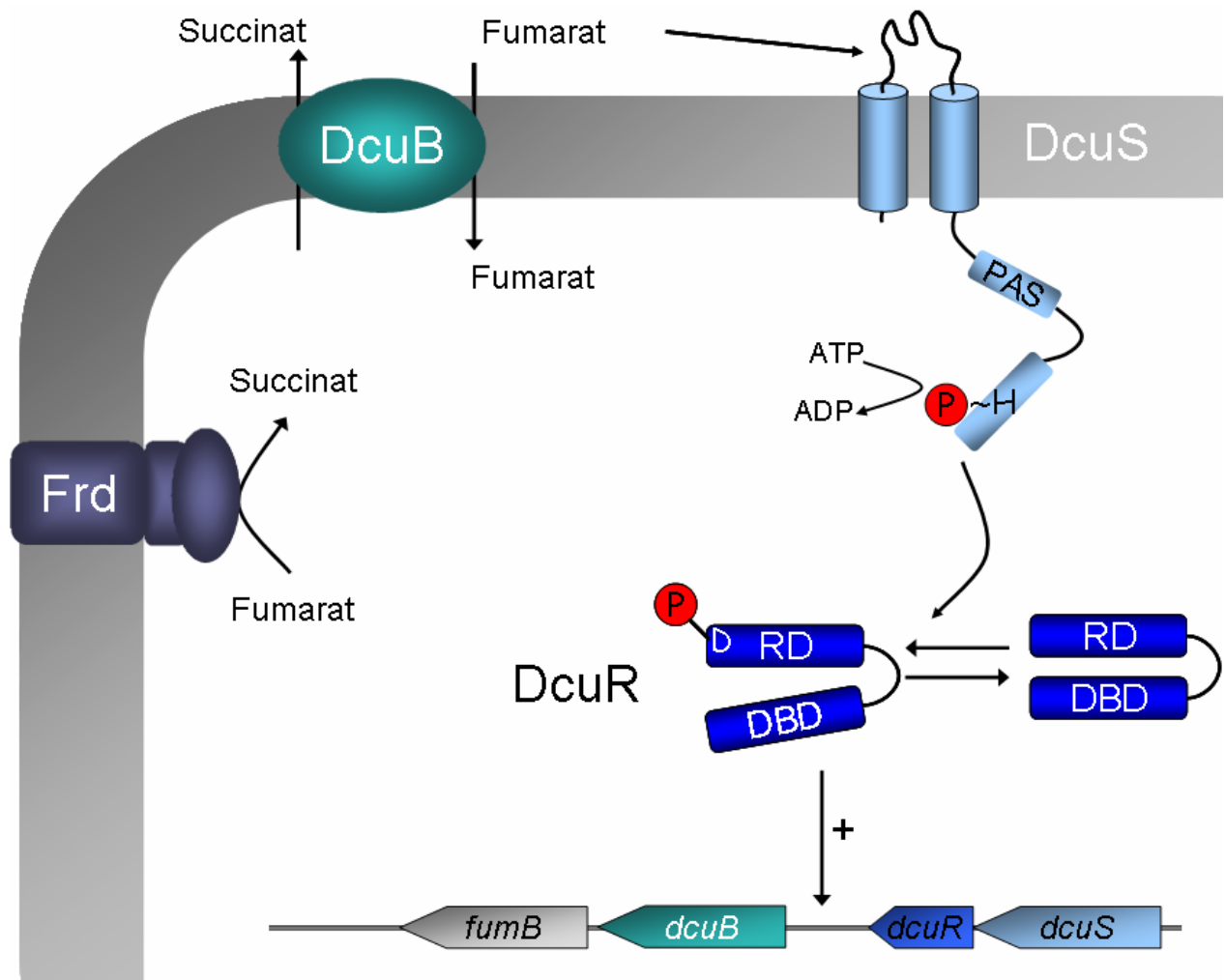


Abb. 1: Funktionsmodell des Zweikomponentensystems DcuSR. Die Anwesenheit von Fumarat führt zu einer Autophosphorylierung der Sensorkinase DcuS an einem konservierten Histidinrest (H). Durch die Übertragung des Phosphatrests (P) auf einen Aspartatrest (D) des Responseregulators DcuR erfährt dieser eine Konformationsänderung, die seine Affinität zur DNA erhöht. DcuR-P kann nun an seine Zielpromotoren binden und die Expression der regulierten Gene, wie z. B. *dcuB*, das Gen für den anaeroben Fumarat/Succinat-Antiporter oder das *frd*-Operon, das für die Fumaratreduktase kodiert, induzieren. (RD = Receiverdomäne, DBD = DNA-Bindedomäne)

Signalerkennung durch DcuS

DcuS gehört zur CitA-Familie von Histidinkinasen, die eine Reihe von Citrat- und C₄-Dicarboxylatspezifischen Sensoren von Zweikomponentensystemen umfasst. CitA ist ein Citratspezifischer Sensor aus *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli* und kontrolliert die Expression von Genen der Citratfermentation (Bott *et al.*, 1995). Die isolierte periplasmatische Domäne von CitA aus *Klebsiella pneumoniae* bindet Citrat mit einem

apparenten K_D -Wert von $5,5 \mu\text{M}$ (Gerharz *et al.*, 2003; Kaspar *et al.*, 1999). Im Unterschied zu CitA besitzt DcuS eine breite Substratspezifität. DcuS erkennt neben verschiedenen C_4 -Dicarboxylaten wie Fumarat, Succinat, Malat und Aspartat auch das Tricarboxylat Citrat. Die Bindung dieser Effektoren ist im Gegensatz zu CitA um den Faktor 1000 weniger affin (apparente K_D -Werte $3 - 13 \text{ mM}$). Butyrat und andere Monocarboxylate werden hingegen nicht durch DcuS erkannt. Maleinat, das ebenfalls die Expression DcuSR-regulierter Gene stimuliert, kann nicht in die Zelle aufgenommen und daher nicht verstoffwechselt werden (Zientz *et al.*, 1998). Maleinat und andere Effektoren müssen daher auf der Außenseite der Membran über die periplasmatische Domäne von DcuS erkannt werden.

Die Substratbindestelle von DcuS liegt innerhalb der periplasmatischen Domäne. Die Struktur der periplasmatischen Domäne wurde mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Pappalardo *et al.*, 2003, Abb. 2A). Hier befinden sich ein Histidin-, ein Phenylalaninrest sowie zwei Argininreste, die eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung spielen (Janausch *et al.*, 2004). Mutagenese dieser Reste führt zum Verlust der Stimulierung der Expression von *dcuB* durch Fumarat. Vermutlich interagieren die positiv geladenen Aminosäurereste mit Fumarat und den anderen Effektoren und lösen so die Transduktion des Signals über die Membran aus, die zur Autophosphorylierung des Responseregulators und so zur Aktivierung der Genexpression führt. Für homologe Reste der periplasmatischen Domäne von CitA konnte die direkte Wechselwirkung mit dem Effektor nachgewiesen werden (Gerharz *et al.*, 2003, Abb. 2B).

Auch *in vitro* wurde die Autophosphorylierung von DcuS in Anwesenheit von Fumarat stimuliert (Janausch *et al.*, 2002). Diese Stimulierung ist jedoch deutlich schwächer als die Fumarat-induzierte Stimulierung der Genexpression von *dcuB in vivo*.

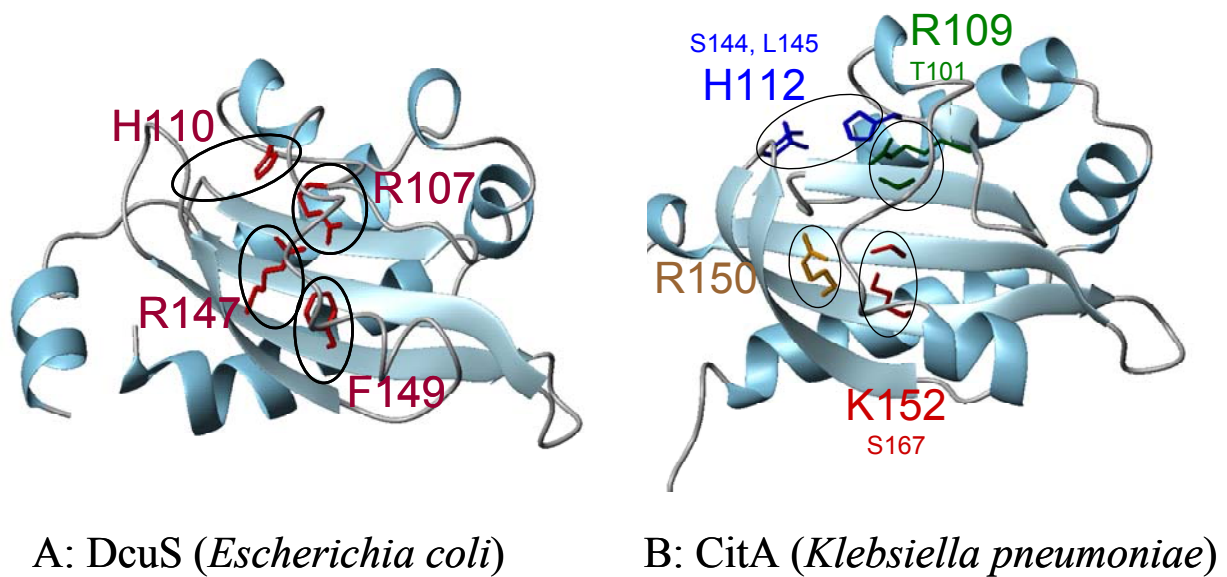


Abb. 2: Struktur der periplasmatischen Domänen von DcuS aus *E. coli* (A) und von CitA aus *K. pneumoniae* (B). Die Reste, die jeweils an der Effektorbindung beteiligt sind, sind farbig markiert.

C₄-Dicarboxylattransporter in *E. coli*

E. coli enthält eine Reihe von Carriern für den Transport von C₄-Dicarboxylaten unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen. Unter aeroben Bedingungen wird die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten durch den Carrier DctA katalysiert. Er wird unter aeroben Bedingungen gebildet und sorgt für die Aufnahme von Succinat im Symport mit 2-3 Protonen (Gutowski *et al.*, 1975, Abb. 3). DctA kann auch den Transport von anderen Substraten wie Fumarat, Malat und Aspartat katalysieren. Die K_m-Werte für die Aufnahme dieser Substrate liegen dabei zwischen 10 und 30 µM.

Unter anaeroben Bedingungen erfolgt der Transport von C₄-Dicarboxylaten durch die sekundären Carriern DcuA, DcuB und DcuC (Engel *et al.*, 1992, 1994; Golby *et al.*, 1998; Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996, Abb. 3). Alle drei Dcu-Carrier können grundsätzlich sowohl die Aufnahme, den Gegentausch und den Efflux von C₄-Dicarboxylaten katalysieren. Allerdings wird nicht jeder Transportmodus von den Carriern gleich gut katalysiert. Bei DcuA handelt es sich vermutlich um einen konstitutiv exprimierten Transporter, der vornehmlich die elektrogene Aufnahme von Fumarat im Symport mit drei Protonen katalysiert (Abb. 3). DcuB ist unter anaeroben Bedingungen der wichtigste Antiporter, der in der Fumaratatmung Fumarat im elektroneutralen Gegentausch mit Succinat in die Zelle transportiert. Beide Carrier gehören zur DcuA/DcuB-Familie von Transportern, die nur in anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien, die Fumaratatmung betreiben, vorkommt (Janausch *et al.*, 2002). DcuB besitzt eine 2,3-fach höhere Transportaktivität als DcuA, der K_m-Wert für

Fumarat/Succinat-Gegentausch und Aufnahme liegt bei 100 μM . DcuB besitzt damit eine höhere Affinität zu C_4 -Dicarboxylaten als der Sensor DcuS.

DcuC bildet eine eigene Familie innerhalb der Dcu-Carrier. Es handelt sich hierbei vermutlich um einen Effluxcarrier, der unter fermentativen Bedingungen exprimiert wird und Succinat im Symport mit drei Protonen aus der Zelle exportiert (Zientz *et al.*, 1996). Aufnahme und Gegentausch werden von DcuC nur mit geringerer Aktivität katalysiert.

Der vermutliche Tartrat/Succinat-Antiporter TtdT (oder YgjE) und der Citrat/Succinat-Antiporter CitT gehören zur Familie der Carboxylat- C_4 -Dicarboxylat Antiporter Familie. TtdT, dessen Gen stromabwärts der Gene für die anaerobe Tartratdehydrogenase (*ttdAB*) liegt, katalysiert den Gegentausch von Tartrat gegen Succinat in der anaeroben L-Tartratfermentation (Kim, 2006). CitT wird für die Citratfermentation benötigt und katalysiert hier die Aufnahme von Citrat und den Succinatefflux (Pos *et al.*, 1998). Keiner der beiden Carrier kann in seiner Funktion durch die Dcu Carrier ersetzt werden.

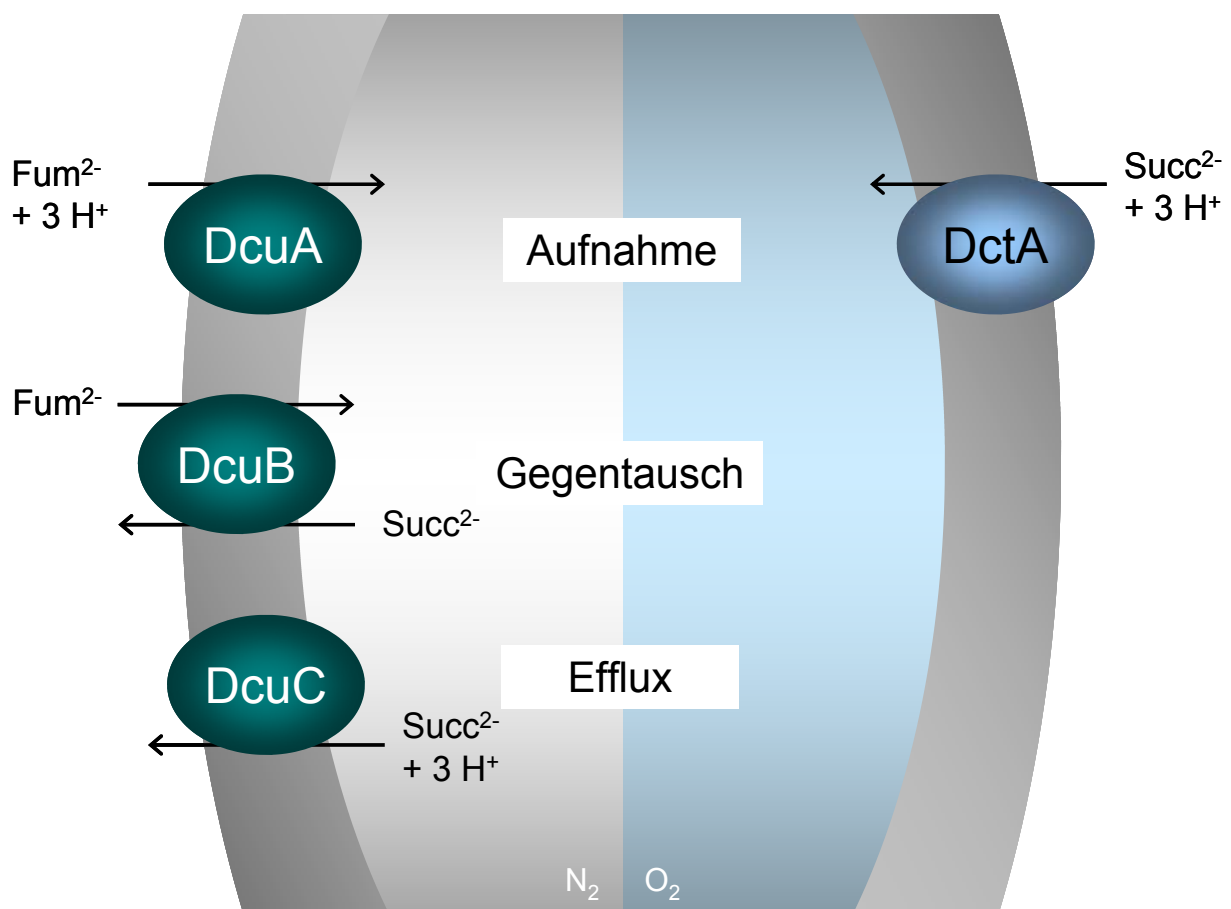


Abb. 3: Bekannte Transportsysteme für C_4 -Dicarboxylate in *E. coli*. Unter aeroben Bedingungen wird die Aufnahme von Succinat und anderen C_4 -Dicarboxylaten von DctA katalysiert. Unter anaeroben Bedingungen erfolgt der Transport von C_4 -Dicarboxylaten über die Dcu-Carrier. Sie katalysieren Aufnahme, Gegentausch und Efflux von C_4 -Dicarboxylaten.

Die wichtigsten Zielgene der DcuSR-abhängigen Regulation sind Gene für C₄-Dicarboxylatcarrier. Sowohl der Sensor DcuS als auch die beiden Transporter sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert und erkennen Substrate außerhalb der Zelle. Es stellte sich die Frage, ob die Carrier eine Funktion in der Erkennung von Substraten durch DcuS spielen. Es gab bereits Hinweise, dass beide Carrier in irgendeiner Form die Expression DcuSR-regulierter Gene beeinflussen (Kleefeld, 2002). Da es auch in anderen Bakterien sensorische Carrier gibt, sollte die Regulation in Carriermutanten genauer untersucht werden. Hierzu wurden die Auswirkungen einer genetischen Inaktivierung des DcuB- bzw. des DctA-Carriers unter anaeroben bzw. aeroben Bedingungen auf die Funktion der DcuSR-abhängigen Regulation getestet. Die Funktion des DcuSR-Systems konnte *in vivo* in verschiedenen Carriermutanten anhand von *dcuB'*- und *dctA'*-*lacZ* Reporterfusionen bestimmt werden. Speziell die Funktion von DcuB sollte mit genetischen und biochemischen Untersuchungen charakterisiert werden. Auf diese Weise wurde getestet, ob DcuB neben seiner Funktion als Transporter eine regulatorische Rolle bei der Expression DcuSR-abhängiger Gene ausübt. Mittels ungerichteter Mutagenese sollten Mutanten mit einer intakten Transportfunktion, aber veränderten regulatorischen Eigenschaften hergestellt werden. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob Transport und Regulation zwei unabhängige Eigenschaften des Carriers sind oder ob der Ausfall der Regulationsfunktion immer mit einem Verlust der Transportfunktion verbunden ist. Mögliche Wechselwirkungen des Carriers mit dem DcuSR-System wurden mithilfe zweier bakterieller Two-Hybrid-Systeme untersucht. Da im aeroben Stoffwechsel nur der DctA-Carrier eine Rolle spielt (Janausch *et al.*, 2001; 2002) und die Dcu Carrier nicht exprimiert werden oder inaktiv sind, wurde auf die gleiche Weise getestet, ob in einer *dctA*-Mutante die DcuSR-abhängige Regulation im aeroben Stoffwechsel (*dctA*-Gen) gestört ist und ob eine Inaktivierung von *dcuB* unter diesen Bedingungen einen Einfluss hat.

3. Material und Methode

3.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

Tab. 1: Verwendete Stämme von *E. coli*, Plasmide und Phagen

Stämme	Genotyp	Referenzquelle
AN387	Wildtyp	Wallace & Young, 1977
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F' <i>hsdS gal1</i> DE3, mit IPTG-induzierbarer chromosomaler T7-RNA-Polymerase, Proteinüberproduktionsstamm	Studier und Moffat <i>et al.</i> , 1986
C43(DE3)	Spontanmutante von BL21(DE3)	Miroux und Walker, 1996
BTH101	Reporterstamm Cya Two-Hybrid-System, Rec ⁺ , schnell wachsend F- <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Strr), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i> (Anleitung unter „Labor aktuell“)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
DHM1	Reporterstamm Cya Two-Hybrid-System, <i>recA</i> , langsam wachsend F-, <i>cya-854, recA1, endA1, gyrA96 (Nal^r), thi1, hsdR17, spoT1, rfbD1, glnV44(AS)</i>	Karimova <i>et al.</i> , 1998
MC4100	F- <i>araD139 Δ(argF-lac)U169, rpsL150 relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
JM105	<i>thi strA endA sbcB15 hsdR4 Δ(lac-proAB)F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15</i>	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> 1985,
XL-1 Blue MRF ^c	<i>Δ(mcrA)183 ΔmcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^c laqI^q bla lacZ Kan^r]</i>	BacterioMatch Two-Hybrid System, Stratagene
JC7623	F ⁻ <i>recB21 recC22 sbcB15-</i>	Winans <i>et al.</i> , 1985
JRG2813	AN387 <i>dcuB::Kan^R</i>	Six <i>et al.</i> , 1994
JRG2814	AN387 <i>dcuB::Kan^R dcuA::Spc^R</i>	Six <i>et al.</i> , 1994
JRG2821	AN387 <i>dcuA::Spc^R</i>	Six <i>et al.</i> , 1994
IMW153	AN387, <i>dcuA::Spc^RdcuB::Kan^RdcuC::miniTn10</i>	Zientz, 2000
IMW157	AN387 <i>dcuC::Tn10,Cam^R</i>	Zientz, 2000
IMW369	P1 (JRG2821) x IMW237 <i>dcuA::Spc^R</i> , <i>λ (Φ(dcuB'-lacZ))</i>	Kleefeld, 2002
IMW370	P1 (JRG2813) x IMW237 <i>dcuB::Kan^R</i> , <i>λ (Φ(dcuB'-lacZ))</i>	Kleefeld, 2002
IMW371	P1 (IMW157) x IMW237 <i>dcuC::Cam^R</i> , <i>λ (Φ(dcuB'-lacZ))</i>	Kleefeld, 2002

Stämme	Genotyp	Referenzquelle
IMW372	P1 (JRG2814) x IMW237 <i>dcuA::Spc^R dcuB::Kan^R</i> , λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>))	Kleefeld, 2002
IMW373	P1 (IMW157) x IMW369 <i>dcuA::Spc^R dcuC::Cam^R</i> , λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>))	Kleefeld, 2002
IMW374	P1 (IMW157) x IMW370 <i>dcuB::Kan^R dcuC::Cam^R</i> , λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>))	Kleefeld, 2002
IMW385	MC 4100, λ (Φ (<i>dctA'</i> - ' <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i>	Kleefeld, 2002
IMW386	P1 (MDO800) x IMW385, <i>dctA::Spc^R</i> λ (Φ (<i>dctA'</i> - ' <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i>	Kleefeld, 2002
IMW387	P1 (MDO800) x ECL547, <i>dctA::Spc^R</i> λ <i>sdhC'</i> - <i>lacZ</i>	Kleefeld, 2002
IMW388	P1 (JRG2813) x IMW260, <i>dcuB::Kan^R dcuS::Cam^R</i> , λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i>	Kleefeld, 2002
IMW389	P1 (IMW260) x IMW385, <i>dcuS::Cam^R</i> , λ (Φ (<i>dctA'</i> - ' <i>lacZ</i>))hyb, <i>bla</i>	Kleefeld, 2002
IMW390	P1 (IMW260) x ECL547, <i>dcuS::Cam^R</i> , λ <i>sdhC'</i> - <i>lacZ</i>	Kleefeld, 2002
IMW398	P1 (MDO800) X IMW237, <i>dctA::Spc^R</i> λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>))	Kleefeld, 2002
IMW497	MC4100, aber <i>dcuB::Cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW502	MC4100 aber Δ <i>dcuB</i>	Diese Arbeit
IMW503	MC4100 aber Δ <i>dcuB</i> , λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>))	Diese Arbeit
IMW504	P1 (JRG2821) x IMW503 MC4100 aber λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>)) <i>dcuA::Spc^R ΔdcuB</i>	Diese Arbeit
IMW505	P1 (IMW157) x IMW504 MC4100 aber λ (Φ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>)) <i>dcuA::Spc^R ΔdcuB dcuC::Cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW534	JC7623 aber <i>dcuS::Spc^R</i>	Diese Arbeit
IMW535	P1(IMW534) x IMW237, MC4100 λ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>) <i>dcuS::Spc^R</i>	Diese Arbeit
IMW536	P1(IMW497) x IMW535, MC4100 λ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>) <i>dcuS::Spc^R dcuB::Cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW537	P1(IMW497) x MC4100 λ J100, MC4100 λ (<i>dcuB'</i> - ' <i>lacZ</i>) <i>dcuB::Cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW538	P1(MDO800) x IMW389 <i>dctA::Spc^R dcuS::Cam^R</i> λ (<i>dctA'</i> - ' <i>lacZ</i>)	Diese Arbeit
IMW539	P1 (JRG2813) X IMW385 <i>dcuB::Kan^R λ(<i>dctA'</i> - '<i>lacZ</i>)</i>	Diese Arbeit
Plasmide		
pET28a	Überexpressionsplasmid für Proteine mit N- oder C-terminalem His-tag, <i>Kan^R</i>	Novagen
pGS606	pUC118 mit 2,0-kb-Spc ^R Kasette	Six <i>et al.</i> , 1994
pJL28	' <i>lacZ</i> , <i>amp^R</i> Proteininfusionsvektor	Lucht, 1992

Plasmide	Genotyp	Referenzquelle
pME6010	low-copy Plasmid, <i>Tet^R</i>	Heeb <i>et al.</i> , 1999
pKT25	Derivat des low copy-number Plasmids pSU40, <i>Kan^R</i> . Enthält das T25 Fragment der <i>B. pertussis</i> Adenylate Cyclase, ersten 224 AS von CyaA. MCS am 3' Ende von T25.	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKNT25	Derivat des low copy-number Plasmids pSU40, <i>Kan^R</i> . Enthält das T25 Fragment, die MCS liegt <u>davor</u> .	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18	pUC19 Derivat (High copy), <i>Amp^R</i> . Enthält das T18 Fragment (AS 225-399 von CyaA). MCS liegt <u>vor</u> T18.	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUTC18	pUC19 Derivat (High copy), <i>Amp^R</i> . Enthält das T18 Fragment (AS 225-399 von CyaA). MCS liegt <u>hinter</u> T18.	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKT25-zip	Derivat von pKT25, enthält eine Fusion der Leucinzipperdomäne von GCN4 mit dem T25 Fragment.	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUTC18-zip	Derivat von pUT18C enthält eine Fusion der Leucinzipperdomäne von GCN4 mit dem T18 Fragment. Dient zusammen mit pKT25-zip als Positivkontrolle für das BACTH-System	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pBT	BacterioMatch Two-Hybrid System, Bait Vektor, <i>Cam^R</i>	Stratagene
pTRG	BacterioMatch Two-Hybrid System, Target Vektor, <i>Tet^R</i>	Stratagene
pBT-LGF2	BacterioMatch Two-Hybrid System, Bait-Kontrollplasmid, <i>Cam^R</i>	Stratagene
pTRG-GAL11 ^P	BacterioMatch Two-Hybrid System, Targetkontrollplasmid, <i>Tet^R</i>	Stratagene
pW2E6	pBR322 mit <i>Wolinella succinogenes dcuB</i> ab Codon 2	Ullmann <i>et al.</i> , 2000
pMW108	<i>dcuS::Cam^R</i> in pKSII, <i>Amp^R</i>	Zientz, 2000
pMW151	<i>dcuS</i> in pET28a, zur Überexpression mit N-terminalem His-tag, <i>Kan^R</i>	Zientz, 1999
pMW181	<i>dcuS</i> mit eigenem Promotor in pET28a, nicht zur Überexpression, <i>Kan^R</i>	Janausch, 2000
pMW228	pME6010 mit <i>dcuB</i> + Promotorbereich, <i>EcoRI-XhoI</i> , 10,1kb, <i>Tet^R</i>	Kleefeld, 2002
pMW269	<i>dcuB</i> komplett, <i>EcoRI-BamHI</i> in pBT, 30°C	Diese Arbeit
pMW270	C-term. Bereich von <i>dcuB</i> , <i>EcoRI-BamHI</i> in pBT, 30°C	Diese Arbeit
pMW271	Loop zw. TM5 und TM6 von <i>dcuB</i> , <i>EcoRI-BamHI</i> in pBT, 30°C	Diese Arbeit
pMW272	<i>dcuS</i> komplett, <i>BamHI-EcoRI</i> in pTRG, 30°C	Diese Arbeit

Plasmide	Genotyp	Referenzquelle
pMW273	C-term. Bereich von <i>dcuS</i> , <i>BamHI-EcoRI</i> in pTRG, 30°C	Diese Arbeit
pMW280	<i>dcuB BamHI-XhoI</i> in pET28a, Überexpressionsplasmid für DcuB, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW281	<i>dcuB</i> mit eigenem Promotor, <i>EcoRI-XhoI</i> aus pMW228 in pET28a, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW312	pMW281, aber <i>dcuB</i> R196A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW313	pMW281, aber <i>dcuB</i> K198A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW314	pMW281, aber <i>dcuB</i> K202A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW315	pMW281, aber <i>dcuB</i> K289A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW316	pMW228, aber <i>dcuB</i> R196A, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW317	pMW228, aber <i>dcuB</i> K198A, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW320	pMW281, aber <i>dcuB</i> H108A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW321	pMW281, aber <i>dcuB</i> R127A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW339	pMW281, aber <i>dcuB</i> R130A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW340	pMW281, aber <i>dcuB</i> R414A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW341	pMW281, aber <i>dcuB</i> R419A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW342	pMW281, aber <i>dcuB</i> Y389Stopp, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW347	pMW228 aber <i>dcuB</i> Y389Stopp, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW348	pMW281, aber <i>dcuB</i> H108A R130A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW349	pMW281, aber <i>dcuB</i> T409Stopp, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW350	pMW281, aber <i>dcuB</i> H108A R127A R130A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW358	pMW228, aber <i>dcuB</i> T409Stopp, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW359	pMW228, aber <i>dcuB</i> H108A R127A R130A, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW366	pMW228 aber <i>dcuB</i> H108A, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW367	pMW228 aber <i>dcuB</i> H108A R130A, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW396	pMW281, aber <i>dcuB</i> T394I nach gerichteter Mutagenese; <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW397	pMW228, aber <i>dcuB</i> T394I nach gerichteter Mutagenese; <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW402	pMW228, aber <i>dcuB</i> T394N, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW403	pMW228, aber <i>dcuB</i> T394S <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW404	pMW228, aber <i>dcuB</i> T394A <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW405	pMW228, aber <i>dcuB</i> D398N, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW411	Wie pMW108, aber <i>Cam^R</i> mit <i>BamHI</i> ausgeschnitten und mit <i>Spec^R</i> aus pGS606 ersetzt, <i>dcuS::Spc^R</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW424	pMW228, aber mit <i>dcuB</i> aus <i>Wolinella succinogenes</i> , aus pW2E6 amplifiziert und mit <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> hinter den <i>E. coli</i> Promotor kloniert, <i>Tet^R</i>	Diese Arbeit
pMW425	pKT25 mit <i>dcuB</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW426	pKT25 mit <i>dcuS</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW427	pKT25 mit <i>dcuR</i> , <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW428	pUT18 mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW429	pUT18C mit <i>dcuS</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW430	pUT18 mit <i>dcuR</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW431	pUT18C mit <i>dcuR</i> , <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit

Plasmide	Genotyp	Referenzquelle
pMW436	<i>dcuB</i> aus <i>Wolinella succinogenes</i> mit <i>E. coli</i> -Promotor in pET28a, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW437	Receiver-Domäne von DcuR in pTRG, <i>Tet^R</i> ,	Diese Arbeit
pMW439	pMW181, aber <i>dcuS</i> K203Q, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
pMW440	pMW181, aber <i>dcuS</i> K203A, <i>Kan^R</i>	Diese Arbeit
<u>Phagen</u>		
P1kc		Miller 1992
λRZ5	λ' <i>bla</i> , ' <i>lacZ</i> , ' <i>lacY</i> ⁺	Ostrow <i>et al.</i> , 1986
λMW34	λ(φ(<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>)hyb, <i>amp^R</i>)	Zientz, 2000

3.2 Medien und Zucht

Für alle genetischen Arbeiten sowie für Vorkulturen (5 ml) wurden die Bakterien in LB-Medium gezüchtet, dem nach Bedarf Antibiotika zugesetzt wurden. Bei Zugabe von zwei Antibiotika wurde die Konzentration halbiert.

Zur Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität erfolgte die Zucht in angereichertem M9-Medium (eM9) mit den jeweils angegebenen Zusätzen. Die Vorkulturen für die aeroben Zuchten wurden in LB-Medium plus Antibiotika angezogen, für die anaeroben Zuchten in eM9-Medium plus Antibiotika mit den entsprechenden Zusätzen. Die Kulturen wurden mit 1% Inokulum (aerob) bzw. 5% (anaerob) Inokulum beimpft. Bei aerobem Ansatz wurden 20 ml Kultur in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 180 Upm bei 37° C geschüttelt (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Für die anaeroben Zuchten wurden 5 ml Kultur in gasdichten Sovirell-Röhrchen 3 x 10 min evakuiert und anschließend mit 1,2 atm Stickstoff (5.0, Linde) begast und bei 37° C inkubiert. Die Zucht erfolgte in der Regel bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7.

Für die Aufnahme von anaeroben Wachstumskurven wurden zunächst anaerobe Vorkulturen in M9-Medium mit entsprechenden Zusätzen vorgezogen. Für die anaerobe Hauptkultur wurde 50 ml M9-Medium mit Zusätzen mit 5 % Inokulum beimpft und in gasdichten Müller-Krempel-Flaschen 3 x 15 min evakuiert und mit 1,2 atm Stickstoff begast. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, das anaerobe Wachstum wurde bis zum Erreichen der stationären Phase verfolgt.

Medien

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989):
10 g/l Pepton (Gibco, Nr.140)
5 g/l Hefeextrakt (Serva)
5 g/l NaCl

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

LB Agar: LB-Medium mit 15 g/l Agar

M9-Medium (Miller, 1992):

Stammlösung (10x):
6 g/l Na₂HPO₄
3 g/l KH₂PO₄
0,5 g/l NaCl
1 g/l NH₄Cl

Zusätze:
10 ml/l CaCl₂, 10 mM
1 ml/l MgSO₄, 1 M
10 ml/l säurehydrolysiertes Casein, 10 %
5 ml/l L-Tryptophan, 1 %

Die Stammlösung und die Zusätze wurden getrennt autoklaviert. Der pH-Wert der Stammlösung wurde auf 7,0 eingestellt

C-Quellen und Elektronenakzeptoren (Endkonzentration unter den getesteten Bedingungen):

10 mM Glycerin (aerob)
50 mM Glycerin (anaerob)
20 mM Na-Fumarat (anaerob)
10 mM Na-Succinat (aerob)
20 mM Nitrat (anaerob)
20 mM D-Tartrat (anaerob)
20 mM Citrat (anaerob)
5 mM Nitropropionat (anaerob)
20 mM DMSO (anaerob)

Antibiotikazusätze:

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung:</u>	<u>Endkonzentration:</u>
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycinsulfat	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in EtOH	20 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in EtOH/ H ₂ O (1:1)	15 µg/ml
Carbenicillin	50 mg/ml in H ₂ O	250-300 µg/ml

Falls nicht anders angegeben wurden bei Zugabe von mehreren Antibiotika die Konzentrationen halbiert.

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 MgCl₂ x 6 H₂O
 2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O
 3,96 g/l Glucose x 1 H₂O

Medien für die Inaktivierung

SOB-Medium:

20 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 2 g/l NaCl
 2,5 ml/l KCl (1 M)

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 5 ml/l MgCl₂ (2 M) zugesetzt.

SOC-Medium zur Geninaktivierung:

20 g/l Bacto-Trypton
 5,5 g/l Hefeextrakt
 10 ml/l NaCl (1 M)
 10 ml/l KCl (1 M)

Das deionisierte Wasser muss einen neutralen pH-Wert haben ($\text{pH } 7 \pm 0,1$). Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 10 ml/l Mg^{2+} (2 M Mg^{2+} , wobei 1 M MgSO_4 und 1 M MgCl_2) und 10 ml/l Glucose (2 M) zugesetzt.

P1_{kc} - Phagenvermehrung

R-Agar (Miller, 1992):	10 g/l Bacto Trypton (Difco) 1 g/l Hefeextrakt (Gibco) 8 g/l NaCl 1 g/l Glucose 12 g/l Agar (Difco)
R-top-Agar:	wie R-Agar, aber 6,5 g/l Agar (Difco) 10 ml/l MgSO_4 , 1 M 10 ml/l CaCl_2 , 0,5 M nach dem Autoklavieren zugesetzt

λ -Phagenvermehrung

TB-Medium (Miller, 1992):	10 g/l Pepton (Gibco, Nr. 140) 5 g/l NaCl
TB-Agar:	TB-Medium mit 10 g/l Agar
TB-top-Agar:	TB-Medium mit 6,5 g/l Agar
YM-Medium:	TB-Medium 20 ml/l Maltose, 10% 10 ml/l Hefeextrakt, 1%

LB-Amp-Citrat-X-Gal-Agarplatten:	LB-Medium
	25 µg/ml Ampicillin
	20 mM Na ₃ -Citrat
	20 µg/ml X-Gal
	15 g/l Agar

3.3 Molekulargenetische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und die Transformation erfolgte nach Farinha *et al.* (1990). Die analytische Plasmidisolierung wurde mit dem Plasmid-Mini-Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Für die Isolierung von höheren Plasmidkonzentrationen wurde entweder das Plasmid Midi-Prep-Kit oder das Maxi-Prep-Kit von Qiagen verwendet. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gel-Extraction-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Reinigung von PCR-Ansätzen erfolgte mit dem PCR-Purification-Kit von Qiagen. Ligationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt und erfolgten über Nacht bei 16°C. Dabei betrug das molare Verhältnis von Vektor zu Insert ungefähr 1:3.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im iCycler (biorad), im MyCycler (biorad) oder im Progene Thermocycler (Techne) durchgeführt. Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Zielgen
DcuAfor18	CTG CAG TTG AAC GTT ATG	51,2	<i>dcuA</i>
DcuArev18	GAA GTG CTG CAA AGT AGC	53,7	<i>dcuA</i>
dcuB-testA-18	GGT GCC TGG TAG ATA AAG	53,7	<i>dcuB</i>
dcuB-TestB-18	GCC GCT GCT TTA ATC AGC	53,7	<i>dcuB</i>
7/842-861	CTG GTG CAG GCG CAT TAT CC	61,4	<i>dcuC</i>
1/4395-4414	CCG CGC ATC GAT TAA AGA TG	57,3	<i>dcuC</i>
CAT_mitte	CTC TGG AGT GAA TAC CAC GAC G	54,5	Cam ^R
dctA-for	AAG GAC ACC CTA TGA AAA CCT C	59,1	<i>dctA</i>
dctA-rev2	GGC ATA AGT GAT GAG ATT AAG AGG	59,3	<i>dctA</i>
DcuS-N	CAC ACA AGG AAG CAT ATG AGA CAT TC	61,6	<i>dcuS</i>
DcuS-C	ATT AAA AGC TTG ATC ATC TGT TCG AC	58,5	<i>dcuS</i>

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Zielgen
dcuB-EcoRI	TAC CGG AAT TCA AAA TAC CCC TG	58,9	<i>dcuB</i>
dcuB-XhoI	GCA CTC GAG GTG CAT TTA TAA G	58,4	<i>dcuB</i>
pBT-dcuB1a	GGA TTA TCG CGA GAA TTC ACA CAT G	61,3	<i>dcuB</i>
pBT-dcuB1b	CGG GAT CCA AAG TGC ATT TAT AAG	62,4	<i>dcuB</i>
pBT-dcuB1c	ATC CGG AAT TCA TCG TGG CTT CAG	62,7	<i>dcuB</i>
pBT-dcuB2a	GCG AAT TCA GTG TCG GTT GCG	61,8	<i>dcuB</i>
pBT-dcuB2b	ATG GAT CCG AGG AAA ATC CAC ATT G	61,3	<i>dcuB</i>
pTRG-dcuS3a	TGT CAC GGA TCC AAG CTG ATG AG	62,4	<i>dcuS</i>
pTRG-dcuS3b	GTC ATC GGA ATT CAA TAC ATT GAT CAT	60,7	<i>dcuS</i>
pTRG-dcuS3c	TTG GAT CCT CCA TTC TGG TTA AGG	61,0	<i>dcuS</i>
pTRG-dcuR4a	TTT GTC GAA TTC CCC TGG GAC G	62,1	<i>dcuR</i>
pTRG-dcuR4b	TTA TTA CCT CGA GAT AAC CAG CG	58,9	<i>dcuR</i>
pTRG-dcuR4c	CGG AAT TCT CTT TTG CCG CCA G	62,1	<i>dcuR</i>
dcuB-BamHI2	ATC GCG AGG GAT CCC ACA TG	61,4	<i>dcuB</i>
dcuB-XhoI2	GGC ACC TCG AGT GCA TTT ATA AG	60,6	<i>dcuB</i>
dcuB-H1-P1	TGT GAT CTA TTC AGC AAA AAT TTA AAT AGG ATT ATC GCG AGG GTT CAC ACG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	>75	<i>cat</i>
dcuB-H1-P1	TTA TTC GAA AAT GGC GTG CCG CGT AGT CAC GGG CGG CAC GCA AAG TGC ATC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G	>75	<i>cat</i>
dcuB-for	ATG ACA TCT GCC CTG AGA AC	57,3	<i>dcuB</i>
dcuB-rev	TCG TTT TCG CTG GCT TCT GG	59,4	<i>dcuB</i>
cat_mitte	CTCTGGAGTGAATACCACGAC	54,5	<i>cat</i>
cat-frd	GAGATTATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCC	65,4	<i>cat</i>
cat-rev	CTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTC	68,1	<i>cat</i>
C1	TTA TAC GCA AGG CGA GG	54,5	Cam ^R
C2	GAT CTT CCG TCA CAG GTA GG	61,4	Cam ^R
K(N)T25-dcuB- PstI-for	CGA GGC TGC AGA CAT GTT ATT TAC	61,0	<i>dcuB</i>
KT25-dcuB- EcoRI-rev	CGG CAC GGA ATT CGC ATT TAT AAG	61,0	<i>dcuB</i>
KT25-dcuS- BamHI-for	CAC AAG GGA TCC GAT GAG AC	59,4	<i>dcuS</i>
KT25-dcuS- EcoRI-rev	CAT CGA TAA TGA ATT CAT TGA TCA TC	56,9	<i>dcuS</i>
KNT25-dcuS- HindIII-for	CAC ACA AGC TTG CTG ATG AG	57,3	<i>dcuS</i>
KNT25-dcuS- PstI-rev	GAT CAT CTG CTG CAG CTC TC	59,4	<i>dcuS</i>
UT18(C)-dcuS- PstI-for	CAA GGA AGC TCT GCA GAC ATT C	60,3	<i>dcuS</i>
UT18(C)-dcuS- EcoRI-rev	CAT TGA TCA TGA ATT CGA CCT CTC C	61,3	<i>dcuS</i>
KT25-dcuR- XbaI-for	GGG AGA TCT AGA ACA GAT GAT C	58,4	<i>dcuR</i>

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Zielgen
KT25-dcuR- EcoRI-rev	GAT AAC CAG <u>GAA TTC</u> GTT ATT GGC	59,3	<i>dcuR</i>
KNT25-dcuR- HindIII-for	GAG GTC GAA <u>AGC TTG</u> ATC AAT G	58,4	<i>dcuR</i>
KNT25-dcuR- XbaI-rev	GCG ATC CGT <u>TCT AGA</u> CAA TAT TG	58,9	<i>dcuR</i>
UT18(C)-dcuR- PstI-for	AGG TCG <u>ACT GCA</u> GGA TCA ATG	59,8	<i>dcuR</i>
UT18(C)-dcuR- BamHI	CCG TTA TTG <u>GGG ATC</u> CTG TTT C	60,3	<i>dcuR</i>
dcuB-NdeI- W.succ.	GGG GAA <u>ACA TAT</u> GGA GTT CTT TC	58,9	<i>dcuB_{W.succ.}</i>
dcuB-XhoI- W.succ.	GGT GAT <u>ACT CGA</u> GAT TTA TAC G	56,5	<i>dcuB_{W.succ.}</i>

Schnittstellen unterstrichen, Homologiebereich der Deletionsprimer zu *dcuB* in grün

Zur Amplifizierung wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Eine Überprüfung von inaktivierten Genen wurde mit der *Taq*-Polymerase (Invitrogen) durchgeführt. Für die Klonierung von Genen wurde die Proof-reading Polymerase *Pfu* Ultra (Stratagene) eingesetzt. Für alle PCR-Schritte der Geninaktivierung nach Datsenko & Wanner (2000) wurde der ReadyMixTMRed von Sigma verwendet. Zur Amplifikation der PCR-Produkte wurden folgende Zyklen durchgeführt:

Tab. 3: Amplifikationsprofile der zur PCR verwendete DNA-Polymerasen

	<i>Taq</i> (Invitrogen)	ReadyMix TM Red Taq TM (Sigma)	<i>Pfu</i> Ultra (Stratagene)
Amplifikationsprofil			
Initiale Denaturierung	94° C, 3 min	95° C, 2 min	95° C, 2 min
Denaturierung	94° C, 45 s	94° C, 1 min	95° C, 30 s
Hybridisierung (30 x)	Primer T _m -2° C, 30 s	52° C, 45 s	Primer T _m -5° C, 30 s
Elongation	72° C, 0,5 min/kb	72° C, 1 min/kb	72° C, 1 min/kb
Finale Elongation	72° C, 10 min	72° C, 4 min	72° C, 10 min

Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und Schmelzpunkt der verwendeten Primer wurde das jeweilige Programm modifiziert. Für je 1000 zu amplifizierende Nukleotide wurde für die *Taq* Polymerase 30 sec Elongationszeit angesetzt, für die *Pfu* Ultra Polymerase und den ReadyMix™ Red Taq 60 sec. Der Schmelzpunkt T_m der Primer wurde nach folgender Formel berechnet: $69,3^\circ \text{ C} + 0,41 \times \text{GC} \% - 650/n$; n = Anzahl der Nukleotide. Die Hybridisierung wurde 2° C unter dem niedrigeren T_m -Wert der beiden Primer durchgeführt.

Das Reaktionsvolumen für Ansätze mit der *Taq* Polymerase und der *Pfu* Ultra Polymerase beträgt 50 μl . Bei dem ReadyMix betrug das Reaktionsvolumen für die Genaktivierung 100 μl , für die Überprüfung 25 μl . Die Konzentrationen der PCR-Komponenten sind in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4: Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für 50 μl PCR-Ansätze mit verschiedenen Polymerasen

Komponente	<i>Taq</i> (Invitrogen)	ReadyMix™ Red Taq™ (Sigma)	<i>Pfu</i> Ultra (Stratgene)
PCR-Puffer	1 x	1x	1 x
10 mM dNTP-Mix	200 μM jedes	Im Mix enthalten	250 μM jedes
MgCl ₂	1,5 mM	Im Mix enthalten	Im Puffer enthalten
Primer	0,5 μM jeder	0,4 μM jeder	0,5 μM jeder
Template	10 pg-100 ng	1-200 ng	50-100 ng
Polymerase	2,5 U	Im Mix enthalten	2,5 U
H ₂ O	Ad 50 μl	Ad 50 μl	Ad 50 μl

Konstruktion einer *dcuB* Knock-out-Mutante (nach Datsenko & Wanner, 2000)

Zur Inaktivierung von *dcuB* wurde die Methode nach Datsenko & Wanner (2000) angewandt. Mit dieser Methode kann mithilfe von PCR-Produkten ein Gen im Genom gegen eine Antibiotikaresistenzkassette ersetzt werden, die in einem folgenden Schritt wieder deletiert werden kann. Dies erlaubt die Konstruktion von Deletionsmutanten, ohne dass neue Resistenzen in einen Stamm eingeführt werden müssen.

Für die Geninaktivierung wurde pKD3 als Template zur Amplifikation einer Chloramphenicol-Resistenzkassette verwendet. Dieses Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz sowie eine von FRT-Sequenzen (= FLP-Rekombinase-Erkennungssequenz) umgebene Chloramphenicol-Resistenzkassette. In der Primerbindestelle P2 liegen eine Ribosomenbindestelle sowie ein Startcodon, das die Genexpression der nachfolgenden Gene ermöglicht.

Für den Austausch von *dcuB* gegen eine Chloramphenicol-Resistenzkassette wurden 70 Nukleotide lange Deletionsprimer konstruiert. Diese enthielten einerseits zur Amplifikation der Resistenzkassette die Primerbindestellen P1 und P2, die jeweils 20 Nukleotide umfassen und flankierend zu den FRT-Sequenzen von pKD3 liegen. Die Primer enthielten andererseits neben einer solchen P-Bindestelle noch einen 50 Nukleotide langen Homologiebereich (H1 bzw. H2), der entweder genau 50 Nukleotiden vor dem Genanfang von *dcuB* (H1) oder dem Genende von *dcuB* entsprach (H2), der die homologe Rekombination des PCR-Produkts mit dem *dcuB* Gen ermöglicht. Mithilfe der so konstruierten Primer *dcuB*-H1-P1 und *dcuB*-H2-P2 konnte die Chloramphenicol-Resistenzkassette amplifiziert werden und über homologe Rekombination in umgekehrter Orientierung zum *dcuB* Gen inseriert werden.

Für die Amplifikation wurden 2 x 100 µl PCR-Ansätze angesetzt und das entstandene Produkt nach Agarosegelelektrophorese mit dem MiniElute-Gelextraktion Kit (Qiagen) aufgereinigt. Pro Ansatz wurden zwei Säulen zur Aufreinigung verwendet und die DNA mit jeweils 12,5 µl H₂O eluiert. Die Eluate wurden anschließend vereinigt und die Template-DNA mit *DpnI* verdaut. Der *DpnI*-Verdau wurde mit dem MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und die DNA in einer Konzentration von 180 - 300 ng/µl eluiert.

Die DNA wurde anschließend in frisch angesetzte elektrokompente Zellen des Zielstamms MC4100 transformiert, der bereits das Helferplasmid pKD46 enthielt. Das low-copy Plasmid besitzt eine Ampicillin-Resistenz und kann die λ -Red-Rekombinasegene γ , β , exo unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors exprimieren. Das λ -Red-Rekombinasesystem ermöglicht die Rekombination des PCR-Produkts mit den homologen Bereichen auf dem Genom. Alle Zuchten des Stammes mit Helferplasmid wurden bei 30° C durchgeführt, da es sich bei pKD46 um ein temperatursensitives Plasmid handelt, das nur bei 30° C repliziert wird.

Zur Herstellung der frischen elektrokompenten Zellen wurden 10 ml SOB-Vorkultur mit Ampicillin in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30° C über Nacht gezüchtet. Als Hauptkultur wurden 30 ml SOB-Medium mit 10 mM Arabinose und 100 µg/ml Ampicillin

mit 0,5 % Inokulum beimpft. Die Kultur wurde bis zu einer $OD_{620nm} \sim 0,55$ gezüchtet. Anschließend wurde die Kultur in einem vorgekühlten Zentrifugenröhrchen für 10 min im Eisbad inkubiert. Die Kultur wurde dann bei $5000 \times g$ für 20 min bei $2^\circ C$ im Rotor 16F6-38 (Eppendorf) zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit sterilem H_2O ($4^\circ C$) gewaschen. Danach wurden die Zellen in $320 \mu l$ 10 % Glycerin ($4^\circ C$) resuspendiert und in Aliquots à $40 \mu l$ aufgeteilt. Die Zellen wurden bis zur Verwendung auf Eis gehalten. In die elektrokompenten Zellen wurden maximal $8 \mu l$ des vorbehandelten PCR-Produkts transformiert. Die Elektroporation erfolgte in 1 mm Küvetten bei 1,8 kV (Easyjec Prima, Peqlab). Nach Zugabe von 1 ml SOC wurden die Ansätze für 1 h bei $37^\circ C$ im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend per Zentrifugation pelletiert und der Überstand bis auf $400 \mu l$ abgenommen. Die Zellen wurden resuspendiert und die Hälfte jedes Ansatzes auf einer Chloramphenicol-LB-Platte ($25 \mu g/ml$) ausplattiert. Die andere Hälfte wurde über Nacht bei RT inkubiert und erst am folgenden Tag auf einer Chloramphenicol-Platte ausplattiert. Mutanten, in denen das Zielgen *dcuB* durch die Chloramphenicol-Resistenzkassette über homologe Rekombination ersetzt war, bildeten nach über 24 h Inkubation große, unregelmäßig geformte Kolonien. Der Austausch des Gens wurde durch PCR überprüft und der Stamm zur Entfernung des Helferplasmids pKD46 bei $37^\circ C$ inkubiert. Die Entfernung des Helferplasmids pKD46 nach dem Temperaturshift wurde durch Test auf Ampicillin-Sensitivität überprüft.

Zur Eliminierung der Resistenzkassette wurde die *dcuB* Insertionsmutante (IMW497) mit dem Helferplasmid pCP20 transformiert. Das Plasmid kodiert für eine FLP-Rekombinase, deren Erkennungssequenzen (= FRT-Sequenzen) flankierend zu der Chloramphenicol-Resistenzkassette liegen. Die FLP-Rekombinase ist in der Lage mit diesen direkten Wiederholungssequenzen das Resistenzgen zu deletieren. Die Bakterien wurden auf Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei $30^\circ C$ inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR überprüft. Das Helferplasmid pCP20 wurde durch Zucht bei $43^\circ C$ entfernt. Die *dcuB* Deletionsmutante IMW502 wurde anschließend nochmals auf Chloramphenicol- und Ampicillin-Sensitivität getestet.

Herstellung einer Spectinomycin-resistenten *dcuS*-Mutante

Zur Konstruktion einer Spectinomycin-resistenten *dcuS*-Mutante wurde das Plasmid pMW108 verwendet, auf dem das *dcuS* Gen durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette inaktiviert wurde (Zientz, 2000, Abb. 4). Durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette entfernt und durch eine entsprechend

verdaute Spectinomycin-Resistenzkassette aus pGS606 ersetzt. Das erhaltene Plasmid pMW411 wurde mit *EcoRI* und *NotI* verdaut und so der von der Spectinomycin-Resistenzkassette unterbrochene Genbereich von *dcuS* ausgeschnitten. Das gereinigte *dcuS*-Fragment hatte eine Konzentration von 270 ng/ μ l. Anschließend erfolgte die Transformation in elektrokompente Zellen des Stamms JC7623 entsprechend der Geninaktivierungsmethode nach Datsenko & Wanner. Der Stamm JC7623 kann kein Plasmid vermehren, so dass die entsprechende Resistenz nur erhalten bleibt, wenn die Plasmid DNA über homologe Rekombination zwischen den homologen Bereichen des Zielgens auf dem Chromosom und dem Plasmid ins Genom integriert (Oden *et al.*, 1990).

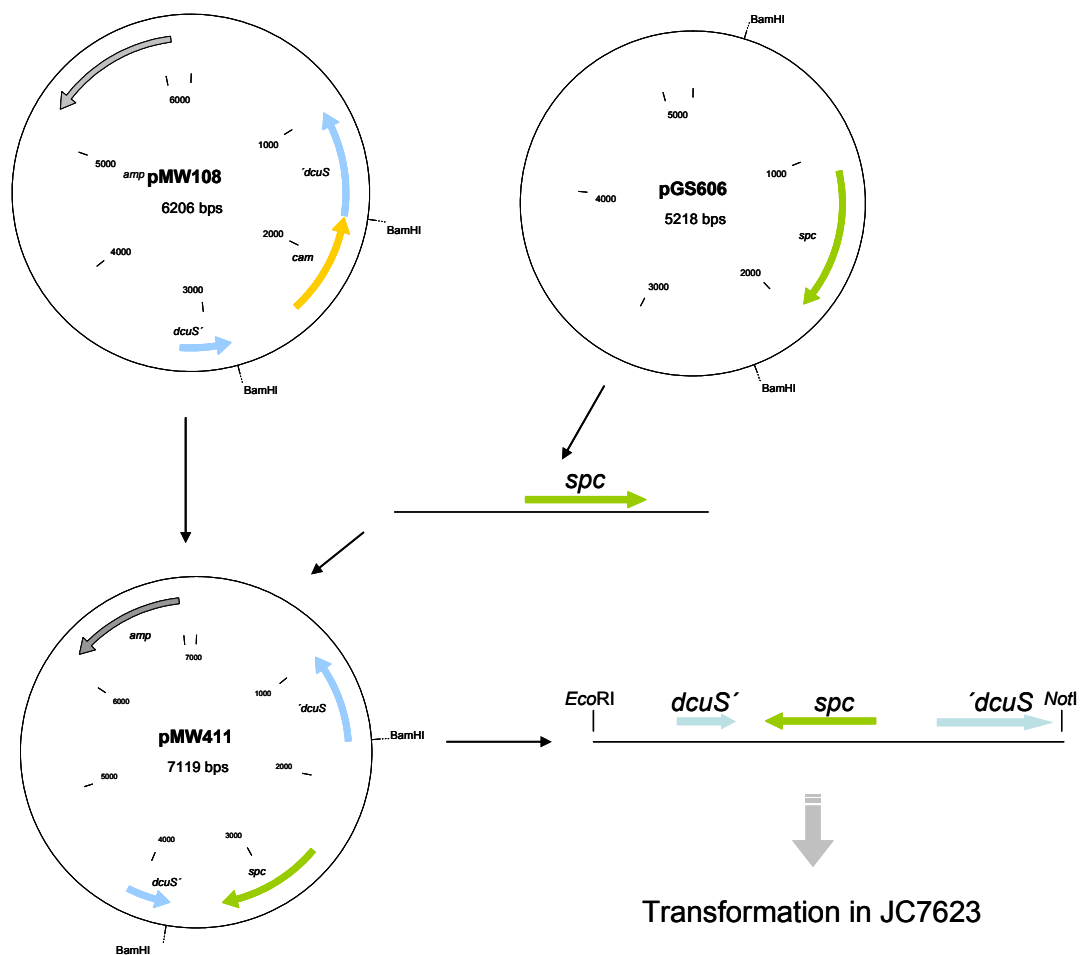


Abb. 4: Klonierungsschema zur Konstruktion des Plasmids pMW411. Das Plasmid pMW108 enthält das *dcuS* Gen unterbrochen von einer Chloramphenicol-Resistenzkassette. Mittels Restriktionsverdau mit *Bam*HI wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette entfernt und durch eine entsprechend verdaute Spectinomycin-Resistenzkassette aus pGS606 ersetzt (pMW411). Das inaktivierte *dcuS* Gen wurde ausgeschnitten und in den Stamm JC7623 transformiert.

Wenn eine homologe Rekombination erfolgt, ersetzt die durch die Resistenzkassette unterbrochene Kopie des Zielgens das Original auf dem Chromosom. Die entsprechenden Klone zeichneten sich daher durch eine neu erworbene Resistenz gegen Spectinomycin aus. Die Deletion im Zielgen konnte mittels PCR bestätigt werden.

Gerichtete Mutagenese von *dcuB* und *dcuS*

Zur Konstruktion von Punktmutanten wurde das Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Die DNA-Sequenz wurde in jedem Schritt so mutiert, dass in einer Mutagenesereaktion immer nur eine einzelne Aminosäure durch eine andere ersetzt wurde. Zur Konstruktion von Mehrfachmutanten wurden mehrere Mutagenesen nacheinander durchgeführt. Die verwendeten Primer sowie die eingeführten Aminosäureaustausche sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Mutagenesen von *dcuB* wurden mit dem Plasmid pMW281, das *dcuB* mit eigenem Promotor enthält oder bereits mutierten Derivaten durchgeführt. Punktmutationen im *dcuS* Gen wurden in dem Plasmid pMW181 eingeführt, das den Genbereich von *dcuS* mit dessen eigenem Promotor enthält. Die Mutanten wurden durch Sequenzierung überprüft.

Tab. 5: Verwendete Mutageneseprimer zur gerichteten Mutagenese von *dcuB* und *dcuS* (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Austausch
dcuB-Mut3	GCG ATA CCG TAC ACC GCC ACG ATG GCG ATC	73,6	DcuB V310A
dcuB-Mut4	GAT CGC CAT CGT GGC GGT GTA CGG TAT CGC	73,6	DcuB V310A
dcuB-H108A-for	CTT TGC GGT ACG GGT GCT GTG GTT TAC ACC ATT C	71,9	DcuB H108A
dcuB-H108A-rev	GAA TGG TGT AAA CCA CAG CAC CCG TAC CGC AAA G	71,9	DcuB H108A
dcuB-R127A-for	CCA TTA AGA ACA ACA TCG CTC CGG AAC GTC CGA TG	71,8	DcuB R127A
dcuB-R127A-rev	CAT CGG ACG TTC CGG AGC GAT GTT GTT CTT AAT GG	71,8	DcuB R127A
dcuB-R130A-for	CAT CCG TCC GGA AGC TCC GAT GGC GGC AAG	75,0	DcuB R130A
dcuB-R130A-rev	CTT GCC GCC ATC GGA GCT TCC GGA CGG ATG	75,0	DcuB R130A
dcuB-R127A- R130A-for	CCA TTA AGA ACA ACA TCG CTC CGG AAG CTC CGA TG	71,8	DcuB R127A R130A
dcuB-R127A- R130A-for	CAT CGG AGC TTC CGG AGC GAT GTT GTT CTT AAT GG	71,8	DcuB R127A R130A
dcuB-R196A-for	GGT ATC TTC AGC TGG TTC GCC GGT AAA GAT CTG G	71,6	DcuB R196A

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Austausch
dcuB-R196A-rev	CCA GAT CTT TAC CGG CGA ACC AGC TGA AGA TAC C	71,6	DcuB R196A
dcuB-K198A-for	GCT GGT TCC GCG GTG CAG ATC TGG ATA AAG ACG	73,2	DcuB K198A
dcuB-K198A-rev	CGT CTT TAT CCA GAT CTG CAC CGC GGA ACC AGC	73,2	DcuB K198A
dcuB-K202A-for	CGC GGT AAA GAT CTG GAT GCA GAC GAA GAG TTC C	71,9	DcuB K202A
dcuB-K202A-rev	GGA ACT CTT CGT CTG CAT CCA GAT CTT TAC CGC G	71,9	DcuB K202A
dcuB-K289A-for	CTG ATT ATT ATC CTG ACC GCA ACC AAT CCC GCG TC	71,8	DcuB K289A
dcuB-K289A-for	GAC GCG GGA TTG GTT GCG GTC AGG ATA ATA ATC AG	71,8	DcuB K289A
dcuB-R414A-for	CCA CCC ACA TCG GTG CCT TCG TCA TCA ACC AC	73,3	DcuB R414A
dcuB-R414A-rev	GTC GTT GAT GAC GAA GGC ACC GAT GTG GGT GG	73,3	DcuB R414A
dcuB-H419A-for	CGC TTC GTC ATC AAC GCC AGC TTT ATT CTG CCG G	73,1	DcuB H419A
dcuB-H419A-rev	CCG GCA GAA TAA AGC TGG CGT TGA TGA CGA AGC G	73,1	DcuB H419A
dcuB-Y389taa-for	GGC TTG CTA CGG TTA ATA CAT CCT GCC GAC	69,5	DcuB Y389Stopp
dcuB-Y389taa-rev	GTC GGC AGG ATG TAT TAA CCG TAG CAA GCC	69,5	DcuB Y389Stopp
dcuB-T409taa-for	GTT TGA CCG TTC CGG CTA AAC CCA CAT CGG TCG	74,3	DcuB T409Stopp
dcuB-T409taa-rev	GCG ACC GAT GTG GGT TTA GCC GGA ACG GTC AAA C	74,3	DcuB T409Stopp
dcuB-T394I-for	GTT ATT ACA TCC TGC CGA TTT ATC CGA GCG ATC TGG	70,6	DcuB T394I
dcuB-T394I-rev	CCA GAT CGC TCG GAT AAA TCG GCA GGA TGT AAT AAC	70,6	DcuB T394I
dcuB-T394N-for	GTT ATT ACA TCC TGC CGA ACT ATC CGA GCG ATC TGG	71,7	DcuB T394N
dcuB-T394N-rev	CCA GAT CGC TCG GAT AGT TCG GCA GGA TGT AAT AAC	71,7	DcuB T394N
dcuB-T394A-for	GTT ATT ACA TCC TGC CGG CTT ATC CGA GCG ATC TGG	72,9	DcuB T394A
dcuB-T394A-rev	CCA GAT CGC TCG GAT AAG CCG GCA GGA TGT AAT AAC	72,9	DcuB T394A
dcuB-T394S-for	GTT ATT ACA TCC TGC CGT CTT ATC CGA GCG ATC TGG	71,7	DcuB T394S
dcuB-T394S-rev	CCA GAT CGC TCG GAT AAG ACG GCA GGA TGT AAT AAC	71,7	DcuB T394S
dcuB-D398N-for	CCG ACT TAT CCG AGC AAT CTG GCA GCG ATT C	70,8	DcuB D398N
dcuB-D398N-rev	GAA TCG CTG CCA GAT TGC TCG GAT AAG TCG G	70,8	DcuB D398N
dcuBH325 NdeI weg for	CAT GTT CGG TGC GCA CAT GTC TGA AAT TCA GG	69,5	NdeI im dcuB Gen entfernt

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Austausch
dcuB H325 NdeI weg rev	CCT GAA TTT CAG ACA TGT GCG CAC CGA ACA TG	69,5	NdeI im <i>dcuB</i> Gen entfernt
dcuB+NdeI Start for	CGC GAG GGT TCA CAT ATG TTA TTT ACT ATC C	65,5	NdeI am Startcodon eingeführt
dcuB+NdeI Start rev	GGA TAG TAA ATA ACA TAT GTG AAC CCT CGC G	65,5	NdeI am Startcodon eingeführt
pMW281-NdeI vor P for	GCG GCA GCC ACA TGG CTA GCA TGA CTG	71,0	NdeI vor Promotor entfernt
pMW281-NdeI vor P rev	CAG TCA TGC TAG CCA TGT GGC TGC CGC	71,0	NdeI vor Promotor entfernt
dcuS-C199A-for	CGG ACT GAT TGG CAC CGC CAT TCT GGT TAA GG	72,1	DcuS C199A
dcuS-C199A-rev	CCT TAA CCA GAA TGG CGG TGC CAA TCA GTC CG	72,1	DcuS C199A
dcuS-K203A-for	GGC ACC TGC ATT CTG GTT GCG GTA CTG AAA AAA ATC C	71,7	DcuS K203A
dcuS-K203A-rev	GGA TTT TTT TCA GTA CCG CAA CCA GAA TGC ACG TGC C	71,7	DcuS K203A
dcuS-K203Q-for	GGC ACC TGC ATT CTG GTT CAG GTA CTG AAA AAA ATC C	70,6	DcuS K203Q
dcuS-K203Q-rev	GGA TTT TTT TCA GTA CCT GAA CCA GAA TGC ACG TGC C	70,6	DcuS K203Q

Ungerichtete Mutagenese mit Hydroxylamin Hydrochlorid (nach Yurgel *et al.*, 2004)

Zur Herstellung von *dcuB* Punktmutanten, die die Expression von *dcuB'*-*lacZ* induzieren, aber noch transportaktiv sind, wurde eine ungerichtete Mutagenese mit Hydroxylamin Hydrochlorid (Fluka) durchgeführt. Hydroxylamin ist ein chemisches Mutagen, das durch eine Reaktion mit der Base Cytosin diese so verändert, dass Cytosin nun eine Basenpaarung mit Adenin eingeht. Im nächsten Replikationszyklus wird dann die ursprüngliche Base Cytosin durch Thymin ersetzt. Dies bewirkt auf DNA-Ebene eine Transition von C/G nach T/A.

Für einen Mutageneseansatz wurden 20 µg des Plasmids pMW228 (*dcuB* mit eigenem Promotor) mit 500 µl Puffer (0,1 M Na-P_i-Puffer pH 6 1 mM EDTA) und 400 µl einer frischen 1 M Hydroxylamin Hydrochlorid Lösung in einem Endvolumen von 1 ml versetzt. Der Ansatz wurde für 5 h bei 70° C inkubiert. Alle 2 h wurde 200 µl Probe entnommen und entweder mit Ethanol gefällt oder mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) gereinigt und durch Butanol-Fällung aufkonzentriert. Die DNA wurde anschließend in 10 µl H₂O aufgenommen und der komplette Ansatz in den Reporterstamm IMW505 (*dcuA'* *dcuB'* *dcuC'*, λ (*dcuB'*-

lacZ) transformiert. Zur Selektion wurden die Transformationsansätze auf Minimal-Agarplatten mit Glycerin (50 mM), DMSO (20 mM) und X-Gal (40 µg/ml) ausplattiert. Die gewünschten Mutanten zeigten auf diesen Platten eine Blaufärbung. Die Mutanten wurden erneut ausgestrichen und zur weiteren Selektion auf ihre Fähigkeit zum anaeroben Wachstum auf Glycerin und Fumarat und damit auf ein transportaktives DcuB-Protein überprüft (Abb. 5). Die Expression von Mutanten mit der Fähigkeit zum anaeroben Wachstum wurden erneut in β -Galactosidase-Tests auf ihre Induktion der *dcuB*'-*lacZ* Reporterfusion in Abwesenheit von Fumarat überprüft. Die so selektierten Mutanten wurden anschließend mittels Sequenzierung überprüft.

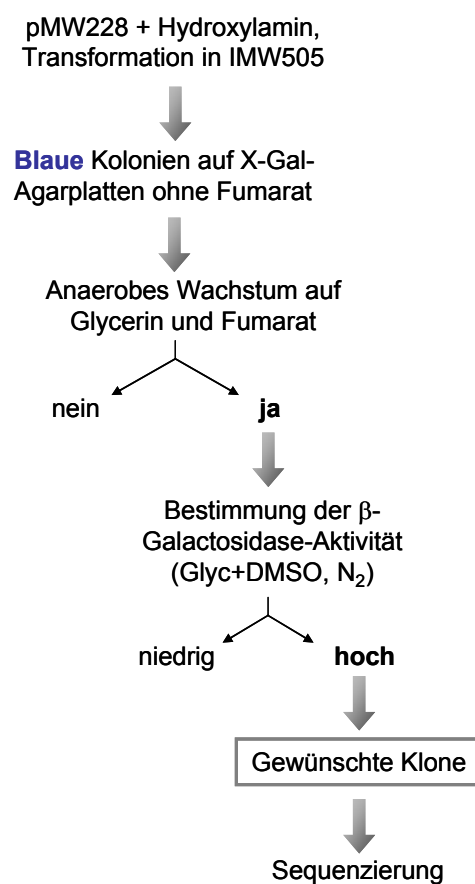


Abb. 5: Selektionsschema zur Identifizierung der gewünschten *dcuB* Punktmutanten nach ungerichteter Mutagenese von pMW228 mit Hydroxylamin Hydrochlorid. Klone, die nach ungerichteter Mutagenese auf Indikatoragarplatten mit X-Gal ohne Fumarat eine Blaufärbung aufwiesen, und außerdem zum anaeroben Wachstum auf Fumarat fähig waren, entsprachen dem gewünschten Phänotyp. Die eingeführten Mutationen wurden mittels Sequenzierung identifiziert.

Mittels ungerichteter Mutagenese von *dcuS* sollten Punktmutanten identifiziert werden, welche die Effekte der in *dcuB* eingeführten Punktmutationen kompensieren sollten. Die ungerichtete Mutagenese von *dcuS* zur Identifizierung von solchen kompensatorischen

Mutanten wurde in analoger Weise durchgeführt (Abb. 6). Für die Mutagenese wurde das Plasmid pMW181 verwendet, da es das *dcuS* Gen unter der Kontrolle des eigenen Promotors enthält. Zur Selektion wurde das Plasmid nach der ungerichteten Mutagenese in den Stamm IMW536 (*dcuS* *dcuB* λ (*dcuB*'-'*lacZ*)) transformiert, der bereits das Plasmid pMW397 (*dcuB*, aber T394I) enthielt. Auf X-Gal-haltigen Selektionsagarplatten wurde nach Kolonien gesucht, die in Abwesenheit von Fumarat wieder eine niedrige Expression des Reportergens aufwiesen. In den gewünschten Mutanten sollte die Expression durch Zugabe des Induktors Fumarat außerdem wieder stimulierbar sein. Die Expression von Klonen, die auf den Selektionsagarplatten den gewünschten Phänotyp zeigten, wurde in β -Galactosidase-Messungen erneut überprüft und die eingeführte Mutation durch Sequenzierung identifiziert.

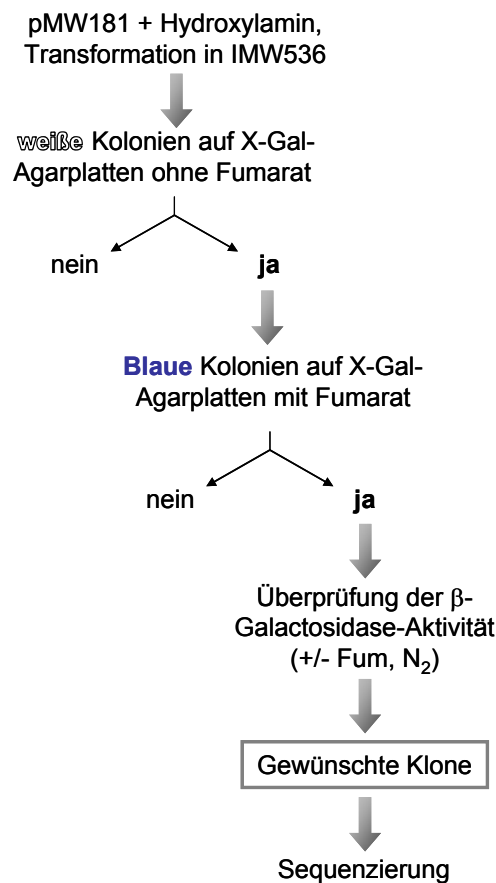


Abb. 6: Selektionsschema zur Identifizierung der gewünschten *dcuS* Punktmutanten nach ungerichteter Mutagenese von pMW181 mit Hydroxylamin Hydrochlorid. Klone, die nach ungerichteter Mutagenese auf Indikatoragarplatten mit X-Gal ohne Fumarat keine Blaufärbung aufwiesen und in Anwesenheit von Fumarat wieder blau erschienen, entsprachen dem gewünschten Phänotyp. Die eingeführten Mutationen wurden mittels Sequenzierung identifiziert.

Klonierung von *dcuB* aus *Wolinella succinogenes*

Für die Expression des *dcuB* Gens aus *Wolinella succinogenes* in *E. coli* wurde das Gen mittels PCR von dem Plasmid pW2E6 (Ullmann *et al.*, 2000) amplifiziert. Dabei wurden die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* über Primer vor bzw. hinter dem Gen eingefügt. Um das Gen über den Promotor des *E. coli dcuB* exprimieren zu können, erfolgte anschließend die Umklonierung in den Vektor pMW281, aus dem zuvor mittels Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle am Startcodon eingefügt sowie im Gen enthaltene *NdeI*-Schnittstellen entfernt wurden. Das erhaltene Plasmid pMW436 enthält folglich das *dcuB* Gen aus *W. succinogenes* hinter dem *dcuB* Promotor von *E. coli*. Für Wachstumstests wurde das *dcuB* Gen mit Promotor schließlich über Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* in den low-copy Vektor pME6010 umkloniert (pMW424).

DNA Sequenzierungen

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise (Mainz) oder von der Firma Agowa (Berlin) durchgeführt.

3.4 Two-Hybrid Systeme zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

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

Das "Bacterial Two-Hybrid-System" (BACTH-System) basiert auf einer Interaktionsvermittelten Rekonstitution der Adenylatcyclase-Aktivität in *cya* negativen Stämmen von *Escherichia coli*. Hierzu wird die katalytische Domäne der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* verwendet, die aus den zwei komplementären Fragmenten T18 and T25 (Abb. 7 A) besteht. Werden die Fragmente genetisch voneinander getrennt, verlieren sie ihre katalytische Aktivität (Abb. 7 B). Fusioniert man T25 und T18 an zwei interagierende Proteine, werden die Fragmente über die Heterodimerisierung der entstehenden Hybridproteine wieder funktionell zusammengeführt. Die wiederhergestellte Adenylatcyclase-aktivität resultiert in der Synthese von cAMP (Abb. 7 C). Zyklisches AMP bindet im nächsten Schritt an das „catabolite activator protein“, CAP. Der cAMP/CAP Komplex aktiviert in *E. coli* die Expression von verschiedenen Genen. Hierzu gehören die Gene des *lac*- und des *mal*-Operons, die für Gene des Lactose- bzw. des Maltose-Stoffwechsels kodieren (Abb. 7 D). Die Expression der β -Galactosidase kann deshalb als Maß für die Interaktion von Proteinen benutzt werden.

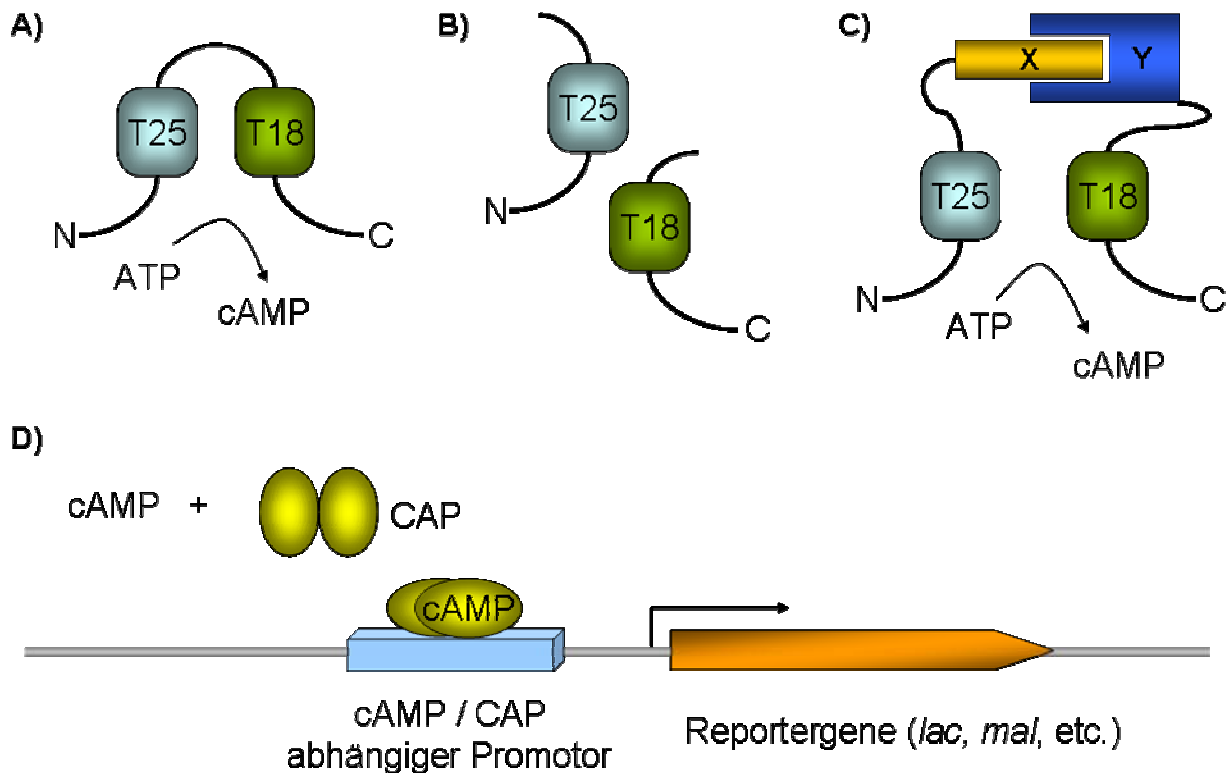


Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktion des BACTH-Systems nach Karimova *et al.* Die katalytischen Fragmente der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* setzen ATP zu cAMP um (A). Eine Trennung der Fragmente führt zum Verlust der katalytischen Aktivität (B), die durch eine Fusion an zwei interagierende Proteine X und Y wieder hergestellt werden kann (C). Die wiederhergestellte Adenylatcyclaseaktivität führt zur Bildung von cAMP und über die Bildung des cAMP/CAP-Komplexes zur Expression von Reporter Genen (D).

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen untersuchen können, müssen sie im gleichen *cyd* Stamm koexprimiert werden. Hierzu werden Vektoren benutzt, die bereits entweder das T25-Fragment oder das T18-Fragment kodieren und sich sowohl in der Antibiotikaresistenz als auch im Replikationsursprung unterscheiden. Dabei können die katalytischen Fragmente entweder an den N- oder den C-Terminus des zu untersuchenden Proteins fusioniert werden. Die verwendeten Vektoren sind in Abb. 8 dargestellt.

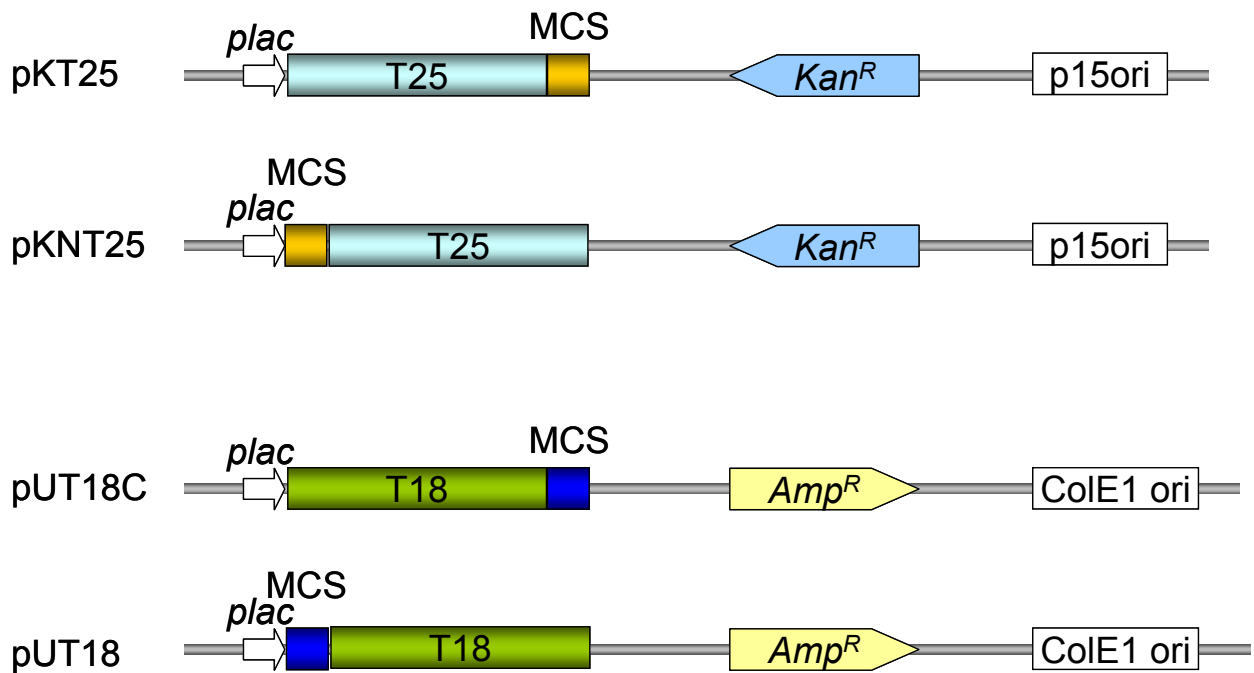


Abb. 8: Verwendete Vektoren des BACTH-Systems. Dargestellt ist die Lage der katalytischen Fragmente T25 und T18 in Bezug auf die Multiple Cloning Site, sowie die Resistenz und der Replikationsursprung des jeweiligen Vektors.

Der Vektor pKT25 trägt die Sequenz für das T25-Fragment mit einer anschließenden Multiple Cloning Site. Dies ermöglicht die Konstruktion eines Fusionsproteins mit dem T25 am N-Terminus des zu testenden Proteins. Der Vektor pKNT25 trägt ebenfalls das T25-Fragment, die Lage der MCS am 5' Ende von T25 erlaubt jedoch die Konstruktion eines Hybridproteins mit dem T25-Fragment am C-Terminus des Testproteins.

Das Plasmid pUT18 enthält die Sequenz des T18-Fragments und fusioniert es an den C-Terminus des Hybridproteins. Die Verwendung von pUT18C führt zu einem Hybridprotein mit dem T18-Fragment am N-Terminus des Testproteins. Die zur Konstruktion der Hybridproteine verwendeten Primer sind in Tab. 2 dargestellt.

Der Interaktionstest erfolgte in der *cya⁻* Mutante BTH101. Hierzu wurden elektrokompente Zellen von BTH101 hergestellt. 40 μ l elektrokompente Zellen wurden mit je 5 ng der beiden Testplasmide transformiert und zur Selektion auf LB-Kan-Amp-X-Gal ausplattiert. Als Positivkontrolle wurden kompetente Zellen mit den Plasmiden pKT25-Zip und pUT18C-Zip transformiert, in denen die jeweiligen Fragmente an die Leucinzipper-Domäne des Transkriptionsfaktor GCN4 aus Hefen fusioniert sind.

Zur Bestimmung der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität wurden 30 ml LB-Medium 1 %ig aus Übernachtskulturen der erhaltenen Transformanten inokuliert und bei 37° C in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bis zu einer OD_{578} 0,5-0,8 inkubiert.

BacterioMatch™ Two-Hybrid-System von Stratagene

Das BacterioMatch™ Two-Hybrid-System dient zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen. Die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen wird über die transkriptionelle Aktivierung des *amp^R* Gens und das Wachstum von Carbenicillin-resistenten Kolonien eines *E. coli* Reporterstamms gemessen. Der Reporterstamm XL1 Blue MRF' trägt die Reportergene *amp*, welches die Carbenicillin-Resistenz vermittelt, und *lacZ*, das für die β -Galactosidase kodiert, unter der Kontrolle des λ -Operators (Abb. 9 A). Um die Expression der Reportergene anzuschalten, muss das λ -C1-Repressor-Protein des Bakteriophagen λ an den Operator und die RNA-Polymerase an den Promotor binden (Abb. 9 B). Die gleichzeitige Bindung von Repressor und Polymerase erfolgt jedoch nur dann, wenn sie mit zwei interagierenden Proteinen („Bait“ und „Target“) fusioniert sind und im Reporterstamm ko-exprimiert werden.

Zur Herstellung dieser Fusionsproteine wird zunächst das eine Protein („Bait“) durch Klonierung in den Vektor pBT mit dem λ -C1-Repressor-Protein fusioniert, das N-terminal eine DNA-Bindedomäne und C-terminal eine Dimerisierungsdomäne enthält. Das zweite Protein („Target“) wird in den Vektor pTRG kloniert und auf diese Weise an die N-terminale Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase fusioniert (Abb. 9 C). Jeweils 10 ng der so hergestellten rekombinanten Plasmide werden in kompetente Zellen des Reporterstamms XL1 Blue MRF' kotransformiert. Für den Interaktionstest werden die Transformationsansätze auf LB-Platten ausplattiert, die neben Kanamycin, Tetracyclin und Chloramphenicol 250-300 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin enthalten. Carbenicillin ist stabiler als Ampicillin und die Verwendung soll die Entstehung von falschen-positiven Kolonien reduzieren. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 30° C für mindestens 24 h.

Für die Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 aus Hefen und die Gal11^P Domäne, eine mutierte Form des Gal11 Proteins, konnte bereits eine Interaktion nachgewiesen werden. Diese Polypeptide werden von den Kontrollplasmiden pBT-LGF2 und pTRG-Gal11^P exprimiert. Wird der Reporterstamm mit diesen Plasmiden kotransformiert, zeigt sich die Interaktion über das Wachstum von Carbenicillin-resistenten Kolonien auf LB-Platten mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin.

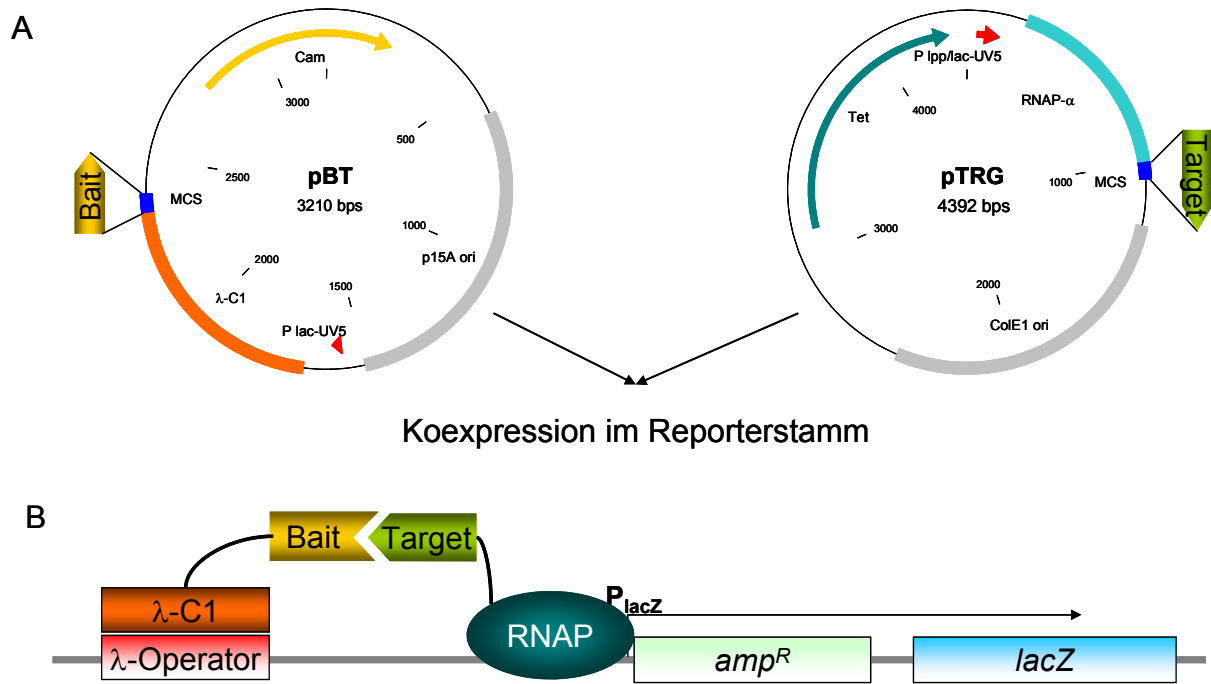


Abb. 9: Prinzip des BacterioMatch™ Two-Hybrid-Systems von Stratagene. A: Der Bait-Vektor pBT erlaubt die Fusion des Fängerproteins mit dem Bacteriophagen λ C1-Protein. Der Targetvektor pTRG ermöglicht die Herstellung von Hybridproteinen mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase. Durch Transformation der rekombinanten Vektoren im Reporterstamm werden die Proteine koexprimiert. B: Über eine Wechselwirkung der Hybridproteine und der Bindung des λ -C1-Proteins an die λ -Operator-Sequenz wird die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor ermöglicht und es kommt zur Expression der Reportergene *amp^R* und *lacZ*.

Um eine Interaktion von DcuB mit DcuS oder DcuR nachzuweisen, wurden einerseits rekombinante Formen von pBT hergestellt, in denen das gesamte DcuB Protein oder nur Teile davon mit dem λ -Repressor fusioniert sind und andererseits rekombinanten Versionen von pTRG, die entweder das komplette *dcuS* oder *dcuR* Gen oder nur bestimmte Domänen davon enthielten. Jeweils 10 ng des zu testenden rekombinanten Baitvektors und 10 ng des passenden Targetvektors werden zu 100 μ l kompetenten Zellen des Reporterstamms gegeben. Nachdem die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert wurden, erfolgte die Transformation mittels Hitzeschock bei 42° C für 42 sec. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min erfolgten die Zugabe von 0,9 ml NZY-Medium und eine Inkubation der Ansätze bei 30° C für 1,5 h auf einem Inkubationsschüttler. Je 1 μ l bzw. 10 μ l der Testtransformationsansätze wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Carbenicillin (250-300 ng/ μ l), Tetracyclin (15 ng/ μ l), Chloramphenicol (34 ng/ μ l) und Kanamycin (50 ng/ml) ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 30° C für 24 h wurden die Carbenicillin-resistenten Kolonien auf den Testagarplatten ausgezählt.

3.5 Biochemische Methoden

Messung der Succinat-Aufnahme

Lösungen: Puffer A anaerobisiert (100 mM Na-K-Pi-Puffer pH 7, 1 mM MgSO₄)
1 M Glucose anaerobisiert
2,3-[¹⁴C]-Succinat (Hartmann Analytic, 9,25 MBq, 44,8 mCi / mmol)
0,1 M LiCl (Stopplösung)
Scintillationslösung (Rotiscint ecoplus, Roth)

Herstellung der Zellsuspensionen

Die anaerobe Zucht der Zellen erfolgte in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO und 20 mM Fumarat. Die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Phase geerntet und ab diesem Zeitpunkt auf Eis gehalten. Die Zellen wurden 20 min (10.000 x g, 4° C) abzentrifugiert und mit anaerobisiertem Puffer A (100 mM NaKPi-Puffer, 1 mM MgSO₄, pH 7) gewaschen. Mit Puffer A wurde eine Zellsuspension mit einer OD_{578nm} von 6,6 hergestellt und anschließend 3 x 10 min anaerobisiert. Zur Energetisierung wurden 200 µl Zellen mit 20 mM anaerobisierter Glucose bei 37° C inkubiert und dann sofort verwendet. Die OD wurde nochmals genau bestimmt und dieser Wert für die späteren Berechnungen verwendet.

Transportmessungen

Von einer 200 µM [¹⁴C]-Succinat-Lösung wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 110 µl vorgelegt und auf 37° C erwärmt. Die spezifische Aktivität betrug 2004 dpm / nmol. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 110 µl energetisierter Zellsuspension. Die Endkonzentration des radioaktiven Substrates betrug 100 µM. Nach 20 bzw. 60 sec wurden 100 µl entnommen, die Reaktion durch Zugabe 0,9 ml eiskalter 0,1 M LiCl-Lösung gestoppt und die Zellen mit einem Vakuum-Filtrationsgerät (FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) über Membranfilter filtriert. Dazu wurden die Membranfilter aus Cellulosemischesther (Ø 25 mm, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell) vor der Filtration mit 0,1 M LiCl-Lösung befeuchtet. Nach der Filtration wurden die Zellen auf dem Filter dreimal mit 1 ml 0,1 M LiCl-Lösung (20° C) gewaschen.

Bestimmung der Radioaktivität in der Zelle

Die Membranfilter wurden in Probenröhrchen mit 4 ml Scintillationslösung (Rotiscint ecoplus, Roth) überführt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Liquid Scintillation System, LS 6000SC, Beckman) bestimmt. Zur Bestimmung der Aufnahmeaktivität wurde für jede Messreihe ein Blindwert (unspezifische Bindung) bestimmt. Dazu wurden im Reaktionsgefäß 0,9 ml Stopplösung (0,1 M LiCl) mit 10 µl 1 mM [¹⁴C]-Succinat vorgelegt und dann 50 µl energetisierte Zellen zugegeben.

Berechnung der Aufnahmeaktivität

Von den gemessenen dpm-Werten der Proben wurden der jeweilige Blindwert abgezogen und die Transportaktivität in U / g (nmol / min / mg TG) angegeben. Die Radioaktivität der [¹⁴C]-Succinat-Lösung betrug 2004 dpm / nmol. Die Aufnahmeaktivität wurde wie folgt berechnet:

Aufnahmeaktivität für Succinat:

$$\text{U/g TG [nmol/ mg TG / min]} = \frac{(\text{gemessene Radioaktivität der Probe} - \text{BW}) [\text{dpm}] \times 10000}{2004 [\text{dpm/nmol}] \times \text{OD}_{578} \times 281 [\text{mg TG}] \times \text{Zeit} [\text{min}]}$$

Überproduktion und Aufreinigung von DcuB_{6xHis}

Für die Überproduktion von DcuB wurde das Plasmid pMW280 in *E. coli* C43 transformiert. Die Zucht erfolgte in LB-Medium in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die mit maximal 20 % des Gesamtvolumens befüllt wurden. Die Inkubation erfolgte aerob bei 30° C. Bei einer OD_{578nm} von 0,6 – 0,8 erfolgte die Induktion der Überexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Peqlab). Nach weiteren 3 h Inkubation erfolgte die Ernte durch Zentrifugation (10 min bei 6000 Upm, Beckman JA-10 Rotor, 4° C). Das Pellet wurde in Puffer 1 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 20 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Zellen wurden in 2 Durchgängen bei 1200 Psi in der French Presse aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 10.000 Upm, FiberLite F21B Rotor, 4° C) abgetrennt. Vom Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (Kontron TFT70.38 Rotor, 200.000 x g, 65 min, 4°C, Beckman Coulter Optima LE-80K) die Membranfraktion erhalten. Die Membranen wurden in 2 Durchgängen mit 1 mM TrisHCl pH 7,7, 3 mM EDTA gewaschen und in Puffer 2 im Potter S (Braun, Melsungen) homogenisiert. Hierzu wurde das Nassgewicht der Membranen bestimmt und pro g Membran 10 ml Puffer 2 verwendet.

Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde die Membranfraktion nach Zusatz von 2 % Triton X-100 (Fluka) in Puffer 2 im Potter homogenisiert und so gleichzeitig solubilisiert. Die Membranen wurden für 30 min auf Eis gerührt. Die Suspension wurde bei 300.000 x g für 50 min zentrifugiert, um nicht solubilisierte Anteile abzutrennen. Die so erhaltene gelöste Membranfraktion wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert oder konnte direkt weiterverwendet werden.

Der Überstand mit solubilisiertem DcuB_{6xHis} wurde mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt. Das Säulenvolumen betrug 1 ml. Die Säule wurde mit dem 10-fachen Volumen an Puffer 3 equilibriert. Anschließend wurden die solubilisierten Membranen aufgetragen. Die Säule wurde mit 6 Volumina Puffer 4 gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 5 x 1 ml Puffer 5 eluiert und in Fraktionen gesammelt.

Puffer 1:

50 mM TrisHCl pH 7,7

10 mM MgCl₂

Puffer 2:

50 mM TrisHCl pH 7,7

10 % Glycerin

Puffer 3:

50 mM TrisHCl pH 7,7

0,5 M NaCl

10 % Glycerin

20 mM Imidazol

0,04 % Triton X-100 (Fluka)

Puffer 4:

Wie Puffer 3, aber mit 40 mM Imidazol

Puffer 5:

Wie Puffer 3, aber mit 500 mM Imidazol

***In vitro* Translation von DcuB_{6xHis} mit dem EasyXpressTM Protein Synthesis Kit (Qiagen)**

Für die Überproduktion von DcuB *in vitro* wurde das EasyXpressTM Protein Synthesis Kit von Qiagen verwendet. Es dient zur zellfreien Proteinsynthese mithilfe von *E. coli* Lysaten, die alle notwendigen Komponenten des Transkriptions- und Translationsapparates sowie die T7-RNA-Polymerase enthalten. Als Template für die Synthese des DcuB-His-tag-Fusionsproteins dient das Plasmid pMW280, das das *dcuB* Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors trägt. Für die *in vitro* Translation wird 20 µl EasyXpress Reaction Buffer mit 2,5 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und zusammen mit 17,5 µl *E. coli* Extrakt, 0,5 – 1 µg RNase-freies Plasmid, 0,025 % bzw. 0,05 % Triton X-100 und RNase-freiem Wasser in

einem Endvolumen von 50 µl gemischt und für 1 h bei 37° C auf dem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation auf Eis abgestoppt.

Die *in vitro* Translationsansätze wurden anschließend über Ni-NTA-Agarose-Beads (Qiagen) gereinigt. Dazu wurde je ein Reaktionsansatz mit 150 µl resuspendierten Agarose-Beads in einem Eppendorfreaktionsgefäß gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in einem magnetischen Separator inkubiert, in dem die Beads durch den enthaltenen Magneten auf eine Seite des Reaktionsgefäßes gezogen werden und so nach 1 min der Überstand abgenommen werden konnte. Das Reaktionsgefäß wurde aus dem Magnetseparator entfernt und zur Equilibrierung der Ni-NTA-Agarose-Beads mit 500 µl Bindepuffer versetzt. Nach erneutem Mischen wurde das Gefäß wieder für 1 min in den Magnetseparator gestellt und der Überstand entfernt. Die Beads wurden erneut mit 700 µl Bindepuffer vermischt und 50 µl des *in vitro* Reaktionsansatzes zugegeben. Die Suspension wurde resuspendiert und für 60 min bei 4° C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Die Suspension wurde anschließend in den Magnetseparator gestellt und nach 1 min der Überstand mit den ungebundenen Proteinen entfernt. Die Beads wurden anschließend zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch zweimalige Zugabe von 50 µl Elutionspuffer eluiert. Das meiste gebundene 6xHis-Protein eluierte dabei im ersten Schritt.

Lösungen:

Bindepuffer:	Waschpuffer:	Elutionspuffer:
50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
10 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
0,05 % Tween 20	0,05 % Tween 20	0,05 % Tween 20
auf pH 8,0 mit NaOH	auf pH 8,0 mit NaOH	auf pH 8,0 mit NaOH

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von DcuB auf die DcuSR-abhängige Genexpression

In *Escherichia coli* wird die Expression der Gene der Fumaratatmung, wie zum Beispiel das des anaeroben Fumarat-Carriers *dcuB*, über das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert. Das Zweikomponentensystem wird in Anwesenheit von Fumarat stimuliert (Golby *et al.*, 1999; Zientz *et al.*, 1998). Deshalb ist *dcuB* gut als Indikatorgen für die Untersuchung der DcuSR-abhängigen Genexpression geeignet. Mit einer translationellen *dcuB'*-*lacZ* Reporterengenfusion kann die Expressionsstärke von *dcuB* anhand der β -Galactosidaseaktivität gemessen werden. Bisher ging man davon aus, dass nur die Sensorkinase DcuS den Stimulus Fumarat erkennt. Es zeigte sich jedoch, dass auch der C₄-Dicarboxylattransporter DcuB die DcuSR-abhängige Genexpression beeinflusst (Kleefeld, 2002).

Tab. 6 zeigt die Expression von *dcuB'*-*lacZ* nach anaerober Zucht in *dcu*-Mutanten. Die Bakterien wurden für dieses Experiment mit Glycerin plus Dimethylsulfoxid (DMSO) als Energiequelle gezüchtet, um einerseits ein Wachstum der *dcu* Mutanten zu ermöglichen und andererseits eine Repression von *dcuB* durch Glucose zu vermeiden.

Nach anaerober Zucht mit Glycerin und DMSO als Elektronenakzeptor war die Expression von *dcuB'*-*lacZ* im Wildtyp niedrig. Sie wurde in Anwesenheit von Fumarat um den Faktor 15 induziert. In der *dcuA* und der *dcuC* Mutante war die Expression ebenfalls gering und wurde durch Zugabe des Induktors wie im Wildtyp induziert. In der *dcuB* Mutante war die Expression der *dcuB'*-*lacZ* Reporterengenfusion bereits in Abwesenheit von Fumarat höher als im Wildtyp nach Induktion. Sie konnte durch die Zugabe von Fumarat nicht weiter stimuliert werden. Die Expression von *dcuB* war hierbei ohne Fumarat sogar höher als mit Fumarat, was man auf das schlechte Wachstum der *dcuB* Mutante zurückführen könnte. Ähnliche Befunde waren in *dcu*-Doppelmutanten, in denen *dcuB* inaktiviert war, und in der *dcuABC*-Dreifachmutante zu beobachten. Insgesamt zeigte sich, dass die Inaktivierung von *dcuB*, nicht aber die von *dcuA* oder *dcuC*, die Expression von *dcuB'*-*lacZ* bereits in Abwesenheit von Fumarat stark induziert.

Tab. 6: Einfluss der Inaktivierung von *dcuA*, *dcuB* und *dcuC* auf die Expression einer *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion. Die Zucht erfolgte anaerob in angereichertem M9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat (20mM)
IMW237 (<i>wt</i>)	28	431
IMW369 (<i>dcuA</i> ⁻)	14	460
IMW370 (<i>dcuB</i> ⁻)	610	435
IMW371 (<i>dcuC</i> ⁻)	31	472
IMW372 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁻)	335	504
IMW373 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	14	449
IMW374 (<i>dcuB</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	569	493
IMW329 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	332	578

Plasmide zur Komplementation von *dcuB*

Um den Effekt der *dcuB* Mutante genauer zu charakterisieren, wurden Punktmutanten von *dcuB* hergestellt, die entweder die DcuSR-abhängige Genexpression oder die Fumarataufnahme durch DcuB verändern sollten. Die gewünschten Mutationen wurden in einem Plasmid-kodierten *dcuB* Gen eingeführt, das unter der Expression des eigenen Promotors steht. Dieses Plasmid wurde anschließend benutzt, um den Gendefekt einer *dcuB* inaktiven Mutante zu komplementieren.

Das Plasmid pMW228 ist ein low-copy Plasmid mit ungefähr 10 Kopien pro Zelle und enthält das *dcuB* Gen mit eigenem Promotor. Aufgrund seiner Größe von über 10 kb und der Plasmid-kodierten Tetracyclin-Resistenz ist es nicht für die Mutagenese geeignet. Der Genbereich, der das *dcuB* Gen und seinen Promotor umfasst, wurde in den Vektor pET28a kloniert (Abb. 10). Das so entstandene Plasmid pMW281 war nur noch 7,2 kb groß, lag mit ca. 40 bis 50 Kopien pro Zelle vor und zeichnete sich durch eine Kanamycin-Resistenz aus. Größe und Resistenz von pMW281 waren daher für eine Mutagenese geeignet.

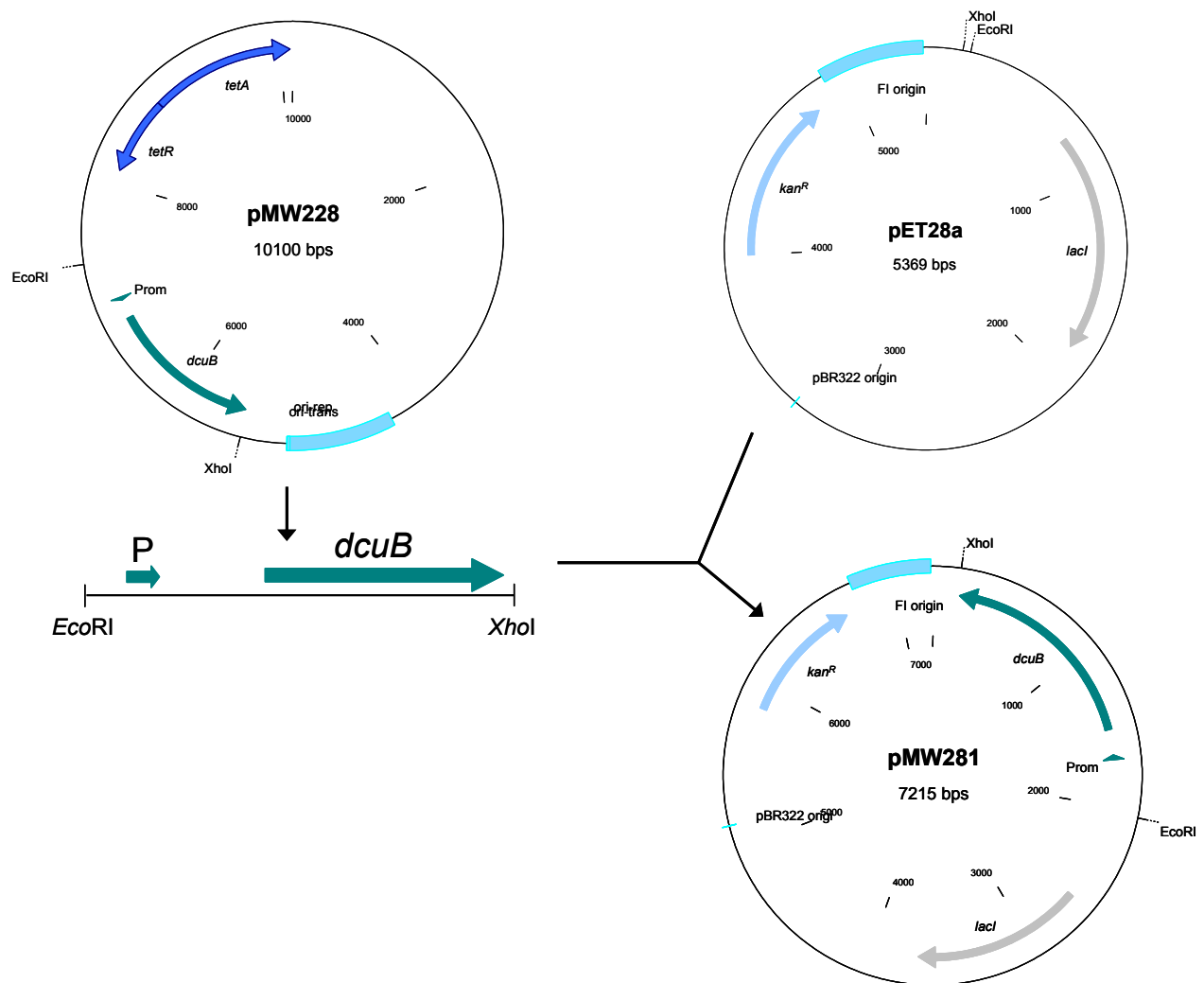


Abb. 10: Klonierung von *dcuB* mit eigenem Promotor in pET28a (pMW281). Mithilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* wurde ein 1,9 kb großes DNA-Fragment aus pMW228 ausgeschnitten, welches das *dcuB* Gen mit seinem Promotor enthält. Das Fragment wurde in den entsprechend verdauten Vektor pET28a (Novagen) ligiert. Das resultierende Plasmid pMW281 enthält das *dcuB* Gen mit Promotor und trägt eine Kanamycin-Resistenz.

Deletion von *dcuB*

Für die Komplementation wurde eine *dcuB* Mutante konstruiert, die weder eine Tetracyclin- noch eine Kanamycin-Resistenz besitzt und somit eine Transformation mit den beiden *dcuB*-Plasmiden ermöglicht. Dazu wurde das *dcuB* Gen im Genom mit der Methode nach Datsenko & Wanner (2000) inaktiviert. Mit dieser Methode können gezielt komplette Gene durch Austausch gegen eine Antibiotika-Resistenzkassette ausgeschaltet werden, wobei die Resistenzkassette in einem zweiten Schritt wieder deletiert wird. Dies erlaubt die Deletion des gewünschten Gens, ohne dass man neue Antibiotika-Resistenzen in den Zielstamm einführt.

Für die Deletion des *dcuB* Gens wurden Deletionsprimer verwendet, die neben einem 50 Nukleotide langen Homologiebereich vor bzw. nach dem *dcuB* Gen (H1 und H2) auch

einen jeweils 20 Nukleotide langen Homologiebereich zum Plasmid pKD3 (P1 und P2) enthielten, das als Template zur Amplifikation einer Chloramphenicol-Resistenzkassette dient (Abb. 11 A).

Das PCR-Produkt wurde anschließend in den Zielstamm MC4100 transformiert, der das Helferplasmid pKD46 trug. pKD46 kodiert für die Red-Rekombinase des Phagen λ . Die Rekombinase vermittelt über die Homologiebereiche des PCR-Produkts den Austausch des *dcuB* Gens gegen die Chloramphenicol-Resistenzkassette (Abb. 11 B). In dem so erhaltenen Stamm IMW497 ist das 1,3 kb große *dcuB* Gen durch das 1,1 kb große *cam^R* Gen ausgetauscht, wobei das Gen für die Antibiotika-Resistenz in umgekehrter Orientierung zum ursprünglichen *dcuB* Gen liegt. Der Stamm zeichnet sich durch eine neu erworbene Chloramphenicol-Resistenz aus (Abb. 11C). Der erfolgreiche Austausch wurde mittels PCR überprüft.

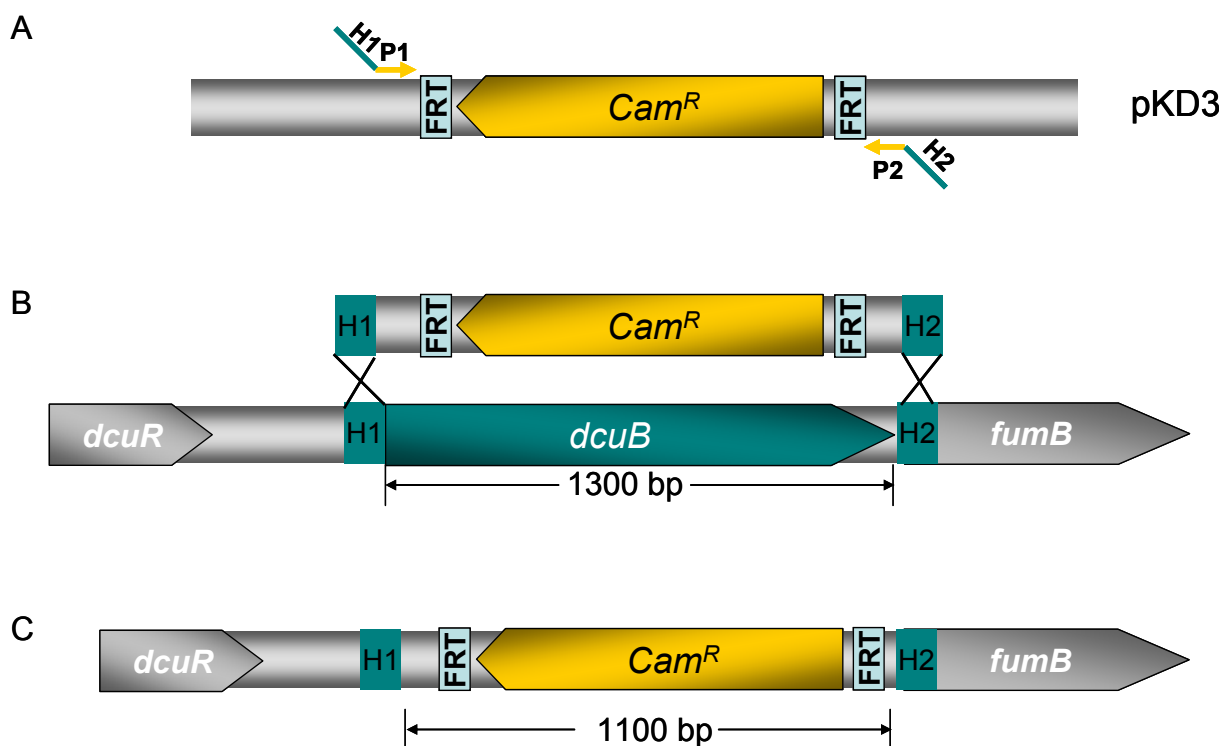


Abb. 11: Geninaktivierung von *dcuB* mit der Methode nach Datsenko & Wanner (2000). A) Mithilfe der Deletionsprimer *dcuB*-H1-P1 und *dcuB*-H2-P2 wurde die Chloramphenicol-Resistenzkassette vom Plasmid pKD3 amplifiziert. Über homologe Rekombination mit den Homologiebereichen H1 und H2 auf dem Genom (B) erfolgte der Austausch des *dcuB* Gens gegen die Resistenzkassette, die in umgekehrter Orientierung zum *dcuB* Gen inseriert ist (C).

Die Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde mittels der FLP Rekombinase wieder eliminiert. Diese von dem Helferplasmid pCP20 kodierte Rekombinase rekombiniert die beiden FRT-Sequenzen, die bei der Amplifikation der Resistenzkassette von pKD3 mit

eingeführt wurden. Dies führt zum Verlust des dazwischen liegenden Genbereichs und damit der Resistenzkassette (Abb. 12). Der so konstruierte Stamm IMW502 besitzt statt des ursprünglichen 1,3 kb langen *dcuB* Gens nur noch eine 84 bp lange Sequenz, die noch eine FRT-Sequenz enthält, und weist keine zusätzliche Antibiotika-Resistenz mehr auf. Die Deletion der Resistenzkassette wurde mittels PCR überprüft.

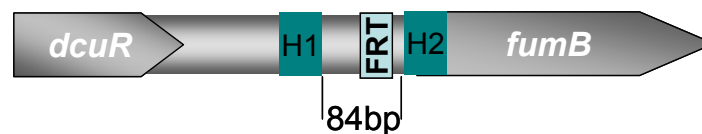


Abb. 12: Deletion der Chloramphenicol-Resistenzkassette. Über eine Rekombination der FRT-Sequenzen wurde die Resistenzkassette aus dem Genom wieder deletiert.

Der Effekt der *dcuB*-Deletion auf die Genexpression wurde nach Lysogenisierung mit dem rekombinanten Phagen λ (*dcuB'*-*lacZ*) überprüft. Der Stamm (IMW503) trägt neben der Deletion im *dcuB* Gen zusätzlich eine *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion im Genom. Die Expression der Reporterfusion dient im Folgenden als Maß für die Aktivität des DcuSR-Systems.

Nach anaerober Zucht mit Glycerin und DMSO ist die Expression von *dcuB* im neu konstruierten Stamm IMW503 schon in Abwesenheit des Induktors Fumarat erhöht. Wie in der Insertionsmutante IMW370 lässt sich die Expression auch durch Zugabe von Fumarat nicht weiter stimulieren. Sowohl die Inaktivierung von *dcuB* durch Insertion einer Resistenzkassette als auch die Deletion des kompletten Gens führen also zur Aktivierung der *dcuB* Genexpression.

Die beobachteten Effekte der Inaktivierung von *dcuB* auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ* wurden durch eine Komplementation mit dem Plasmid pMW228 überprüft (Tab. 7). Das low-copy Plasmid enthält das komplette *dcuB* Gen inklusive des eigenen Promotors (Kleefeld, 2002). Die Expression von *dcuB'*-*lacZ* in der *dcuB* Mutante IMW503 sank nach Komplementation auf eine Expression im Wildtypniveau. Das Kontrollplasmid ohne *dcuB* zeigte diesen Effekt nicht.

Tab. 7: Expression von *dcuB'*-*lacZ* im *dcuB*-Deletionsstamm und Komplementation von *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in M9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW237 (<i>wt</i>)	28	431
IMW503 (Δ <i>dcuB</i>)	436	237
IMW503 pMW228 (<i>dcuB</i> ⁺)	20	348
IMW503 pME6010 (<i>dcuB</i> ⁻)	660	560
IMW503 pMW281 (<i>dcuB</i> ⁺)	7	52

Die Aktivitäten zeigen, dass die erhöhte Expression von *dcuB'*-*lacZ* in der *dcuB* Mutante tatsächlich auf der Inaktivierung des *dcuB* Gens beruhte. Durch Zusatz von Fumarat kann in diesem Stamm die Expression wieder um Faktor 17 stimuliert werden.

Das Plasmid pMW281 trägt das gesamte *dcuB* Gen mit Promotor, unterscheidet sich von dem Plasmid pMW228 jedoch in der Plasmid-kodierten Antibiotika-Resistenz sowie dem Replikationsursprung (Abb. 10). Die Kopienzahl pro Zelle liegt damit vier- bis fünfmal höher als bei dem Plasmid pMW228. Komplementation mit dem Plasmid pMW281 führte ebenfalls zum Rückgang der Expression von *dcuB'*-*lacZ* und ihrer Fumaratsensitivität (Tab. 7). Die Expression ist jedoch insgesamt niedriger als in der mit pMW228 komplementierten *dcuB* Mutante. Die höhere Kopienzahl pro Zelle und die damit vermutlich höhere Anzahl von DcuB-Proteinen scheint damit einen negativen Effekt auf die Expression der Reporter-genfusion zu haben. Beide Plasmide waren jedoch zur Komplementation geeignet.

Diese Induktion, die durch die *dcuB* Mutation verursacht wird, ist von der Funktion des Zweikomponentensystems DcuSR abhängig. Die β-Galactosidaseaktivitäten des komplementierten Stamms und der *dcuS dcuB* Doppelmutante sind in Tab. 8 dargestellt. In der *dcuS dcuB* Doppelmutante war die Expression von *dcuB'*-*lacZ* niedrig und wurde im Gegensatz zum Wildtyp nicht durch Fumarat induziert. Die durch die *dcuB* Mutation verursachte Induktion findet man also nur in einem *dcuS*-positiven Hintergrund, da die Inaktivierung von *dcuS* den Effekt von *dcuB* aufhebt und eine Induktion durch Fumarat nicht mehr möglich ist.

Tab. 8: Expression von *dcuB'*-*lacZ* im *dcuB*-Deletionsstamm und Komplementation von *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in M9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW237 (<i>wt</i>)	28	431
IMW503 (Δ <i>dcuB</i>)	436	237
IMW535 (<i>dcuS</i>)	4	3

Anaerobes Wachstum und Transport in *dcu* Mehrfachmutanten

Der Transport von C₄-Dicarboxylaten wird unter anaeroben Bedingungen durch die sekundären Carrier DcuA, DcuB und DcuC katalysiert (Engel *et al.*, 1992, 1994; Golby *et al.*, 1998; Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996). Jeder dieser drei Carrier kann grundsätzlich sowohl die Aufnahme, den Gegentausch und den Efflux von C₄-Dicarboxylaten katalysieren. Um den Effekt der neu konstruierten *dcuB* Deletionsmutante auf das anaerobe Wachstum mit Fumarat untersuchen zu können, wurde eine *dcu* Dreifachmutante hergestellt, in der neben dem *dcuB* Gen auch *dcuA* und *dcuC* ausgeschaltet sind. Mittels P1-Transduktion wurde zunächst die inaktive Form des *dcuA* Gens (*dcuA*::*Spc*^R) in den Stamm IMW503 übertragen. Die *dcuA dcuB* Doppelmutante IMW504 wurde anschließend mit einem P1-Lysat transduziert, das die inaktive Form des *dcuC* Gens enthielt (*dcuC*::*Cam*^R). Der neu konstruierte Stamm IMW505 besitzt neben der *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion Defekte in allen drei Dcu-Carriern.

Eine Inaktivierung von allen drei Carriern führt bei der *dcuA dcuB dcuC* Dreifachmutante IMW327 zum Verlust der Aufnahmeaktivität. Der neu konstruierte Stamm wurde deshalb zunächst auf seine Fähigkeit zum anaeroben Wachstum untersucht. Mit Glycerin plus Fumarat konnte der Wildtypstamm AN387 gut wachsen (Abb. 13). Die Verdopplungszeit betrug 7,7 h. Die alleinige Inaktivierung des *dcuB* Gens im Stamm IMW503 beeinträchtigte die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum nicht ($t_d = 5,1$ h). Der Stamm erreichte eine höhere OD als der Wildtypstamm AN387, möglicherweise wegen des anderen genetischen Hintergrunds der Mutante. Wurden die beiden anderen Carrier DcuA und DcuC zusätzlich inaktiviert (IMW505), so führte dies zum Verlust des Wachstums auf Fumarat. Bei Komplementation mit dem *dcuB* Plasmid pMW228 wurde das anaerobe Wachstum auf Fumarat wiederhergestellt ($t_d = 7,9$ h, Abb. 13).

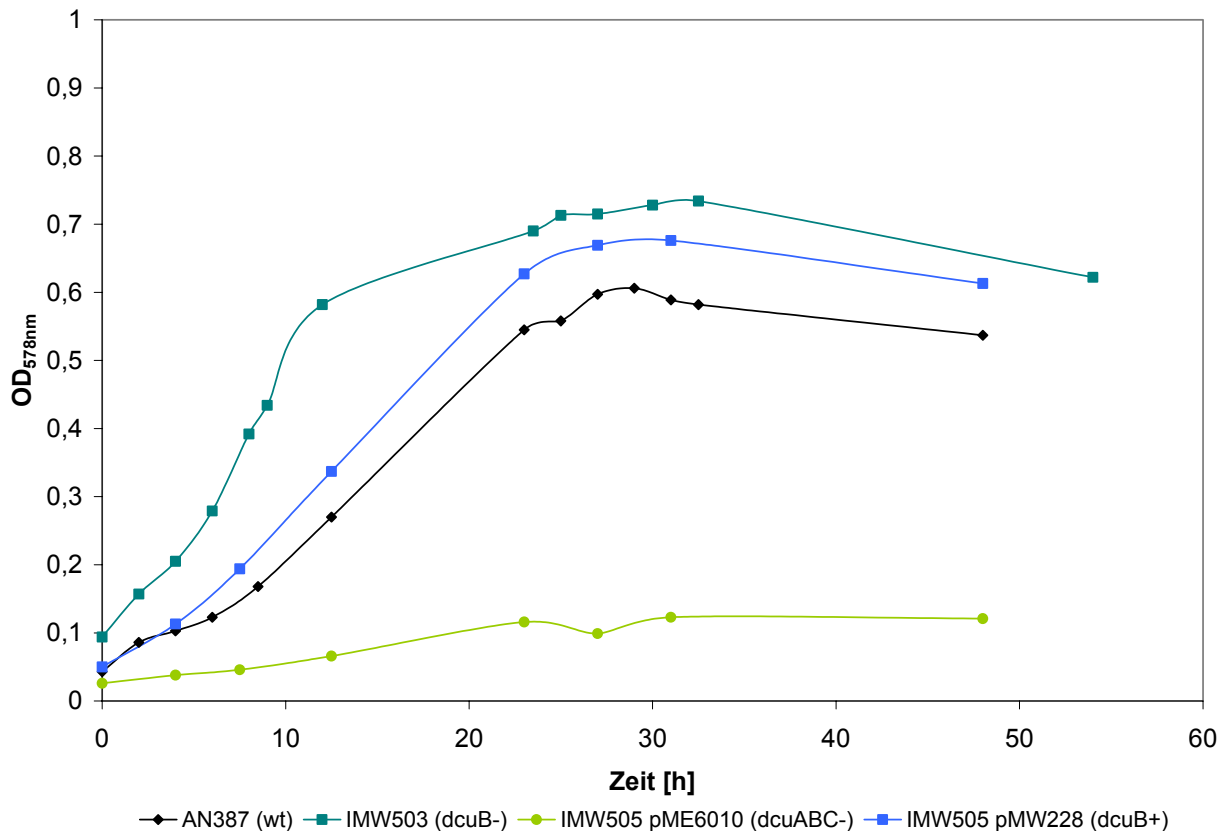


Abb. 13: Wachstum der neu konstruierten *dcuABC* Dreifachmutante IMW505 vor und nach Komplementation mit dem *dcuB* Plasmid pMW228 im Vergleich zum Wildtypstamm AN387 und der *dcuB* Mutante IMW503. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin plus 20 mM Fumarat.

Das Plasmid pMW228 komplementiert folglich nicht nur den Effekt der *dcuB* Mutante auf die Expression, sondern auch das anaerobe Wachstum auf Fumarat. Dies spricht dafür, dass das Plasmid pMW228 für funktionelles DcuB Protein kodiert, das in die Membran inseriert.

Die Aufnahme von [^{14}C]-Succinat in die Zellen wurde unter anaeroben Bedingungen getestet und dient als Maß für die Transportaktivität des DcuB Proteins. Zur Bestimmung der Transportaktivität wurden die Stämme anaerob mit Glycerin, DMSO und Fumarat gezüchtet. Unter diesen Bedingungen ist das *dcuB* Gen induziert. Von Zellen aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurde eine Zellsuspension in anaerobem Puffer hergestellt. Nach Energetisierung der Bakterien wurde die Anfangsgeschwindigkeit der [^{14}C]-Succinat-Aufnahme bestimmt (Tab. 9).

Tab. 9: Aufnahmeaktivitäten von [^{14}C]-Succinat in Wildtyp, *dcuB* Mutante und *dcuABC* Mutante vor und nach Komplementation. Die Zucht erfolgte anaerob in M9-Medium mit Glycerin plus DMSO und Fumarat.

Stamm (relevanter Genotyp)	[^{14}C]-Succinat-Aufnahme [$\mu\text{mol}/(\text{gTG min})$]
AN387 (wt)	3,5
IMW503 (ΔdcuB)	3,05
IMW505 pME6010 (<i>dcuA</i> ⁻ ΔdcuB <i>dcuC</i> ⁻)	0,91
IMW505 pMW228 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	3,45

Der Wildtyp AN387 nahm [^{14}C]-Succinat mit einer Aktivität von 3,5 $\mu\text{mol}/(\text{gTG min})$ auf. Die *dcuB* Mutante unterscheidet sich nur wenig in ihrer Aufnahmeaktivität vom Wildtyp. Eine zusätzliche Inaktivierung von *dcuA* und *dcuC* bewirkte einen starken Abfall der Transportaktivität auf eine Grundaktivität. Diese geringe Aktivität rührte möglicherweise von einem weiteren Carrier her. Die Aktivität war jedoch zu gering, um das anaerobe Wachstum der Dreifachmutante auf Fumarat zu ermöglichen (Abb. 13). Die Komplementation mit dem *dcuB* Plasmid pMW228 führte zu einem Anstieg der Transportaktivität auf das Niveau des Wildtyps AN387. Dies zeigt, dass der Fumarattransport durch *dcuB* komplementiert werden kann und dass DcuB für diesen Transport ausreichend ist.

Zur Komplementation der Regulationsfunktion wurde die Dreifachmutante IMW505 verwendet. Auch in dieser wurde die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* ohne Fumarat induziert und mit Fumarat nicht weiter stimuliert (Tab. 10). Die Komplementation der *dcu* Dreifachmutante mit Plasmid-kodierten *dcuB* führte wieder zu einer niedrigeren β -Galactosidaseaktivität in Abwesenheit von Fumarat, die durch Zugabe des Induktors stimuliert werden konnte. Dies zeigt, dass auch in diesem Stamm DcuB die DcuSR-abhängige Expression beeinflusst und dass auch DcuB vom Plasmid pMW228 diesen Effekt aufheben kann.

Tab. 10: Expression von *dcuB'*-*lacZ* in der neu konstruierten *dcuABC* Dreifachmutante vor und nach Komplementation von *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase (<i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i>) [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW237 (<i>wt</i>)	28	431
IMW505 (<i>dcuA</i> ⁻ Δ <i>dcuB</i> <i>dcuC</i> ⁻)	131	125
IMW505 pMW228 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	12	119

Einfluss von DcuB auf die Expression von *dctA* und *frdA*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob DcuB auch die Expression anderer DcuSR-regulierter Gene, wie z. B. der Fumaratreduktase, beeinflusst. Die Expression der Fumaratreduktase kann über die Aktivität einer *frdA'*-*lacZ* Reporterfusion bestimmt werden (Tab. 11). Die Expression von *frdA'*-*lacZ* wurde durch Zugabe von Fumarat nur um den Faktor 1,2 gesteigert. Die Inaktivierung des *dcuB* Gens bewirkte eine Induktion der *frdA* Expression um den Faktor 2. Wie schon bei der Expression von *dcuB* bewirkte eine Zugabe des Induktors Fumarat keine weitere Stimulierung der *frdA'*-*lacZ* Reporterfusion. Auch hier war die Expression nach Zucht mit Fumarat sogar niedriger als bei Zucht ohne Fumarat. Die Ergebnisse zeigen, dass DcuB auch die Expression weiterer Zielgene des DcuSR Zweikomponentensystems beeinflusst.

Tab. 11: Expression einer *frdA'*-*lacZ* Reporterfusion im Wildtyp und einer *dcuB* Mutante. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase (<i>frdA'</i> - <i>lacZ</i>) [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
MC4100λJ100 (<i>wt</i>)	440	536
IMW537 (<i>dcuB</i> ⁻)	998	449

Der C₄-Dicarboxylatcarrier DctA hat im aeroben Stoffwechsel einen ähnlichen Effekt wie DcuB auf die Expression DcuSR regulierter Gene (Davies *et al.*, 1999; Kleefeld, 2002). DctA ist in *E. coli* unter aeroben Bedingungen für die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten wie Succinat zuständig (Davies *et al.*, 1999). DctA katalysiert die Aufnahme von Succinat in die Zelle im Symport mit 2-3 H⁺ (Gutowski *et al.*, 1975). Die Expression von *dctA* ist teilweise vom Zweikomponentensystem DcuSR abhängig (Kleefeld, 2002). Es sollte bestimmt werden, ob neben DctA auch DcuB die Funktion von DcuSR unter aeroben Bedingungen beeinflusst. Die Aktivität von *dctA'*-*lacZ* wurde in Abhängigkeit von *dctA*, *dcuS* und *dcuB* untersucht (Tab. 12).

Tab. 12: Effekte der Inaktivierung von *dcuB* und *dctA* auf die Expression von *dctA'*-*lacZ*. Die Zucht erfolgte aerob in eM9-Medium mit Glycerin, Glycerin plus Succinat oder nur Succinat (jeweils 10 mM).

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase (<i>dctA'</i> - <i>lacZ</i>) [MU]		
	Glycerin	Glycerin + Succinat	Succinat
IMW385 (wt)	10	9	19
IMW386 (<i>dctA</i> ⁻)	42	39	114
IMW389 (<i>dcuS</i> ⁻)	5	5	7
IMW538 (<i>dctA</i> ⁻ <i>dcuS</i> ⁻)	7	nb	14
IMW539 (<i>dcuB</i> ⁻)	8	nb	18
IMW539 (<i>dcuB</i> ⁻)	12 ^a	nb	7 ^b

^a Glyc + DMSO, N₂

^b Glyc + DMSO + Fumarat, N₂

Die Expression von *dctA'*-*lacZ* war im Wildtyphintergrund bei Zucht auf Glycerin bzw. Glycerin und Succinat gleich stark, bei Zucht mit Succinat als einzigem Substrat wurde sie jedoch um Faktor 2 stimuliert. In der *dctA* Mutante war die Expression gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht, Wachstum mit Succinat als einzigem Substrat führte zu einer weiteren Steigerung. Die Induktion durch Succinat war damit mit der Induktion im Wildtyp vergleichbar. In der *dcuS* Mutante war die Expression von *dctA'*-*lacZ* sehr gering und wurde durch Succinat kaum stimuliert. Wird zusätzlich zu *dcuS* gleichzeitig *dctA* ausgeschaltet, steigt die Expression um den Faktor 2 gegenüber der *dcuS* Mutante an.

Dies zeigt, dass die Expression von *dctA'*-*lacZ* unter aeroben Bedingungen durch C₄-Dicarboxylate und DcuSR induziert wird, und dass DctA ähnlich wie DcuB diese Regulation beeinflusst. Die Stimulierung durch Inaktivierung von *dctA* geht in einem *dcuS*-negativen Hintergrund weitgehend verloren. Damit scheint DctA seinen Effekt im Wesentlichen über DcuS auszuüben.

Sowohl die Expression von *dcuB* als auch die von *dctA* sind also zum einen von DcuSR anhängig als auch von sich selbst. Das Gen *dctA* wird unter anaeroben Bedingungen schwach exprimiert (Davies *et al.*, 1999). Es wurde deshalb getestet, ob DcuB unter diesen Bedingungen die Expression von *dctA* beeinflusst (Tab. 12). Die Expression von *dctA'*-*lacZ* in der *dcuB* Mutante unter aeroben Bedingungen unterschied sich nicht von der Expression im Wildtyp. Bei anaerober Zucht mit Glycerin und DMSO ohne Fumarat wurde die Expression von *dctA* in der *dcuB* Mutante um den Faktor 2 gegenüber dem Wildtyp stimuliert. Die Zugabe von Fumarat bewirkte keine weitere Stimulierung der *dctA* Expression. Die Expression war sogar etwas niedriger als die ohne Fumarat. Somit scheint der anaerobe C₄-Dicarboxylatcarrier DcuB unter anaeroben Bedingungen einen Einfluss auf die Expression von *dctA* zu besitzen, jedoch nicht unter aeroben Bedingungen.

Einfluss von transportierbaren und nicht transportierbaren Effektoren auf die Expression von *dcuB*

Die Sensor kinase DcuS erkennt über ihre periplasmatische Domäne C₄-Dicarboxylate und stimuliert dann die Expression von *dcuB* (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Kneuper *et al.*, 2005). Die Expression des *dcuB* Gens wird dabei außer durch Fumarat auch durch verschiedene andere Effektoren induziert, von denen nicht alle von dem DcuB Carrier transportiert werden können (Bock, 2004). Bei Nitropropionat handelt es sich um einen nicht physiologischen Induktor von DcuSR. Es entspricht in seiner Struktur Succinat, wobei eine Carboxylgruppe durch eine Nitrogruppe ersetzt wurde. Ob Nitropropionat von DcuB transportiert werden kann, wurde bislang noch nicht untersucht. Das Tricarboxylat Citrat ist ebenfalls ein guter Induktor der DcuSR-abhängigen Genexpression, der Transport von Citrat erfolgt jedoch durch den Carrier CitT (Pos *et al.*, 1998). Auch D-Tartrat, das vermutlich durch die Dcu-Carrier transportiert wird (Kim, unveröffentlicht), wird durch die Sensor kinase DcuS erkannt. Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich die Expression von *dcuB'*-*lacZ* in einer *dcuB* Mutante in Anwesenheit solcher Effektoren verändert.

Die Expression der *dcuB'*-*lacZ* Reporter genfusion im Wildtyp wurde durch die getesteten Effektoren stimuliert (Tab. 13). Die Expression lag für Fumarat um den Faktor 15,

für Nitropropionat um den Faktor 17 und für D-Tartrat sogar um den Faktor 22 höher als nach Zucht ohne Effektor. Citrat stimulierte die Expression im Wildtyp am geringsten, die gemessenen Aktivitäten waren 6-mal höher als ohne Effektor. In der *dcuB* Mutante war die Expression nicht von der Anwesenheit der getesteten Effektoren beeinflusst. Die durch die *dcuB* Mutation verursachte Induktion blieb auch nach Zucht mit Nitropropionat, Citrat und D-Tartrat erhalten. Keiner der getesteten Effektoren bewirkte eine zusätzliche Stimulierung der *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion in der *dcuB* Mutante.

Tab. 13: Einfluss der *dcuB* Inaktivierung in Anwesenheit von verschiedenen Effektoren auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von 20 mM Effektor (bzw. 5 mM Nitropropionat).

Stamm (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase (<i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i>) [MU]				
	ohne Effektor	Fumarat	Nitro- propionat	Citrat	D-Tartrat
IMW237 (wt)	28	431	464*	173*	616*
IMW503 ($\Delta dcuB$)	436	237	447	342	593

*Werte Diplomarbeit V. Bock

Die Anwesenheit von Nitrat wird in *Escherichia coli* durch das Zweikomponentensystem NarXL erkannt (Nohno *et al.*, 1989). NarX, die membranständige Sensorkinase, phosphoryliert unter diesen Bedingungen den zugehörigen Responseregulator NarL. NarL reprimiert in Anwesenheit von Nitrat die Fumaratatmung (Stewart, 1993). Neben dem *frd*-Operon und dem *dcuB*-Gen wird auch die Expression von *dcuSR* durch NarL reprimiert (Goh *et al.*, 2005). Zusätzlich zur direkten Repression der Gene der Fumaratatmung durch Nitrat ist unter Nitrat-respiratorischen Bedingungen die Expression von *dcuSR* reprimiert. Es wurde getestet, ob die Inaktivierung von *dcuB* in Anwesenheit von Nitrat weiterhin einen Effekt hat.

In Anwesenheit von Nitrat war die Expression der *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion sowohl im Wildtyp als auch in der *dcuB* Mutante vollständig reprimiert (Tab. 14). Eine Inaktivierung des Carriers hat unter diesen Bedingungen keinen aktivierenden Einfluss auf die Genexpression. Offensichtlich ist der induzierende Effekt der *dcuB* Deletion durch die Nitratrepression unwirksam geworden.

Tab. 14: Expression von *dcuB'*-*lacZ* in einer *dcuB* Mutante in Anwesenheit von Nitrat. Die Zucht erfolgte anaerob in M9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat bzw. Nitrat.

Stamm (rel. Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität[MU]		
	ohne	+ Fumarat	+ Nitrat
IMW237 (wt)	28	431	4
IMW503 (<i>ΔdcuB</i>)	436	237	4

4.2 Ungerichtete Mutagenese von *dcuB* mit Hydroxylamin Hydrochlorid

Eine Inaktivierung des *dcuB*-Gens führt bereits ohne Induktor zu einer Stimulierung der DcuSR-abhängigen Genexpression. Die Inaktivierung des Carriers ist aber immer auch mit dem Verlust der Transportfunktion von DcuB verbunden. Es ist deshalb nicht sichergestellt, dass die Wirkung auf DcuS nur eine sekundäre ist, d. h. infolge des Ausfalls der Transportfunktion zustande kommt. Prinzipiell kann durch Deletionsmutanten nicht geklärt werden, ob der regulatorische Effekt von DcuB auf DcuS eine direkte Folge des Ausfalls der Transportfunktion oder eine unabhängige, zusätzliche Leistung von DcuB ist.

Zur Klärung dieser Frage sollten Punktmutanten von DcuB gewonnen werden, die den regulatorischen Effekt auf das DcuSR-System verloren haben, aber noch transportaktiv sind. Da über die Art der Interaktion und die verantwortlichen Aminosäuren nichts bekannt ist, gab es keine Möglichkeit einer gezielten Mutagenese. Zu diesem Zweck wurde *dcuB* mittels ungerichteter Mutagenese mit Hydroxylamin Hydrochlorid mutiert. Bei Hydroxylamin Hydrochlorid handelt es sich um ein chemisches Mutagen, das durch Reaktion mit der Base Cytosin diese so verändert, dass sie eine Fehlpaarung mit Adenin eingeht. Im nächsten Replikationsschritt wird dann das ursprüngliche Cytosin durch Thymin ersetzt. Dies führt zu einer Transition und einen Austausch der Basenpaarung Cytosin/Guanidin zu Thymin/Adenin auf DNA-Ebene. Über ein Blau/Weiß-Screening auf X-Gal sollen auf diese Weise *dcuB*-Mutanten erhalten werden, die eine Fumarat-unabhängige Induktion von *dcuB'*-*lacZ* aufweisen. In einem zweiten Selektionsschritt wurden die Mutanten anaerob auf Fumarat gezüchtet um solche Mutanten zu selektionieren, die intakt in ihrer Transportfunktion sind.

Das Plasmid pMW228, das das *dcuB* Gen mit eigenem Promotor trägt, wurde mit Hydroxylamin mutiert und in kompetente Zellen des Stamms IMW505 (*dcuABC* λ (*dcuB'*-

lacZ) transformiert. Die Selektion der gewünschten Mutanten erfolgte auf M9-Minimalagarplatten mit Glycerin, DMSO und X-Gal, aber ohne Fumarat. Induzierende Punktmutanten von *dcuB* mit einer erhöhten Expression der *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion sollten auf solchen Platten blau erscheinen, nicht-induzierendes bzw. nicht mutiertes *dcuB* sollte zum Wachstum von weißen Kolonien führen. Da es sich bei blauen Kolonien einerseits um mutiertes, aber aktives DcuB, das aber die Expression stimuliert und andererseits um inaktives DcuB handeln könnte, wurde überprüft, ob diese Kolonien noch transportaktiv waren. Hierzu wurden die blauen Klone auf die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum auf Fumarat überprüft. Klone, die beide Kriterien erfüllten, wurden nach erneuter Überprüfung ihres Expressionsmusters mittels β -Galactosidase-Messungen durch Sequenzierung charakterisiert.

Durch die ungerichtete Mutagenese konnten zwei verschiedene Punktmutanten von *dcuB* identifiziert werden, die einerseits die Expression der *dcuB'*-*lacZ* Reporterfusion in Abwesenheit von Fumarat induzieren und andererseits noch transportaktiv sind. In einer Mutante führte der Austausch eines Nukleotids auf DNA-Ebene zur Substitution der polaren Aminosäure Threonin an der Stelle 394 durch ein unpolares Isoleucin. Die zweite Mutante zeigte an Stelle 398 der Aminosäuresequenz einen Austausch von Aspartat gegen Asparagin, der ebenfalls durch ein einzelnes mutiertes Nukleotid verursacht wurde. Die Mutanten wurden in drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Die Punktmutation Thr394 gegen Isoleucin konnte viermal identifiziert werden, Asp398 gegen Asparagin einmal.

Über die Lage der beiden Mutationen in der Sekundärstruktur von DcuB kann mangels experimenteller Daten keine eindeutige Aussage gemacht werden. Für DcuA, das eine 36%ige Identität zu DcuB aufweist, wurde die Lage der Transmembranhelices mittels *blaM*-Fusionen bestimmt (Golby *et al.*, 1998). Hierzu wurde C-terminal verkürztes DcuA mit einem β -Lactamase-Protein fusioniert, dem das N-terminale Signalpeptid fehlt. Über Reportergruppenuntersuchungen wurde die Lage der Transmembranhelices vorgeschlagen. Das Topologiemodell schlägt für DcuA 10 Transmembranhelices mit einer großen cytoplasmatischen Schleife zwischen Helix 5 und 6 vor. N- und C-Terminus des Transporters befinden sich nach diesem Modell im Periplasma. Ein aufgrund der Ähnlichkeit zu DcuA abgeleitetes Topologiemodell schlägt für DcuB ebenfalls 10 Transmembranhelices vor (Abb. 14 A). Wie auch bei DcuA würden bei DcuB die ersten 5 Transmembranhelices von den nächsten durch eine lange cytoplasmatische Schleife von 91 Aminosäuren getrennt, wobei der N-Terminus und der lange C-Terminus im Periplasma lokalisiert sind. Nach dem

Topologiemodell A liegen Thr394 und Asp398 im Abstand von 4 Aminosäuren im C-terminalen, periplasmatischen Bereich von DcuB.

Eine Möglichkeit zur Vorhersage von Sekundärstrukturen in Membranproteinen ist die Berechnung mithilfe von Computerprogrammen. In diesem Fall wurde die Sekundärstruktur von DcuB mit dem TMHMM Server 2.0 berechnet (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM, Krogh *et al.*, 2001). Das Programm dient zur Vorhersage der Lage und Orientierung von α -Helices in Membranproteinen. Eine Analyse der Aminosäuresequenz mithilfe des TMHMM Programms ergab für DcuB 10 Transmembranhelices (Abb. 14 B). Der N-Terminus des Proteins liegt nach diesem Modell im Cytoplasma, der C-Terminus im Periplasma. Nach dem Topologiemodell B (TMHMM) sind beide Aminosäuren Teil der Transmembranhelix 10. Sie sind hier aufgrund ihres Abstands zueinander zur gleichen Seite der Helix orientiert. Die sogenannte „positive-inside“-Regel (von Heijne, 1986; von Heijne, 1989) wird nur von Modell A erfüllt. Sie besagt, dass bei integralen Membranproteinen die Anzahl der im Cytoplasma liegenden positiven Ladungen gegenüber der periplasmatisch lokalisierten überwiegt. Die Regel beruht auf statistischen Studien prokaryotischer Proteinstrukturen und wurde auch in Bezug auf mitochondriale und eukaryotische Membranproteine bestätigt.

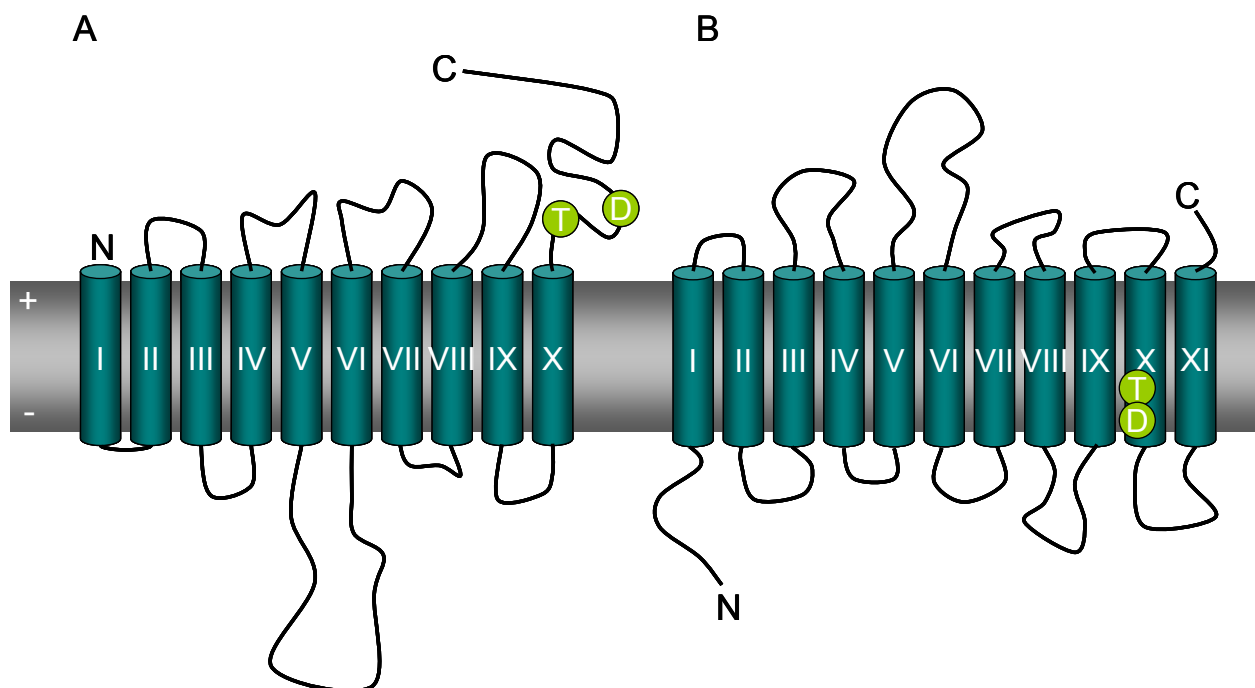


Abb. 14: Lage der ungerichteten Punktmutationen T394I und D398N in der Sekundärstruktur von DcuB. Nach dem Modell A befinden sich die Reste Threonin 394 und Aspartat 398 im periplasmatischen Raum. Dem Modell B zufolge sind beide Reste in der Transmembranhelix 10 lokalisiert.

Die beiden Punktmutationen wurden mittels gerichteter Mutagenese in ein *dcuB* Plasmid eingeführt, um Effekte von weiteren, unbekanntem Mutationen auf den jeweiligen Plasmiden auszuschließen. Die Komplementation des *dcuB* Deletionsstamms sowohl mit der *dcuB* Punktmutante T394I als auch der Punktmutante D398N führte zu einer Induktion der *dcuB'*-*lacZ* Expression in Abwesenheit von Fumarat (Tab. 15). Die Expression war unter diesen Bedingungen bereits maximal und ließ sich durch Fumarat nicht weiter stimulieren. Die beiden Punktmutanten sind damit in ihrem Effekt auf die Genexpression mit der *dcuB* Deletionsmutante vergleichbar.

Tab. 15: Effekt der durch ungerichtete Mutagenese mit Hydroxylamin eingeführten Aminosäureaustausche auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stamm (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW503 pMW228 (<i>pdcuB</i> ⁺)	27	251
IMW503 pMW396 (<i>pdcuB</i> T394I)	262	221
IMW503 pMW405 (<i>pdcuB</i> D398N)	372	227

Die *dcuABC* Dreifachmutante war nach Komplementation mit den punktmutierten Transportern wieder in der Lage auf Fumarat zu wachsen (Abb. 15). Beide *dcuB* Mutanten T394I und D398N zeigten in der komplementierten *dcuABC* Mutante ($t_d = 7,8$ h bzw. 6,3 h) ein Wachstumsverhalten, das dem mit Wildtyp-DcuB ($t_d = 7,1$ h) komplementierten Stamm gleich. Dies deutet darauf hin, dass die Punktmutationen zwar einen Effekt auf die Genexpression haben, die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum aber nicht beeinflussen.

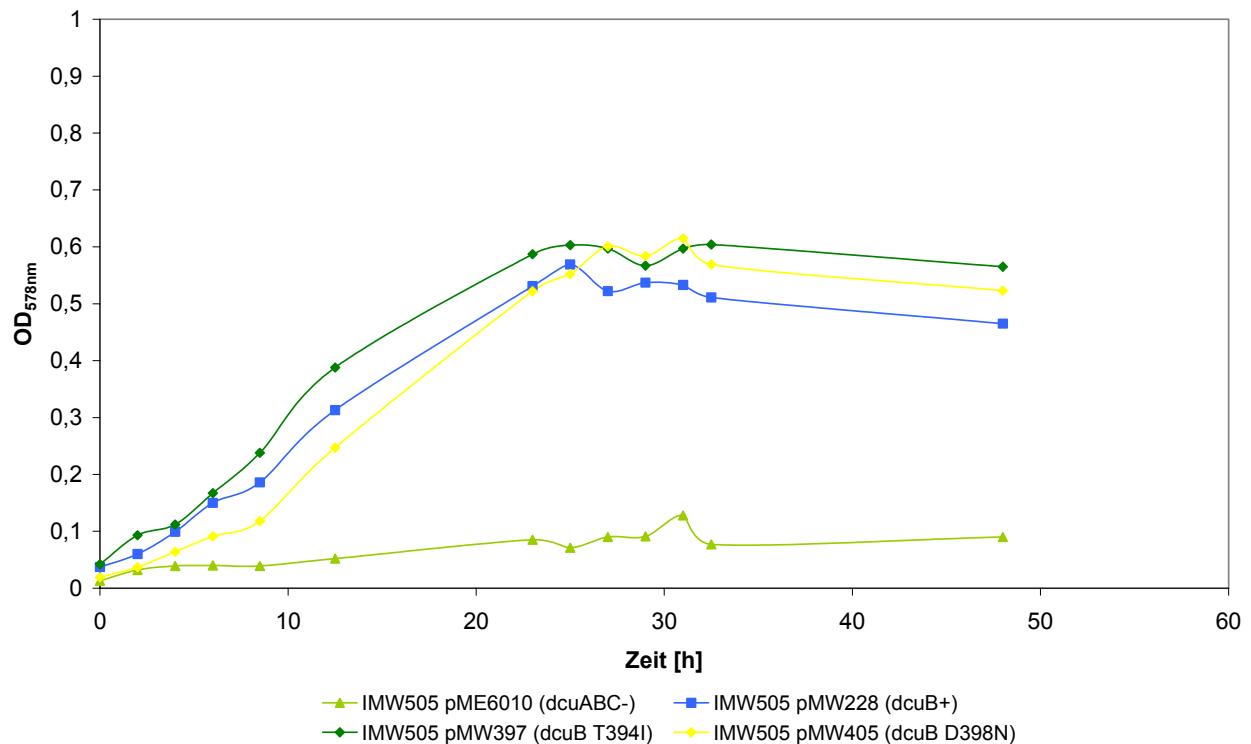


Abb. 15: Einfluss der durch ungerichtete Mutagenese in DcuB eingeführten Austausch T394I (pMW397) und D398N (pMW405) auf das anaerobe Wachstum auf Fumarat. Die Mutationen wurden auf Plasmiden eingeführt, die zur Komplementation der *dcuABC* Mutante IMW505 verwendet wurden. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus Fumarat.

Zusätzlich wurde die Transportaktivität der beiden Mutanten bestimmt (Tab. 16). In der *dcuABC* Mutante stieg die Aufnahmeaktivität von [^{14}C]-Succinat nach Komplementation mit Wildtyp-*dcuB* um den Faktor 3,7 an. Die Transportrate in den beiden *dcuB* Mutanten T398I und D398N lag sogar noch etwas höher als die des Wildtyp-Carriers. Dies zeigt, dass in den Punktmutationen die Transportaktivität des DcuB Proteins erhalten bleibt. Die Regulation der Genexpression und der Transport von C_4 -Dicarboxylaten scheinen deshalb zwei voneinander unabhängige Eigenschaften des DcuB Proteins zu sein.

Tab. 16: Aufnahmeaktivitäten von [¹⁴C]-Succinat in der *dcuABC* Mutante vor und nach Komplementation mit dem Wildtyp *dcuB* und punktmutiertem *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO plus Fumarat.

Stamm (relevanter Genotyp)	Aufnahme [¹⁴ C]-Succinat [μmol/gTG min]
IMW505 pME6010 (<i>dcuA</i> ⁻ Δ <i>dcuB</i> <i>dcuC</i>)	0,91
IMW505 pMW228 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁺ <i>dcuB</i> ⁺)	3,45
IMW505 pMW397 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁺ <i>dcuB</i> T394I)	3,91
IMW505 pMW405 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁺ <i>dcuB</i> D398N)	4,01

Charakterisierung von Thr394 durch gerichtete Mutagenese

Der Austausch von Thr394 gegen Isoleucin und von Asp398 gegen Asparagin führte zu einer Fumarat-unabhängigen Expression von *dcuB*. Die Aminosäure Threonin und ihre Funktion sollten durch gerichtete Mutagenese in andere Aminosäuren charakterisiert werden. Thr394 ist in einigen DcuB-Proteinen anderer Bakterien konserviert. Dazu zählt beispielsweise auch das Bakterium *Wolinella succinogenes*, das kein DcuSR-System besitzt. Andere DcuB-Proteine wie der Carrier von *Bacillus cereus* besitzen an entsprechender Stelle ein Asparagin, eine polare Aminosäure, die nicht phosphoryliert werden kann. Das DctA-Protein aus *E. coli*, das in seiner genregulatorischen Funktion mit DcuB vergleichbar ist, besitzt an entsprechender Stelle ein Serin. Auch hierbei handelt es sich um eine Aminosäure mit polarem Charakter, die ein Träger einer Phosphorylgruppe sein könnte. Thr394 wurde deshalb mittels gerichteter Mutagenese durch die Aminosäuren Asparagin, Serin und Alanin ersetzt (Tab. 17).

Der Austausch von Thr394 gegen einen Asparaginrest hatte keinen Effekt auf die Expression des Reportergens, die Expression von *dcuB* wurde erst durch Fumarat stimuliert (Faktor 8,4). Auch durch die Substitution von Thr durch Serin blieb die Fumarat-abhängige Stimulierbarkeit erhalten. In beiden Fällen wurde die polare Aminosäure Threonin durch andere, ebenfalls polare Aminosäuren ersetzt, Asparagin ist jedoch nicht mehr phosphorylierbar. Dies spricht dafür, dass für die Funktion des DcuB Proteins an der Stelle Thr394 eine polare, aber keine phosphorylierbare Aminosäure sitzen muss. Dies wird dadurch unterstützt, dass durch Substitution von Thr durch das unpolare Alanin die Expression ohne Fumarat erhöht war, durch Fumarat aber weiter (Faktor 3) stimuliert werden konnte. Die

Einführung der Aminosäure Alanin an Stelle 394 bewirkte damit eine geringere Stimulierung der Genexpression als das ebenfalls unpolare, aber größere Isoleucin. Möglicherweise ist also nicht nur die Polarität der Aminosäureseitenkette an Stelle 394 im DcuB Protein ausschlaggebend für seine genregulatorische Funktion, sondern auch deren Größe.

Tab. 17: Charakterisierung der Mutation von T394 in DcuB durch gezielte Aminosäureaustausche. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stamm (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW503 pMW228 (<i>pdcuB</i> ⁺)	27	251
IMW503 pMW396 (<i>pdcuB</i> T394I)	262	221
IMW503 pMW402 (<i>pdcuB</i> T394N)	33	278
IMW503 pMW403 (<i>pdcuB</i> T394S)	21	282
IMW503 pMW404 (<i>pdcuB</i> T394A)	87	263

Alle Aminosäureaustausche hatten keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das anaerobe Wachstum mit Fumarat. Die Punktmutanten mit den Austauschen T394S und T394A waren in ihrem Wachstumsverhalten mit dem Wildtyp und der *dcuB* Punktmutante T394I vergleichbar. Nur die Mutante *dcuB* T394N zeigte ein langsames Wachstumsverhalten, erreichte aber am Ende der Inkubationszeit die gleiche optische Dichte wie die anderen Stämme.

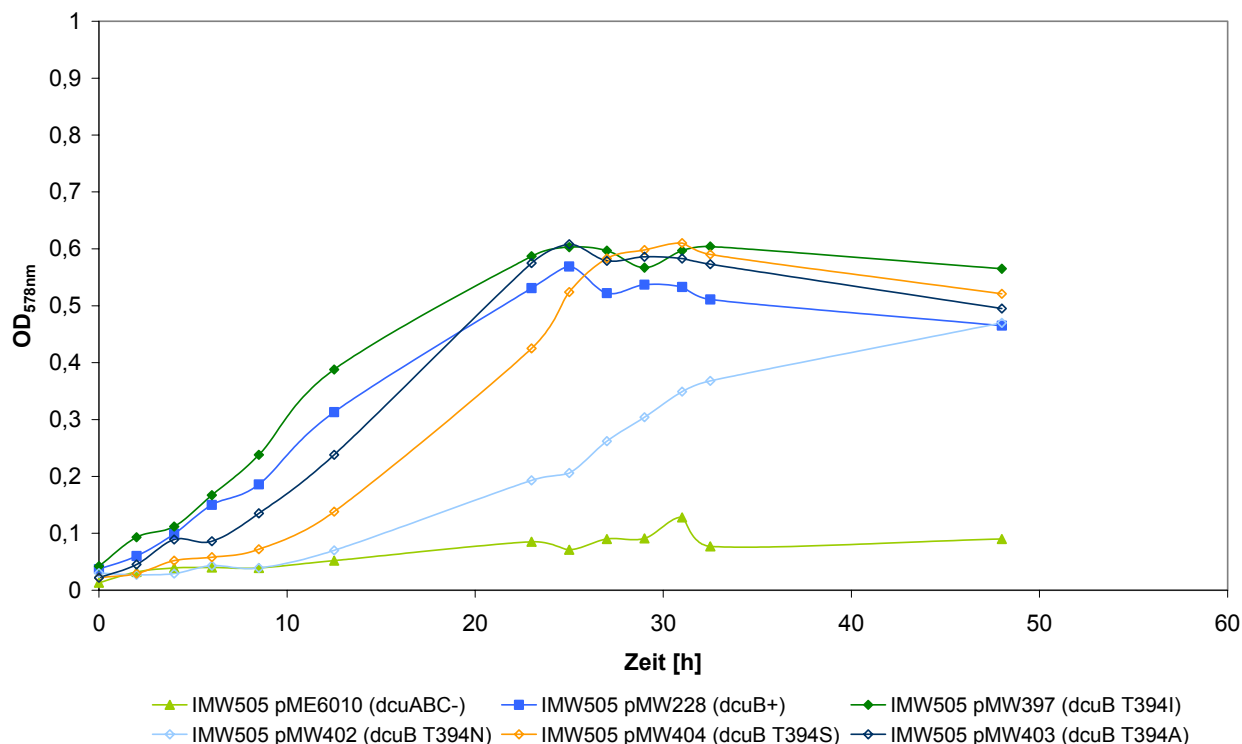


Abb. 16: Einfluss der Mutation in Thr394 auf das Wachstum. Die Aminosäure Thr394 wurde durch Isoleucin (pMW397), Asparagin (pMW402), Serin (pMW404) und Alanin (pMW403) mittels gerichteter Mutagenese ausgetauscht. Die mutierten Plasmide wurden zur Komplementation der *dcuABC* Mutante IMW505 verwendet. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus Fumarat.

Ein Vergleich der Transportaktivitäten zeigte, dass alle punktmutierten *dcuB*-Varianten C₄-Dicarboxylate transportieren konnten (Tab. 18). Die Aktivitäten lagen dabei im Bereich des Wildtyp-DcuBs bzw. der Threonin gegen Isoleucin substituierten Mutante. Auch die Mutante T394N, die ein verlangsamtes Wachstum auf Glycerin und Fumarat zeigte, war in der Succinat-Aufnahmeaktivität nicht beeinträchtigt. In der Mutante T394A war die Succinat-Aufnahme um den Faktor 1,3 niedriger als in der Mutante T394I. Diese geringere Aktivität beeinträchtigte aber scheinbar nicht das anaerobe Wachstum auf Fumarat. Insgesamt hatten die Substitutionen von Threonin keine Auswirkung auf die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum oder zur Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten. Die Aminosäure Threonin ist daher nicht für die Transportfunktion, aber für die regulatorische Funktion von DcuB essentiell.

Tab. 18: Aufnahmeaktivitäten von [14 C]-Succinat in der *dcuABC* Mutante vor und nach Komplementation mit verschiedenen Threonin 394 Mutanten von *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO plus von Fumarat.

Stamm (rel. Genotyp)	Aufnahme [14 C]-Succinat [μ mol/gTG min]
IMW505 pME6010 (<i>dcuA</i> ⁻ Δ <i>dcuB</i> <i>dcuC</i>)	0,91
IMW505 pMW228 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁺)	3,45
IMW505 pMW397 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> T394I)	3,91
IMW505 pMW402 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> T394N)	3,73
IMW505 pMW404 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> T394S)	3,83
IMW505 pMW403 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> T394A)	2,93

Einfluss von verkürzten DcuB-Proteinen auf die Genexpression

Verkürzungen des C-terminalen Bereichs von DcuB, der die Reste Thr394 und Asp398 umfasst, sollten zeigen, ob für die Funktionsweise von DcuB sowohl in der Genregulation als auch im Transport dieser Bereich eine wichtige Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurden zwei Stoppcodons in DcuB einführt. Der Austausch von Trp389 gegen ein Stoppcodon verkürzt das DcuB-Protein um 58 Aminosäuren, die Einführung des Stoppcodons an Stelle Thr409 um 38 Aminosäuren. Das Stoppcodon wird im ersten Fall vor den beiden Aminosäuren Thr394 und Asp398 eingeführt, im zweiten Fall erst dahinter. Diese Versionen von DcuB wurden auf ihren Einfluss auf die Genexpression und die Fähigkeit zum anaeroben Wachstum untersucht.

Die verkürzten Versionen von DcuB verursachen in beiden Fällen eine Induktion der Genexpression in Abwesenheit des Induktors (Tab. 19). Die Expression von *dcuB*'-*lacZ* ist sowohl mit der *dcuB* Mutante Y389Stopp als auch mit der Mutante T409Stopp ohne Fumarat bereits maximal und mit Induktor nicht weiter stimulierbar. Die verkürzten DcuB-Varianten zeigen damit die gleiche Induktion wie die *dcuB* Deletionsmutante.

Tab. 19: Einfluss von C-terminaler Verkürzung von DcuB (Derivate von pMW228) auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat (20mM)
IMW503 (Δ <i>dcuB</i>)	436	237
IMW503 pMW228 (<i>pdcuB</i> ⁺)	34	263
IMW503 pMW347 (<i>pdcuB</i> , mit Y389Stopp)	465	251
IMW503 pMW358 (<i>pdcuB</i> , mit T409Stopp)	320	215

Beide Mutanten konnten nicht mehr anaerob auf Fumarat und Glycerin wachsen (Abb. 17). Die Mutanten waren damit in ihrem Wachstumsverhalten mit der nicht komplementierten *dcuABC* Mutante identisch. Neben der Fähigkeit zum Wachstum auf Fumarat ging in den verkürzten *dcuB* Mutanten außerdem die Transportaktivität verloren. Die Succinataufnahmeaktivität ist auch in diesem Fall mit der nicht komplementierten *dcuABC* Mutante vergleichbar (Tab. 20).

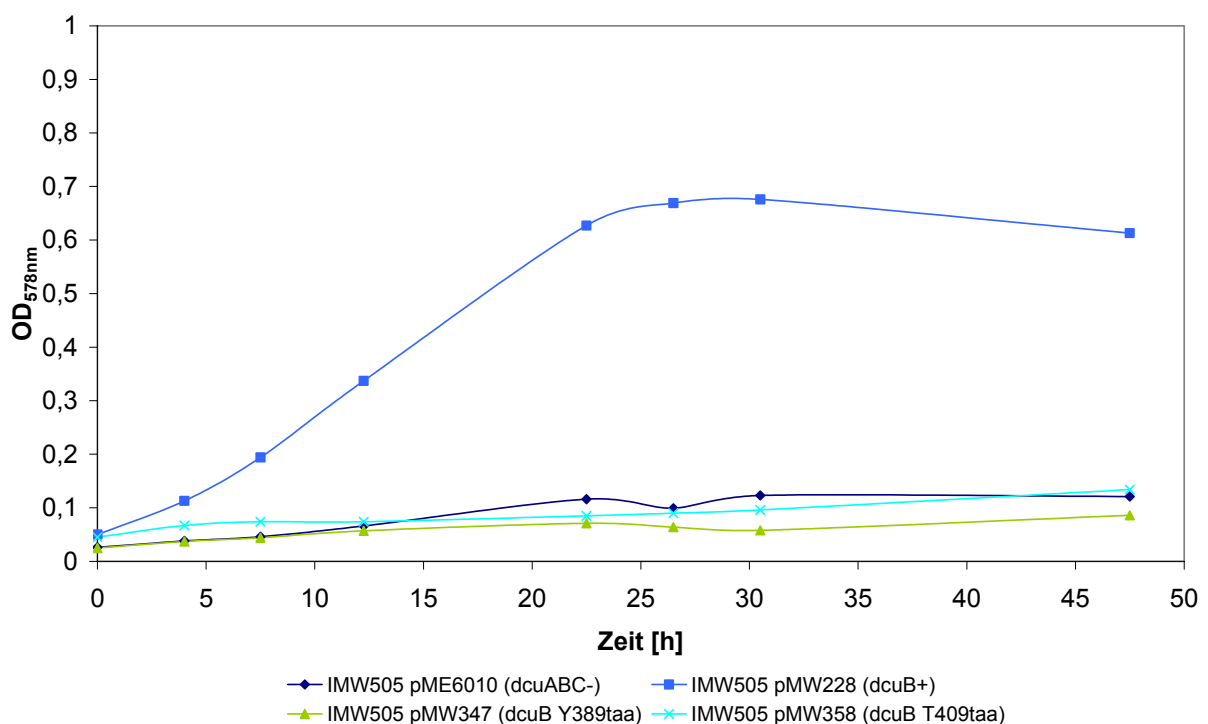


Abb. 17: Anaerobes Wachstum auf Fumarat der *dcuABC* Dreifachmutante nach Komplementation mit verkürzten Versionen von *dcuB*. Die Mutationen wurden auf Plasmiden in die *dcuABC* Mutante IMW505 eingeführt. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und Fumarat.

Tab. 20: Aufnahmeaktivitäten von [¹⁴C]-Succinat in der *dcuABC* Mutante vor und nach Komplementation mit verkürztem *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO plus Fumarat.

Stamm (relevanter Genotyp)	Aufnahme [¹⁴ C]-Succinat [μmol/gTG min]
IMW505 pME6010 (<i>dcuA</i> ⁻ Δ <i>dcuB</i> <i>dcuC</i>)	0,91
IMW505 pMW228 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁺ <i>dcuB</i> ⁺)	3,45
IMW505 pMW347 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> Y389Stopp)	0,57
IMW505 pMW358 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻ <i>dcuB</i> T409Stopp)	0,47

Die Ergebnisse deuten darauf, dass die verkürzten *dcuB* Mutanten zur Bildung eines inaktiven DcuB-Proteins führten, das denaturiert ist oder nicht in die Membran eingebaut wird. Die verkürzten Mutanten entsprachen deshalb in ihrem Phänotyp der *dcuB* Deletionsmutante, die ebenfalls die Expression DcuSR-regulierter Gene stimuliert, aber nicht mehr transportaktiv ist.

4.3 Gerichtete Mutagenese konservierter Aminosäuren in DcuB

DcuB enthält eine Reihe konservierter, positiv geladener Aminosäuren (Histidine, Arginine und Lysine), die für die Bindung des Substrates, einem Dianion, wichtig sein könnten (Engel *et al.*, 1994). Für die periplasmatische Domäne von DcuS wurde gezeigt, dass ein Histidin und zwei Arginine essentiell für die Substraterkennung sind (Kneuper *et al.*, 2005). Ähnliche Reste könnten auch in DcuB eine Wechselwirkung mit Fumarat und Succinat eingehen. Das folgende Alignment zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von DcuB-Proteinen aus *E. coli*, *Wolinella succinogenes*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella cholerae-suis* (*Salmonella enterica*), *Salmonella paratyphi-a*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* und *Campylobacter jejuni* (Abb. 18). Mutationen, in rot markiert, wurden bevorzugt in flexible, lösliche Bereiche des Transporters eingeführt.

DCUB_ECOLI	*	20	*	40	*	60	*		
DCUB_ECOLI	:	-----	MLFTIQLIIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPKPPVDVMLVIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_WOLSU	:	-----	MEFFLQLLVVLGCLFYGAKKGGIALGLLGGIGLVILVIFGFHLPQPKAPVDVMLTIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_ERWCT	:	-----	MDFIIQLVIVLILICLFYGARKGGIALGLLGGVGLVILVVFIFKLPQPKPPVDVMLVIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_SALCH	:	-----	MLFSIQLLIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPKPPVDVMLVIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_SALPA	:	-----	MLFSIQLLIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPKPPVDVMLVIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_SALTI	:	-----	MLFSIQLLIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPKPPVDVMLVIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_SALTY	:	-----	MLFSIQLLIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPKPPVDVMLVIIAVVAASAT	:	64				
DCUB_CAMJE	:	-----	MDFLTSLSEAGQFAIQIIIVLILICLFYGAKKGGIALGLLGGIGILMLVFAFHKPKGPAIDVMLTILAVVVAASAT	:	74				
DCUB_ECOLI	:	80	*	100	*	120	*	140	
DCUB_ECOLI	:	LQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYTILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSIG	:	138					
DCUB_WOLSU	:	LQASGGLDVMLQIAEKILRRNPKYVTILAPLVTMILTMLCGTGHVVYTIMP IYDIAIKNNIRPERPMAAASIS	:	138					
DCUB_ERWCT	:	LQASGGLDVMLQIAERMLRRNPKYVSIAPFVTCILTILCGTGHVVYTILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSIG	:	138					
DCUB_SALCH	:	LQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYTILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSIG	:	138					
DCUB_SALPA	:	LQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYTILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSIG	:	138					
DCUB_SALTI	:	LQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYTILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSIG	:	138					
DCUB_SALTY	:	LQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYTILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSIG	:	138					
DCUB_CAMJE	:	LQASGGLDVMLQIAERILRRNPKFLTILAPFVTCFLTILCGTGHVVYTIMP IYDIAIKNGIRPERPMAAASIS	:	148					
DCUB_ECOLI	:	*	160	*	180	*	200	*	220
DCUB_ECOLI	:	AQMGI IASPVSVAVSVLAVMLGNVTFD-GRHLEFLDLLAITIPSTLLGILAGIFSWFRG-KDLDKDEEFQKFI	:	210					
DCUB_WOLSU	:	SQMGICASPVSVAIVSFVALLAKSHLANGAEISLITVLLQITIPCTIAGVLAIGIFSWFRG-KDLDKDPDFQAFI	:	211					
DCUB_ERWCT	:	AQMGI IASPVSVAVSVLAVMLANFTFQ-GKHLGFLDLSITIPSTLLGILAGIFSWFRG-KDLDKDPDFQKFI	:	210					
DCUB_SALCH	:	AQMGI IASPVSVAVSVLAVMLGNVTFD-GKHLGFLDLSITIPSTLLGILAGIFSWFRG-KDLDKDEAFQKFI	:	210					
DCUB_SALPA	:	AQMGI IASPVSVAVSVLAVMLGNVTFD-GKHLGFLDLSITIPSTLLGILAGIFSWFRG-KDLDKDEAFQKFI	:	210					
DCUB_SALTI	:	AQMGI IASPVSVAVSVLAVMLGNVTFD-GKHLGFLDLSITIPSTLLGILAGIFSWFRG-KDLDKDEAFQKFI	:	210					
DCUB_SALTY	:	AQMGI IASPVSVAVSVLAVMLGNVTFD-GKHLGFLDLSITIPSTLLGILAGIFSWFRG-KDLDKDEAFQKFI	:	210					
DCUB_CAMJE	:	SQMGIIASPVSVAVSVLTALLNANHLKLAGFDGYINLLQITIPSTLFGVLCIGIFSWFRG-KDLDKDEVFQEKL	:	221					
DCUB_ECOLI	:	*	240	*	260	*	280	*	
DCUB_ECOLI	:	SVPENREYVYGDATALLDCKLPKSNWLMWIFLGAIAVVALLGADSDLRPSFGG-----KPL	:	267					
DCUB_WOLSU	:	SNPENKQYVYGESATLLNQLPPTSQVWAMWIFLANIAVIALLGMPFELRPSFPDAKGV-----LKPM	:	273					
DCUB_ERWCT	:	ADPENKQYVYGDATALLDRKLPKSNWVAMWIFLATIAAVAVLGAVEELRPFVAG-----KPL	:	267					
DCUB_SALCH	:	SVPENRQYVYGDATALLDCKLPKSNWLMWIFLAAIAVVALLGADSDLRPTFGG-----KPL	:	267					
DCUB_SALPA	:	SVPENRQYVYGDATALLDCKLPKSNWLMWIFLAAIAVVALLGADSDLRPTFGG-----KPL	:	267					
DCUB_SALTI	:	SVPENRQYVYGDATALLDCKLPKSNWLMWIFLAAIAVVALLGADSDLRPTFGG-----KPL	:	267					
DCUB_SALTY	:	SVPENRQYVYGDATALLDCKLPKSNWLMWIFLAAIAVVALLGADSDLRPTFGG-----KPL	:	267					
DCUB_CAMJE	:	KDPEFKKYVYGDSKTLGLVLPKSNWVAMWIFLGAIALVALLGVDFLBNPNWQVVKNGIPQVDALGNPKMDVL	:	295					
DCUB_ECOLI	:	300	*	320	*	340	*	360	*
DCUB_ECOLI	:	SMVLVIQMFMLLTGALIIIIITKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP	:	341					
DCUB_WOLSU	:	NMVLTIQMFMLLAGALIVIFTKVDTSKISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETVFLAHLADMKASLGDDVVKQHP	:	347					
DCUB_ERWCT	:	SMVLVIQMFMLLSGALIIIIATKTNPSSISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHLEEKATLGSLVKYYP	:	341					
DCUB_SALCH	:	SMVLVIQMFMLLTGALIIIIITKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP	:	341					
DCUB_SALPA	:	SMVLVIQMFMLLTGALIIIIITKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP	:	341					
DCUB_SALTI	:	LMVLVIQMFMLLTGALIIIIITKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP	:	341					
DCUB_SALTY	:	SMVLVIQMFMLLTGALIIIIITKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP	:	341					
DCUB_CAMJE	:	SMVSVIQMFMLLAGSLIIIIFTKTDACKIGSNEIFKSGMIALVAVYGISWMDTMFAVHTPMKKAALGDIVKEHP	:	369					
DCUB_ECOLI	:	380	*	400	*	420	*	440	
DCUB_ECOLI	:	WAYAIVLLLVSQFVNSQAAALAAIIPVALAIGVDPAYIVASAPACYGYYILPTYPSDLAAIQFDRSGTTHIGRF	:	415					
DCUB_WOLSU	:	WTYALMLLLVSQFVNSQAAAVATMVVALGVGVEPGYILFAAACYGYYILPTYPSDLATIQFDRSGTTKIGKF	:	421					
DCUB_ERWCT	:	WAYAIVLLLVSQFVNSQAAALAAIIPVALAIGVDPAYIVASAPACYGYYILPTYPSDLAAIQFDRSGTTKIGRF	:	415					
DCUB_SALCH	:	WAYAIVLLLVSQFVNSQAAALAAIIPVALAIGVDPAYIVASAPACYGYYILPTYPSDLAAIQFDRSGTTRIGRF	:	415					
DCUB_SALPA	:	WAYAIVLLLVSQFVNSQAAALAAIIPVALAIGVDPAYIVASAPACYGYYILPTYPSDLAAIQFDRSGTTRIGRF	:	415					
DCUB_SALTI	:	WAYAIVLLLVSQFVNSQAAALAAIIPVALAIGVDPAYIVASAPACYGYYILPTYPSDLAAIQFDRSGTTRIGRF	:	415					
DCUB_SALTY	:	WAYAIVLLLVSQFVNSQAAALAAIIPVALAIGVDPAYIVASAPACYGYYILPTYPSDLAAIQFDRSGTTRIGRF	:	415					
DCUB_CAMJE	:	WTYAVMLLLISQFVNSQAAAI SAFVPLALGIGVEPGVIVAFAAACYGYYILPTYPSDLATIQFDRSGTTHIGKF	:	443					
DCUB_ECOLI	:	*	460	*	480	*	500		
DCUB_ECOLI	:	VINH\$FILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL-----	:	446					
DCUB_WOLSU	:	VINH\$FILPGLIGVGTSCVFGFILASVMGYV-----	:	452					
DCUB_ERWCT	:	VINH\$FIFPGLIGVSTSCVFGWVFAAMYGFL-----	:	446					
DCUB_SALCH	:	VINH\$FILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL-----	:	446					
DCUB_SALPA	:	IINH\$FILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL-----	:	446					
DCUB_SALTI	:	VINH\$FILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL-----	:	446					
DCUB_SALTY	:	VINH\$FILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL-----	:	446					
DCUB_CAMJE	:	VINH\$FILPGLIGVITSCIAGYFIAMAAGYL-----	:	474					

Abb. 18: Sequenzvergleich von DcuB aus *E. coli*, *W. succinogenes*, *E. carotovora*, *S. cholerae-suis*, *S. paratyphi-a*, *S. typhi*, *S. typhimurium* und *C. jejuni*. Konservierte, positiv geladene Reste sind farbig markiert. In Rot markiert sind die Aminosäurenreste, die mittels gerichteter Mutagenese ausgetauscht wurden: H108, R127, R130A, R196, K198, K202, K289, R414, H419.

Die Lage der mutierten Aminosäuren in den beiden vorgestellten Topologiemodellen ist in Abb. 19 dargestellt. Die Punktmutationen befinden sich in beiden Sekundärstrukturmodellen größtenteils in löslichen Domänen von DcuB. In beiden Modellen liegt jeweils eine

Aminosäure, Lysin 289 in Modell A und Histidin 108 in Modell B, innerhalb einer Transmembranhelix. Austausche in den flexiblen, löslichen Bereichen des Transporters sollten dessen Struktur nur wenig verändern und die Funktionalität des Proteins erhalten.

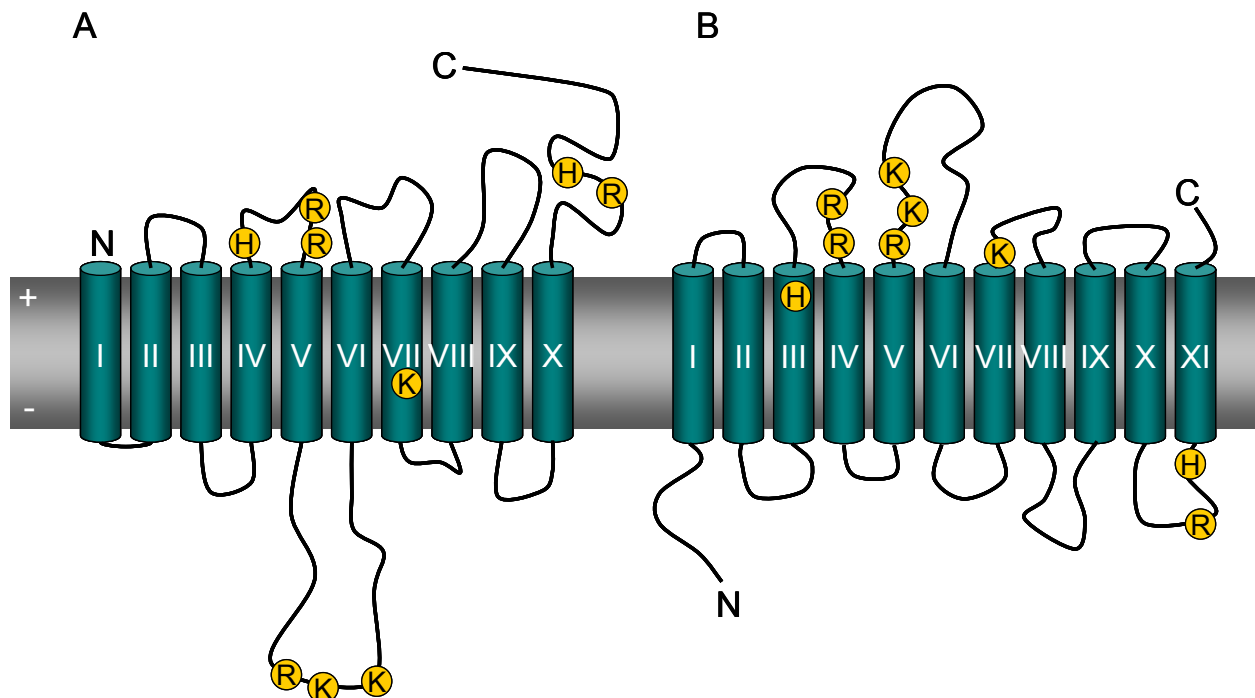


Abb. 19: Mögliche Lage der mutierten Aminosäuren in der Sekundärstruktur von DcuB. Die Aminosäuren, die mittels gerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt wurden, sind mit gelben Kreisen markiert. Dies sind in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz: Histidin 108, Arginin 127, 130 und 196, Lysin 198, 202 und 289, sowie Arginin 414 und Histidin 419. H: Histidin, R: Arginin, K: Lysin.

Die Aminosäuren wurden einzeln mittels Mutagenese auf dem Plasmid pMW281 gegen Alanin ausgetauscht. In mehreren aufeinander folgenden Mutagenesen wurden die Mehrfachmutationen H108A R130A und H108A R127A R130A hergestellt. Die Plasmide wurden nach erfolgreicher Mutagenese in den *dcuB* Deletionsstamm IMW503 transformiert und die Expression von *dcuB'*-*lacZ* in Abhängigkeit der punktmutierten Versionen von DcuB bestimmt (Tab. 21).

Die Expression von *dcuB'*-*lacZ* war in der *dcuB* Mutante nach Komplementation mit dem *dcuB* Plasmid pMW281 im Vergleich zum Wildtyp niedrig, konnte aber durch Fumarat wieder um den Faktor 7 stimuliert werden. Das Plasmid pMW281 konnte also den Defekt der Deletionsmutante komplementieren.

Alle Einzelaustausche der Histidin-, Arginin- und Lysin-Reste von DcuB bewirkten keine Änderung in der Expression von *dcuB*. Die Expression ohne Fumarat war mit allen

getesten Mutanten ohne Fumarat niedrig und wurde durch Fumarat um den Faktor 6 bis 12 stimuliert. Die Einzelmutanten entsprachen damit in ihrem Expressionsmuster Wildtyp-DcuB.

Tab. 21: Einfluss von Punktmutationen in DcuB (Derivate von pMW281) auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die *dcuB* Deletionsmutante wurde mit punktmutierten Plasmiden transformiert und die Expression nach anaerober Zucht in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat bestimmt.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW237 (wt)	28	431
IMW503 (Δ <i>dcuB</i>)	436	237
IMW503 pMW281 (<i>pdcuB</i> ⁺)	7	52
IMW503 pMW320 (<i>pdcuB</i> H108A)	16	77
IMW503 pMW321 (<i>pdcuB</i> R127A)	15	77
IMW503 pMW339 (<i>pdcuB</i> R130A)	9	79
IMW503 pMW312 (<i>pdcuB</i> R196A)	9	76
IMW503 pMW313 (<i>pdcuB</i> K198A)	8	74
IMW503 pMW314 (<i>pdcuB</i> K202A)	7	75
IMW503 pMW315 (<i>pdcuB</i> K289A)	7	87
IMW503 pMW340 (<i>pdcuB</i> R414A)	8	82
IMW503 pMW341 (<i>pdcuB</i> H419A)	11	68
IMW503 pMW348 (<i>pdcuB</i> H108A R130A)	10	74
IMW503 pMW350 (<i>pdcuB</i> H108A R127A R130A)	59	61

Die Doppelmutante H108A R130A zeigte ebenfalls kein verändertes Expressionsmuster. In dem Stamm mit der Dreifachmutante H108A R127A R130A wurde *dcuB'*-*lacZ* bereits ohne Fumarat fast auf Wildtyp-Niveau exprimiert und die Expression war durch Fumarat nicht weiter stimulierbar. Die Expression war insgesamt jedoch niedriger als in der nicht komplementierten Mutante, was möglicherweise mit der Expression von *dcuB* vom Plasmid zusammenhängt.

Dies könnte ein spezifischer Effekt der drei mutierten Aminosäuren sein oder durch eine Inaktivierung des Carriers verursacht sein. Um dies zu überprüfen, wurde das mutierte *dcuB* Gen mit seinem Promotor in das low-copy Plasmid pME6010 umkloniert, das aufgrund seiner niedrigeren Kopienzahl pro Zelle eine natürlichere Expression des DcuB Proteins erlaubt. Mit dem so erhaltenen Plasmid pMW359 wurde die *dcuABC* Dreifachmutante IMW505 komplementiert und das anaerobe Wachstum auf Fumarat verfolgt (Abb. 20). Als Vergleich wurde das mutierte *dcuB* Gen K198A ebenfalls in pME6010 umkloniert. Diese mutierte Version von *dcuB* zeigt bei den Expressionsmessungen keinen Effekt und dient als positive Kontrolle.

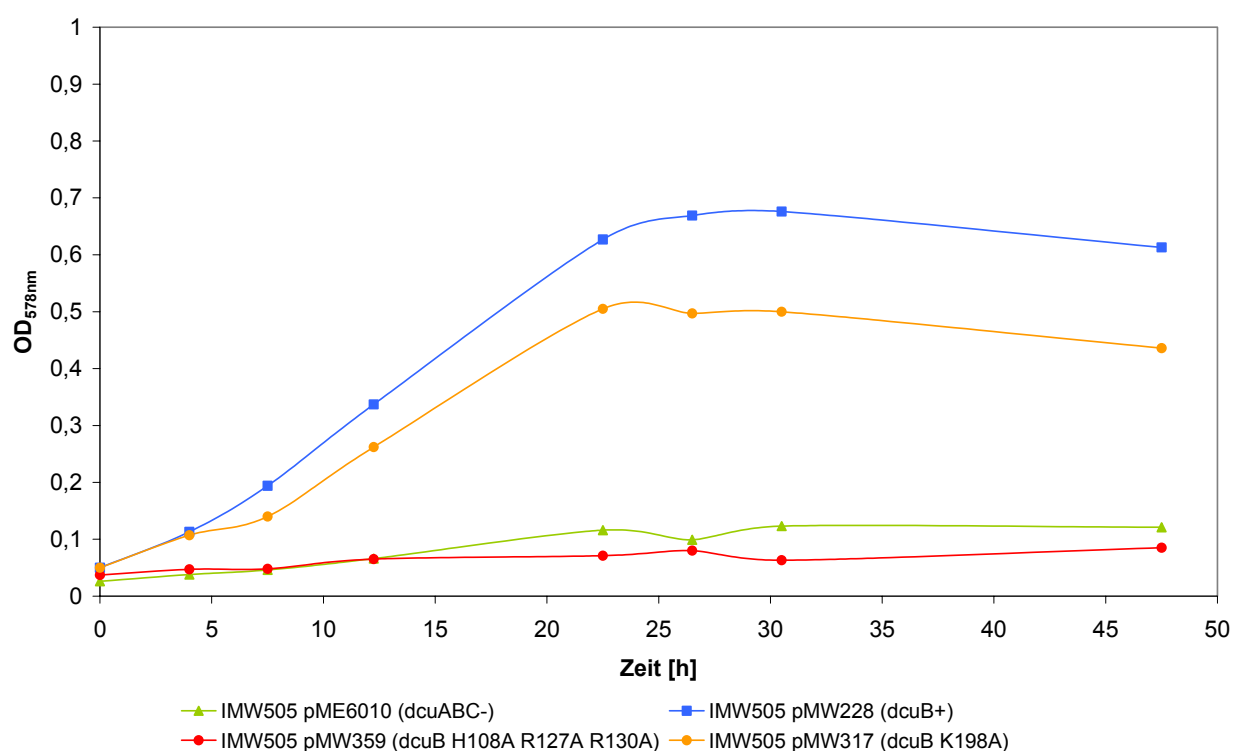


Abb. 20: Anaerobes Wachstum der *dcuB* Punktmutanten H108A R127A R130A (pMW359) und K198A (pMW317) mit Fumarat. Die Mutationen wurden auf Plasmiden eingeführt, die zur Komplementation der *dcuABC* Mutante IMW505 verwendet wurden. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin und Fumarat.

Komplementation mit DcuB K198A führte zu einem Wachstumsverhalten, das dem einer Komplementation mit Wildtyp-DcuB entsprach. Die Verdopplungszeiten von 8,1 h für die Mutante und 7,8 h für das Wildtyp-Plasmid waren vergleichbar. Die *dcuB* Dreifachmutante H108A R127A R130A zeigte dagegen kein anaerobes Wachstum auf Fumarat. Dies spricht dafür, dass das dreifach mutierte DcuB-Protein als Carrier inaktiv ist, nicht exprimiert oder

nicht in die Membran eingebaut wird. Der Effekt der Dreifachmutante auf die Expression von *dcuB'*-*'lacZ* ist daher wohl auf das Fehlen eines aktiven DcuB-Proteins zurückzuführen.

4.5 Komplementation des *dcuB'* Defekts mit *dcuB* aus *Wolinella succinogenes*

DcuB-homologe Carrier finden sich in vielen verschiedenen Bakterien. *Wolinella succinogenes* besitzt ein DcuB-Protein mit 71,5% Identität zu DcuB von *E. coli*. Es katalysiert den elektroneutralen Antiport von C₄-Dicarboxylaten (Ullmann *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenz des Transporters von *W. succinogenes* weist ebenfalls die beiden regulatorisch wichtigen Aminosäuren Threonin und Aspartat auf. Es stellte sich also die Frage, ob das *Wolinella* Protein die Inaktivierung von *dcuB* in *E. coli* in Transport und in Regulation komplementieren kann.

Das *Wolinella succinogenes dcuB* Gen wurde hierzu aus dem Vektor pW2E6 (Ullmann *et al.*, 2000) amplifiziert und hiermit *E. coli dcuB* im Plasmid pMW281 ersetzt. Der Vektor pMW436 enthält also das *dcuB* Gen aus *Wolinella succinogenes* unter der Kontrolle des *E. coli* Promotors. Dieses Plasmid wurde zur Komplementation einer *dcuB* Mutante verwendet. Tabelle 22 zeigt die Expression der mit *dcuB_{w.succ}* komplementierten Mutante (pMW436) im Vergleich zur Komplementation mit dem *E. coli* Gen (pMW281) nach anaerober Zucht mit und ohne Fumarat. Die Expression war nach Komplementation mit dem *dcuB_{w.succ}* gegenüber der mit *dcuB_{E.coli}* in Abwesenheit von Fumarat um den Faktor 8 erhöht und wurde durch Fumarat nicht weiter induziert. Dies entspricht dem Expressionsmuster der Deletionsmutante (IMW503), wobei hier die Expressionswerte insgesamt höher waren. DcuB aus *W. succinogenes* konnte scheinbar die Funktion des *E. coli* Proteins in der Regulation nicht ersetzen, es veränderte aber die Expressionsstärke von *dcuB'*-*'lacZ*.

Tab. 22: Änderung der Expression von *dcuB'*-*'lacZ* im neu konstruierten *dcuB* Deletionsstamm und Komplementation von *dcuB*. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (rel. Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW503 ($\Delta dcuB$)	436	237
IMW503 pMW281 (<i>dcuB_{E.coli}</i> ⁺)	7	52
IMW503 pMW436 (<i>dcuB_{w.succ.}</i> ⁺)	55	59

Zur Komplementation der Transportfunktion wurde *dcuB*_{*W. succ.*} zusammen mit dem *E. coli* Promotor in den low-copy Vektor pME6010 kloniert. Das resultierende Plasmid pMW424 wurde zur Komplementation der *dcuABC* Mutante verwendet und das anaerobe Wachstum mit Fumarat verfolgt. Im Gegensatz zu *dcuB* aus *E. coli* konnte *dcuB* aus *W. succinogenes* das anaerobe Wachstum auf Fumarat nicht wiederherstellen. Bis zu einer Inkubationszeit von 32 h war kein Wachstum zu verzeichnen (Abb. 21). Bei dem Anstieg der optischen Dichte beim letzten Messpunkt handelte es sich daher wahrscheinlich nicht um beginnendes Wachstum auf Fumarat, sondern möglicherweise um Wachstum mit den im Medium enthaltenen Aminosäuren.

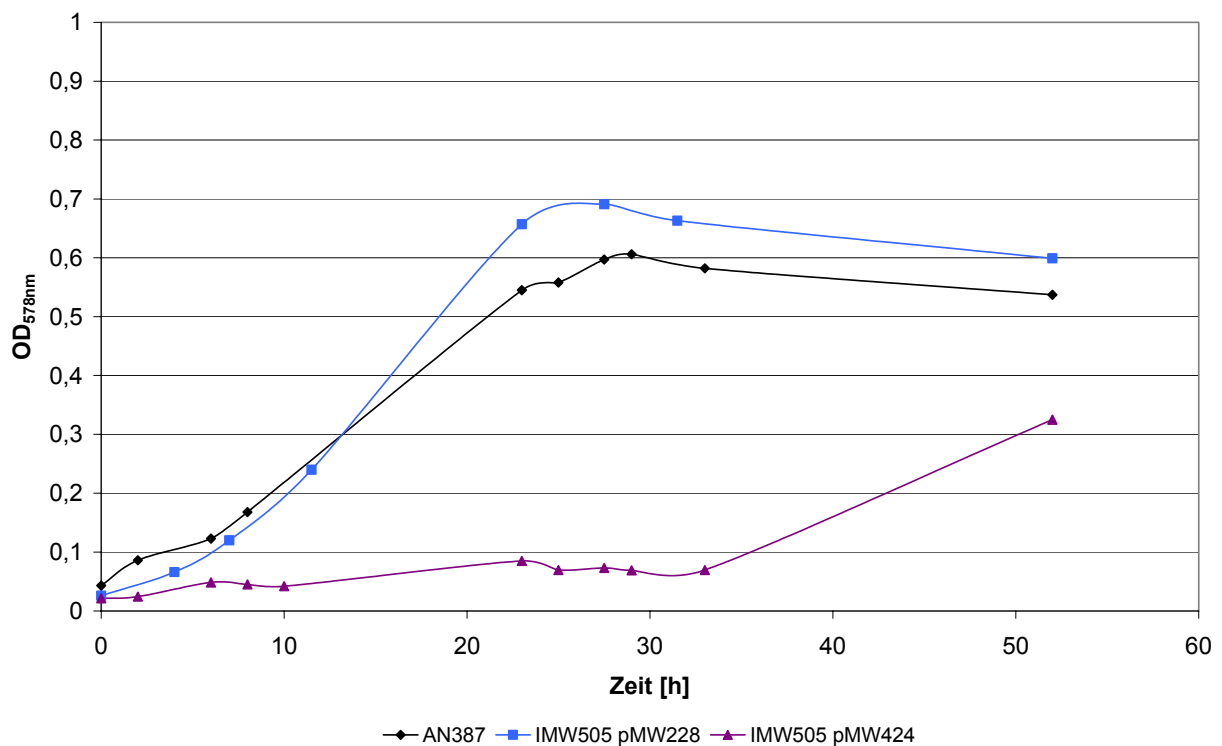


Abb. 21: Anaerobes Wachstum der *dcuABC* Dreifachmutante nach Komplementation mit *dcuB* aus *E. coli* (pMW228) und *W. succinogenes* (pMW424). Hierzu wurde das *E. coli* *dcuB* Gen des Vektors pMW228 ausgeschnitten und durch das *W. succinogenes* Gen ersetzt. Die Expression des *W. succinogenes* *dcuB* erfolgt daher über den *E. coli* Promotor. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus Fumarat.

Aus dem Wachstumsverhalten lässt sich schließen, dass DcuB aus *W. succinogenes* in Wachstum und Transport nicht die Funktion des *E. coli* DcuB-Proteins ersetzen kann. Obwohl die Proteine zu über 71 % identisch sind, konnte der Carrier aus *W. succinogenes* das *E. coli* Protein weder in seiner genregulatorischen Funktion noch in der Transportfunktion

ersetzen. Möglicherweise wurde das *W. succinogenes* Protein in *E. coli* nicht richtig exprimiert oder in die Membran eingebaut.

4.6 Suche nach kompensatorischen *dcuS* Mutanten

Konstruktion einer *dcuS::Spc^R* Mutante und deren Einfluss auf die Genexpression

Da der Effekt von DcuB auf die Expression von *dcuB* unabhängig von der Transportfunktion ist, aber vom DcuSR-System abhängt, ist es nahe liegend, dass DcuB die Genexpression indirekt über eine Wechselwirkung mit dem DcuSR-System reguliert. Eine solche Wechselwirkung könnte durch Thr394 und Asp398 vermittelt werden. Die Lage der Aminosäuren im Periplasma oder innerhalb einer Transmembranhelix macht eine Interaktion von DcuB mit dem ebenfalls membranständigen Sensor DcuS wahrscheinlicher als mit dem cytoplasmatischen DcuR.

Um solch eine Interaktion nachzuweisen, wurde versucht *dcuS* Mutanten zu identifizieren, die den Effekt der Mutante DcuB(T394I) kompensieren. In einer solchen Mutante sollte die Fumarat-abhängige Induktion wiederhergestellt und damit die Genexpression einer *dcuB'*-*lacZ* Reporterengenfusion ohne Fumarat nicht induziert sein. Solche kompensatorischen Mutanten wären ein direkter Nachweis einer Interaktion von DcuB mit DcuS.

Zu diesem Zweck wurde eine *dcuS dcuB* Doppelmutante konstruiert, in der beide Gene durch Insertion von unterschiedlichen Resistenzkassetten inaktiviert waren. Zusätzlich musste eine Komplementation der Gendefekte durch existierende Plasmide möglich sein, d.h. die Resistenzen mussten kompatibel sein. Dazu wurde die *dcuS::Spc^R dcuB::Cam^R* Doppelmutante IMW536 hergestellt, die eine *dcuB'*-*lacZ* Reporterengenfusion trägt. Dieser Stamm erlaubt eine Komplementation des *dcuS* Defekts mit dem Kanamycin-resistenten *dcuS* Plasmid pMW181 und des *dcuB* Defekts mit dem Tetracyclin-resistenten *dcuB* Plasmid pMW228.

In der *dcuS dcuB* Mutante war die Expression der *dcuB'*-*lacZ* Reporterengenfusion immer niedrig, d. h. mit und ohne Fumaratinduktion, da kein intaktes DcuSR-System vorliegt. Durch eine Komplementation mit Plasmid-kodierten *dcuS* wurde der *dcuB* Effekt, d. h. die Induktion ohne Fumarat, wiederhergestellt (Tab. 23). Eine zusätzliche Komplementation der *dcuSB* Doppelmutante mit dem *dcuB* Plasmid stellte auch die Fumarat-abhängige Induktion

wieder her. Damit ist sichergestellt, dass die neu konstruierte Mutante für die geplanten Untersuchungen geeignet ist.

Tab. 23: Expression von *dcuB'*-*lacZ* in der neu konstruierten *dcuS* Mutante IMW535 sowie der *dcuS dcuB* Doppelmutante IMW536 im Vergleich zum Wildtyp und der *dcuB* Einfachmutante. Der *dcuS* Defekt wurde durch das Plasmid pMW181 komplementiert, welches das *dcuS* Gen mit eigenem Promotor enthält. Zur Komplementation des *dcuB* Defekts wurde entweder das Plasmid pMW228 verwendet, das das Wildtyp *dcuB* Gen mit eigenem Promotor enthält oder dessen Derivat pMW397 mit der *dcuB* Punktmutante T394I. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW237 (wt)	28	436
IMW503 (<i>ΔdcuB</i>)	436	237
IMW535 (<i>dcuS</i> ⁻)	4	3
IMW536 (<i>dcuS</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁻)	4	4
IMW536 pMW181 (<i>pdcuS</i> ⁺)	63	56
IMW536 pMW181 pMW228 (<i>pdcuS</i> ⁺ <i>pdcuB</i> ⁺)	7	38
IMW536 pMW181 pMW397 (<i>pdcuS</i> ⁺ <i>pdcuB</i> T394I)	23	41

Mittels ungerichteter Mutagenese sollten Punktmutanten von *dcuS* hergestellt werden, die den Effekt der *dcuB* Mutation T394I wieder aufheben. Hierzu wurde das Plasmid pMW181, welches das *dcuS* Gen mit eigenem Promotor enthält, mit Hydroxylamin ungerichtet mutiert. Zur Selektion der gewünschten Mutanten wurde das mutierte Plasmid in den Stamm IMW536 (*dcuS dcuB*⁻) transformiert, der bereits das punktmutierte *dcuB*-Plasmid pMW397 (*DcuB* T394I) enthielt. Positive Klone sollten auf X-Gal-haltigem Agar ohne Fumarat wieder weiß bis hellblau erscheinen, da die *dcuS* Mutation den Effekt der *dcuB* Punktmutation T394I aufheben und zu einer erniedrigten Expression in Abwesenheit von Fumarat führen sollte. Durch einen zweiten Selektionsschritt auf Platten mit Fumarat wurde überprüft, ob die entsprechenden Klone eine verstärkte Genexpression in Anwesenheit des Induktors zeigen. Dies sollte zeigen, ob im ersten Selektionsschritt inaktive *dcuS* Punktmutanten isoliert wurden. Mutanten, die für ein inaktives *dcuS* Gen kodieren, erscheinen auf X-Gal-Platten ohne Fumarat ebenfalls weiß, da durch den Verlust des Sensors die Genexpression ausfällt. Die Expression von Mutanten, die ohne Fumarat weiß bis hellblau erschienen und auf Platten

mit Fumarat eine verstärkte Blaufärbung aufwiesen, wurden in β -Galactosidase-Tests erneut überprüft und das *dcuS* Gen anschließend sequenziert.

Nach dem Screening der Mutageneseansätze auf X-Gal-Indikatorplatten ohne Fumarat wurden 60 Kolonien weiter überprüft. Falsch positive Kolonien zeichneten sich durch eine geringere Koloniegröße aus und wuchsen beim erneuten Ausstrich auf Indikatorplatten nicht mehr an. Positive Klone hatten einen größeren Durchmesser und zeigten im Vergleich zu anderen Kolonien eine schwächere Blaufärbung. Sieben dieser Kolonien zeigten auf Indikatorplatten mit Fumarat wieder eine stärkere Blaufärbung und in β -Galactosidasetests eine Fumaratabhängige Induktion von *dcuB*'-'*lacZ*. Die Tabelle 24 zeigt exemplarisch das Expressionsmuster einer solchen Mutante im Vergleich zur Doppelmutante nach Komplementation mit den beiden unmutierten Plasmiden sowie nach Komplementation mit Wildtyp-*dcuS* und DcuB T394I. Obwohl in der *dcuS*-Mutante die Expression von *dcuB* durch Fumarat stimulierbar ist, handelte es sich hierbei um Wildtyp-*dcuS*. Alle gescreenten Klone wiesen entweder keine oder nur stille Punktmutationen auf. Die Unterschiede in der Genexpression bei den verwendeten Stämmen waren zu gering, um auf diese Weise kompensatorische *dcuS* Mutanten selektionieren zu können.

Tab. 24: Ungerichtete Mutagenese von *dcuS* mit Hydroxylamin Hydrochlorid. Das Plasmid pMW181 wurde nach ungerichteter Mutagenese in den Stamm IMW536 pMW397 (*dcuS* *pdcuB* T394I) transformiert. Zur Selektion von Mutanten mit niedriger Expression in Abwesenheit des Induktors wurden die Ansätze auf M9-Minimalagarplatten mit Glycerin, DMSO und X-Gal ausplattiert und anaerob inkubiert. Potentielle *dcuS* Punktmutanten wurden auf ihre Expression in β -Galactosidase-Tests untersucht. Angegeben ist beispielhaft die Expression eines durch Mutagenese gewonnenes *dcuS*-Plasmids (pMW181*) im Vergleich zum unmutierten Plasmid. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme	β -Galactosidase-Aktivität [MU]		Genotyp
	- Fumarat	+ Fumarat	
IMW536	4	4	<i>dcuB</i> ⁻ <i>dcuS</i> ⁻
IMW536 pMW228 pMW181	7	38	<i>pdcuB</i> ⁺ (wt) <i>pdcuS</i> ⁺ (wt)
IMW536 pMW397 pMW181	23	41	<i>pdcuB</i> T394I <i>pdcuS</i> ⁺ (wt)
IMW536 pMW397 pMW181*	10	61	<i>pdcuB</i> T394I <i>pdcuS</i> ⁺ (wt)

Funktion von DcuS F120M und DcuS R147A in einer *dcuB* Mutante

Mutagenese der Reste H110A, F120M und R147A der periplasmatischen Sensordomäne von DcuS inaktiviert die Signalerkennung und Funktion von DcuS (Kneuper *et al.*, 2005). Es wurde überprüft, ob Stimulierung der Funktion von DcuS durch Deletion von DcuB auch in dieser Mutante erhalten bleibt. Die *dcuS dcuB* Doppelmutante zeigte nach Komplementation mit *dcuS*-Plasmiden, die entweder die *dcuS* Mutation R147A oder F120M enthielten, keine Induktion durch Fumarat (Tab. 25). Der Funktionsverlust in den *dcuS* Mutanten F120M und R147A ist unabhängig vom *dcuB* Effekt, die Expression kann in den getesteten Doppelmutanten nicht wiederhergestellt werden.

Tab. 25: Änderung der Expression von *dcuB'*-*lacZ* in der *dcuS dcuB* Doppelmutante IMW536 nach Komplementation mit punktmutiertem DcuS R147A (pMW237) und DcuS F120M (pMW368). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (rel. Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW536 (<i>dcuS⁻ dcuB⁻</i>)	4	4
IMW536 pMW181 (<i>pdcuS⁺</i>)	63	56
IMW536 pMW237 (<i>dcuB⁻ pdcuS</i> R147A)	nb	3
IMW536 pMW368 (<i>dcuB⁻ pdcuS</i> F120M)	nb	4

Kompensation der *dcuB* Mutationen T394I und D398N durch gerichtete Mutagenese von *dcuS*

Die Lage der regulatorischen Punktmutationen von DcuB, Thr394 und Asp398, ist bislang noch unklar. Für die beiden Aminosäuren wurde eine Position im Periplasma oder innerhalb der Transmembranhelix 10 vorgeschlagen (Abb. 14). Aufgrund dieser Position ist es nahe liegend, dass diese Aminosäuren mit der Sensorkinase DcuS wechselwirken, da die Reste entweder nur über das Periplasma oder über die Membran zugänglich sind. Der Austausch dieser Aminosäuren könnte die Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuS verändern und so die Aktivierung des DcuSR-Systems auslösen. Es stellt sich also die Frage, ob es möglich ist, gezielte Aminosäureaustausche in DcuS einzuführen, die den Effekt der Mutationen kompensieren.

Bei periplasmatischer Lage der Aminosäuren (Abb. 14 A), wäre es denkbar, dass eine Wechselwirkung mit der periplasmatischen Domäne von DcuS erfolgt. Wegen der

unbekannten Struktur der periplasmatischen Domäne und des DcuB-Proteins, ist es nicht möglich, eine Vorhersage über potentielle Interaktionsbereiche zu machen. Im alternativen Modell (Abb. 14 B) liegen die beiden regulatorischen Reste am cytoplasmatischen Ende der Transmembranhelix 10. Die Reste liegen vier Aminosäuren oder eine Windung einer α -Helix auseinander und beide Aminosäuren wären zur gleichen Seite der Transmembranhelix orientiert. Potentielle interagierende Aminosäuren in DcuS sollten in diesem Fall in einer Transmembranhelix auf der cytoplasmatischen Seite und vier Aminosäuren auseinander liegen. Die Ladung bzw. Polarität sollte zu den regulatorischen Aminosäuren in DcuB passen. Es wurde also überprüft, ob in einer Transmembranhelix von DcuS Reste zu finden sind, die die genannten Voraussetzungen erfüllen.

In der Transmembranhelix 2 von DcuS befinden sich Cys199 und Lys203 ebenfalls in einem Abstand von vier Aminosäuren am cytoplasmatischen Ende der Transmembranhelix von DcuS.

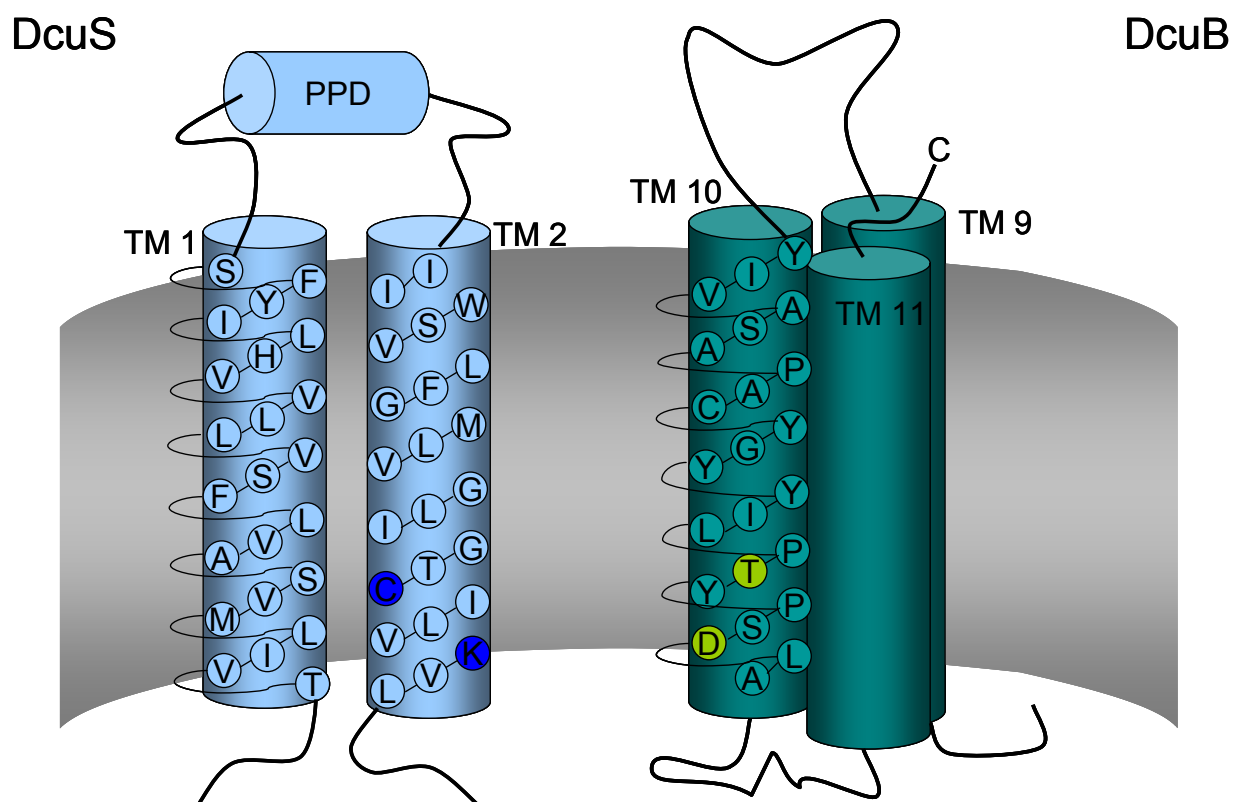


Abb. 22: Modell zur möglichen Interaktion zwischen DcuS und DcuB über Transmembranhelices. Dargestellt sind die beiden Transmembranhelices von DcuS mit der dazwischenliegenden periplasmatischen Domäne (ppD) und die Transmembranhelices 9 bis 11 von DcuB. Die Lage der Helices wurde mit dem TMHMM Server 2.0 berechnet. In TM10 von DcuB sind die beiden regulatorischen Aminosäuren Thr394 und Asp398 in grün eingezeichnet. In dunkelblau sind 2 Aminosäuren der TM2 von DcuS markiert, die aufgrund ihrer Lage und ihrer Polarität bzw. Ladung Wechselwirkungen mit Thr394 und Asp398 von DcuB eingehen könnten.

Cystein trägt wie Threonin eine polare Seitengruppe, die Aminosäure Lysin eine positive Ladung und Aspartat eine negative Ladung. Beide Aminosäurepaare könnten daher Wechselwirkungen eingehen. Es wurde versucht, durch gerichtete Mutagenese von *dcuS* den Effekt der *dcuB* Mutanten T394I und D398N aufzuheben. Durch die Substitution von Threonin durch Isoleucin in DcuB wurde statt einer polaren Aminosäure ein größerer und unpolarer Rest in das Protein eingeführt, was eine Induktion der Genexpression auslöste. Cys199 wurde durch gerichtete Mutagenese gegen Alanin ersetzt (Abb. 23), das einen unpolaren Seitenrest besitzt, der kleiner als der ursprüngliche Cysteinrest ist.

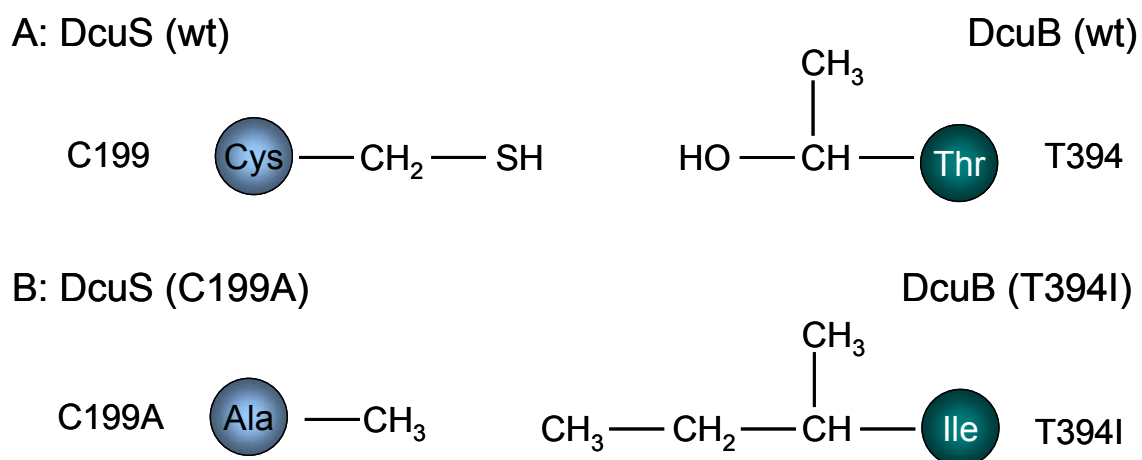


Abb. 23: Substitution des Cysteins 199 von DcuS gegen Alanin zur Kompensation der Mutation T394I von DcuB. Dargestellt sind die ursprünglich im Wildtyp vorhandenen Aminosäuren der beiden Proteine (A) sowie die beiden kombinierten Punktmutationen (B).

In analoger Weise wurde DcuS K203Q hergestellt und getestet. Glutamin ist polar und enthält wie Asparagin eine Keto- und eine Aminogruppe (Abb. 24). Zur Kontrolle wurde das Lysin außerdem durch ein Alanin ersetzt, das mit seiner Seitenkette keine Wechselwirkung mit dem Asparagin eingehen sollte (Abb. 24).

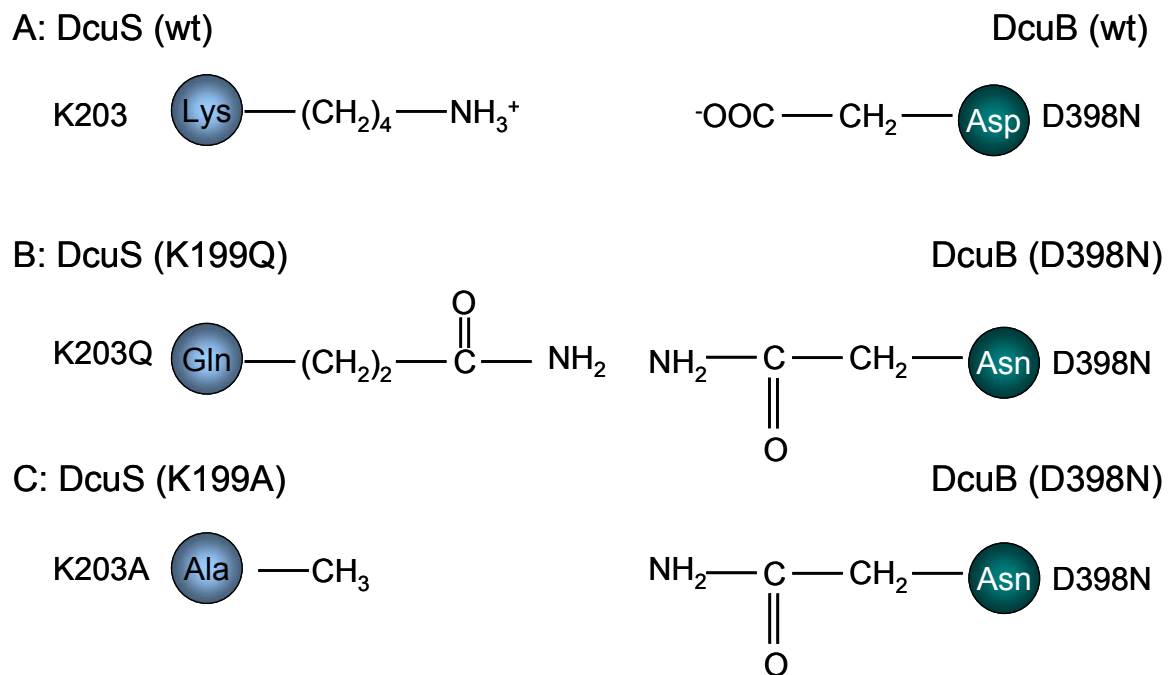


Abb. 24: Substitution des Lysins 199 von DcuS gegen Glutamin und Alanin zur Kompensation der Mutation T394I von DcuB. Dargestellt sind die ursprünglich im Wildtyp vorhandenen Aminosäuren der beiden Proteine (A) sowie die Kombination von DcuS K203Q (B) bzw. DcuS K203A mit DcuB D398N (C).

Die Untersuchungen wurden in einer *dcuS dcuB* Doppelmutante durchgeführt, in die verschiedene Formen von *dcuS* und *dcuB* auf Plasmiden eingebracht wurden. DcuS C199A war jedoch weder ohne noch in Anwesenheit von Fumarat in der Lage, die Expression von *dcuB'*-*lacZ* zu stimulieren (Tab.26). Verwendet man zur Komplementation DcuS C199A und DcuB T394I ist in Abwesenheit eine schwache Induktion zu beobachten, die allerdings nicht Fumarat-stimulierbar, sondern Fumarat-reprimiert ist. Die Mutation Cys199Ala in DcuS führt also zu einem Verlust der Fumarat-abhängigen Stimulation der Genexpression, die Expression ohne Fumarat entspricht dem *dcuS*-Deletionsstamm.

DcuS K203Q und DcuS K203A hatten keinen Effekt auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die getesteten *dcuS*-Mutanten schienen in beiden Fällen funktionell zu bleiben, da die Expression in Anwesenheit eines unmutierten DcuBs den Verhältnissen im Wildtyp entsprach. Die Stimulierbarkeit durch Fumarat konnte durch die Kombination der beiden Punktmutanten mit DcuB D398N nicht wiederhergestellt werden.

Tab. 26: Suche nach kompensatorischen *dcuS* Mutanten durch gerichtete Mutagenese: Änderung der Expression von *dcuB*'-'*lacZ* nach Komplementation der *dcuS dcuB* Doppelmutante IMW536 mit *dcuB* T394I und punktmutiertem DcuS C199A (pMW438). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat.

Stämme (relevanter Genotyp)	β-Galactosidase-Aktivität [MU]	
	- Fumarat	+ Fumarat
IMW536 (<i>dcuS</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁻)	4	4
IMW536 pMW181 pMW228 (<i>pdcuS</i> ⁺ <i>pdcuB</i> ⁺)	7	38
IMW536 pMW181 pMW397 (<i>pdcuS</i> ⁺ <i>pdcuB</i> T394I)	23	41
IMW536 pMW438 pMW228 (<i>pdcuS</i> C199A <i>pdcuB</i> ⁺)	9	3
IMW536 pMW438 pMW397 (<i>pdcuS</i> C199A <i>pdcuB</i> T394I)	15	3
IMW536 pMW439 pMW228 (<i>pdcuS</i> K203Q <i>pdcuB</i> ⁺)	7	28
IMW536 pMW439 pMW405 (<i>pdcuS</i> K203Q <i>pdcuB</i> D398N)	40	30
IMW536 pMW440 pMW228 (<i>pdcuS</i> K203A <i>pdcuB</i> ⁺)	7	28
IMW536 pMW440 pMW405 (<i>pdcuS</i> K203A <i>pdcuB</i> D398N)	46	28

4.7. Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuSR

Untersuchung von Proteinwechselwirkungen mit einem Bacterial Two-Hybrid-System

Der Effekt von DcuB auf die Expression von *dcuB* könnte durch eine Wechselwirkung von DcuB mit dem DcuSR-System erfolgen. Diese Wechselwirkung könnte zu einer Modulierung der Aktivität von DcuS oder DcuR führen und so die Genexpression verändern. Ein klassischer Ansatz, um mögliche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen zu untersuchen, ist die Verwendung eines Two-Hybrid-Systems.

Es wurde das Bacterial Two-Hybrid-System (BACTH) nach Karimova *et al.* (1998) verwendet. Es basiert auf der Rekonstitution der Adenylatcyclaseaktivität eines *E. coli* *cyã* Stammes durch Fusion der Testproteine an je eine katalytische Domäne der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis*. Mithilfe von Vektoren, die entweder das T18-Fragment oder das T25-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase von *B. pertussis* enthalten, können die zu untersuchenden Proteine N- oder C-terminal (z.B. T25-ProteinX oder ProteinX-T25) mit den beiden Testproteinen fusioniert werden. Falls die beiden Testproteine

im Reporterstamm interagieren, werden das T18- und das T25-Fragment zusammengeführt und katalysieren so die Umsetzung von ATP zu cAMP. cAMP induziert schließlich die Expression von Reportergenen, wie zum Beispiel dem *lacZ* Gen für die β -Galactosidase, deren Expression in einem Reportergenassay anschließend quantifiziert werden kann. Da es sich bei dieser Aktivierungskaskade, die letztlich zur Aktivierung von Reportergenen führt, um einen zweistufigen Prozess handelt, scheint dieses System gut geeignet, um die Interaktion von Membranproteinen zu untersuchen. Die Wechselwirkung der beiden Proteine kann in der Membran stattfinden und ist von der Aktivierung der Expression auf DNA-Ebene getrennt. Als Positivkontrolle für Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen Fusionen der Adenylatcyclase-Fragmente mit Leucinzippern, deren Dimerisierung *in vivo* bereits untersucht ist (Karimova *et al.*, 1998).

Für den Test auf Interaktion von DcuB mit DcuS oder DcuR wurde das gesamte *dcuB* Gen in den Vektor pT25 kloniert. Dieser Vektor zur Konstruktion der Fänger- (oder Bait)-Proteine erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit dem T25-Fragment der Adenylatcyclase am N-Terminus des Carriers (T25-DcuB). Für die Interaktionsstudien wurden das *dcuS* und das *dcuR* Gen entweder in den Vektor pUT18C oder pUT18 kloniert, wodurch die Ziel- oder Targetproteine entweder an ihrem N- oder ihrem C-Terminus mit dem T18-Fragment fusioniert wurden (T18-DcuS/DcuR und DcuS/DcuR-T18). Die so konstruierten Plasmide wurden anschließend in den *cya*⁻ Reporterstamm BTH101 transformiert und die β -Galactosidase-Aktivität der Stämme im Vergleich zum Kontrollansatz mit den Leucin-Zipper-Fusionsplasmiden bestimmt (Tab. 27).

Die Interaktion der von den beiden Kontrollplasmiden exprimierten Target-Proteine, die jeweils eine Fusion der Leucinzipper-Domäne mit dem T18-Fragment enthalten, führte zu einer Expression der β -Galactosidase von ca. 700 MU. Die Fusion von DcuB mit dem T25-Fragment ergab in Kombination mit N- und C-terminalen Fusionen von DcuS und DcuR mit dem T18-Fragment eine Aktivität zwischen 40 und 60 MU. Zur Unterscheidung, ob es sich dabei um eine schwache oder um fehlende Wechselwirkung handelt, wurde das *dcuB*-Fusionsplasmid mit dem entsprechenden Leucin-Zipper-Plasmid kombiniert. Für diese Proteine wurde keine Wechselwirkung erwartet, die Aktivitäten sollten als Maß für die β -Galactosidase bei fehlender Adenylatcyclaseaktivität dienen. Die Aktivität lag im gleichen Bereich. Die Expression des *lacZ* Gens in der T25-DcuB-Fusion scheint daher der Grundexpression der β -Galactosidase zu entsprechen, sie ist kein Hinweis auf eine Interaktion von DcuB mit DcuS oder DcuR.

DcuR interagiert mit DcuS nur vorübergehend. Es sollte überprüft werden, ob mit dem BACTH-System eine solche Interaktion nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden *dcuS* und *dcuR* in den Vektor pT25 N-terminal kloniert und mit dem T25-Fragment fusioniert (T25-DcuS und T25-DcuR). Die Interaktion wurde mit den Fusionen der beiden Proteine mit dem T18-Fragment getestet. Auf diese Weise wurden sowohl die Interaktion zwischen DcuS und DcuR als auch die Dimerisierung der Proteine untersucht. Für verschiedene Histidinkinasen wird vermutet, dass sie als Oligomere in der Membran vorliegen. (Yang and Inouye, 1991; Hidaka *et al.*, 1997). Auch der Responseregulator DcuR könnte in seinem aktiven Zustand als Oligomer an die DNA binden (Abo-Amer *et al.*, 2004).

Die Wechselwirkung zwischen zwei DcuS-Proteinen wurde mit der Fusion T25-DcuS sowie T18-DcuS und DcuS-T18 getestet (Tab. 27). Die Aktivitäten lagen nicht über der Hintergrundaktivität, eine Wechselwirkung war nicht erkennbar. Auch die Aktivität im Interaktionstest von T25-DcuR mit den DcuR-Fusionen T18-DcuR und DcuR-T18 entsprach der Grundexpression von *lacZ*. Eine Dimerisierung konnte weder für DcuS noch für DcuR nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DcuS und DcuR wurde T25-DcuS mit T18-DcuR und DcuR-T18 getestet, die Aktivitäten entsprachen jedoch der Hintergrundexpression. Im Interaktionstest von T25-DcuR mit DcuS-T18 lag die *lacZ*-Expression deutlich über dem Grundniveau, erreichte jedoch nicht die Aktivitäten der Positivkontrollen. Die Wechselwirkung zwischen DcuS und DcuR ist daher schwächer als die der beiden Leucin-Zipper. Bei Verwendung von T25-DcuR und T18-DcuS war diese Wechselwirkung nicht nachweisbar. Für den Nachweis von interagierenden Proteinen scheint daher die räumliche Orientierung der Fragmente zueinander essentiell zu sein.

Tab. 27: Interaktionstest zwischen DcuB, DcuS und DcuR mit dem Bacterial Two-Hybrid-System nach Karimova *et al.* (1998). Die Proteine wurden hierzu entweder mit dem T25-Fragment oder dem T18-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* fusioniert. Die Proteine konnten dabei vor das jeweilige Fragment (z.B. DcuS-T18) oder dahinter kloniert werden (z.B. T18-DcuS). Interagierende Proteine rekonstituieren die Adenylatcyclaseaktivität in einem *E. coli* *cya*⁻ Stamm und induzieren so die Expression der β -Galactosidase. Für den Interaktionstest wurden jeweils ein Target- und ein Bait-Plasmid gleichzeitig in den Reporterstamm BTH101 transformiert und nach Zucht in LB-Medium die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Als Kontrolle dienten Plasmide mit Fusionen des T25- bzw. des T18-Fragments an Leucin-Zipper.

		β -Galactosidase-Aktivität [MU]				
Target	DcuS-T18 (pMW427)	T18-DcuS (pMW428)	DcuR-T18 (pMW429)	T18-DcuR (pMW430)	T18-Zipper (pUT18C- zip)	
Bait						
T25-DcuB (pMW424)	59	56	41	47	48	
T25-DcuS (pMW425)	58	54	54	38	nb	
T25-DcuR (pMW426)	222	54	59	41	nb	
T25-Zipper (pKT25- zip)	nb	nb	43	35	726	

nb = nicht bestimmt

Interaktionstest zwischen ganzen Proteinen und löslichen Domänen mit dem BacterioMatch-System

Im BacterioMatch-System (Stratagene) wird zur Herstellung des Baitproteins das zu untersuchende Gen über Klonierung in den Vektor pBT mit dem λ -C1-Repressor-Protein fusioniert, das an eine λ -Operator-Sequenz des Reporterstamms bindet. Der potentielle Interaktionspartner wird in den Vektor pTRG kloniert, was zu einer Fusion mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase führt. Durch eine Interaktion der beiden Testproteine werden bei einer Bindung an die DNA über den λ -Repressor die restlichen Untereinheiten der RNA-Polymerase rekrutiert und die Expression von Reportergenen angeschaltet. Hierzu zählt das *lacZ* Gen für die β -Galactosidase und das *amp*^R Gen, das eine Resistenz gegen Ampicillin

und Carbenicillin vermittelt. Im Gegensatz zu dem vorher verwendeten System lagen der λ -Repressor und die α -Untereinheit der RNA-Polymerase immer am N-Terminus des Testproteins, wobei neben den ganzen Proteinen auch verschiedene Protein-Domänen auf ihre Interaktion getestet wurden. Als Maß für eine positive Interaktion diente die Wechselwirkung zwischen zwei Domänen des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4, die von den beiden Kontrollplasmiden pBT-LGF2 und pTRG-Gal11^P kodiert wurden. Eine Interaktion der beiden Domänen führte zum Wachstum von resistenten Kolonien auf Carbenicillin-haltigen Agarplatten.

Für den Interaktionstest zwischen DcuB und DcuS bzw. DcuR wurde das Gen für den Carrier in den Bait-Vektor pBT kloniert, die Gene für DcuS und DcuR hingegen in den Targetvektor pTRG. Im Fall von DcuB wurden das ganze Gen sowie Teilbereiche fusioniert. Für die Teilbereiche wurde zum einen ein Hybridprotein mit dem C-terminalen Bereich von DcuB hergestellt, der die letzten 70 Aminosäuren umfasst. Des Weiteren wurden zur Konstruktion einer zweiten Variante 90 Aminosäuren verwendet, die der löslichen Schleife zwischen Transmembranhelix 5 und 6 des Topologiemodells A entspricht. Für die Konstruktion der Targetvektoren wurden der komplette Genbereich für *dcuS* und *dcuR* kloniert, sowie der Bereich der cytoplasmatischen Domäne von DcuS, der die PAS- und die Kinasedomäne enthält, und der N-terminale Bereich von DcuR, der die Receiverdomäne umfasst. Jeweils ein Bait-Hybridprotein wurde mit einem Target-Hybridprotein im Reporterstamm koexprimiert und das Wachstum von Carbenicillin-resistenten Kolonien im Vergleich zum Ansatz mit den beiden Kontrollproteinen beobachtet.

Eine Interaktion der beiden Dimerisierungsdomänen des Gal4 Transkriptionsfaktors war über das Wachstum von Carbenicillin-resistenten Kolonien nachweisbar. Das Koloniewachstum beim Testansatz mit DcuB und DcuS entsprach sowohl bei Verwendung von kompletten Proteinen und löslichen Domänen den Negativkontrollen (Tab. 28). Es konnte keine Interaktion der Fusionsproteine nachgewiesen werden. Ein erhöhtes Wachstum von Kolonien auf den Indikatoragarplatten bei Verwendung DcuB und DcuR als Hybridproteinen war auf eine Aktivierung der Reporterexpression durch DcuR zurückzuführen. Sowohl der komplette Responseregulator als auch dessen Receiverdomäne führten unabhängig vom getesteten Fängerprotein zu einem Koloniewachstum, das unterhalb dem der Positivkontrollen lag. Dieses Wachstum ist daher auf eine geringere Expression des Reportergens *amp^R* zurückzuführen, die auch ohne Interaktion der Testproteine stattfindet. Insgesamt lag die Anzahl an Kolonien bei den Ansätzen mit den DcuB-Teilbereichen etwas höher als beim

kompletten Membranprotein, was möglicherweise auf eine toxische Wirkung bei der Expression des gesamten Carriers hinweist.

Tab. 28: Interaktionstest zwischen DcuB und DcuS bzw. DcuB und DcuR mit dem BacterioMatch Two-Hybrid System von Stratagene. Für die Konstruktion von Bait-Plasmiden wurde das gesamte DcuB oder nur Teile davon durch Klonierung in den Vektor pBT mit dem λ -C1-Repressor fusioniert (z. B. λ -C1-DcuB). Zur Herstellung der Target-Plasmide wurden Teile von DcuS und DcuR sowie bestimmte Proteindomänen durch Klonierung in pTRG mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase fusioniert (z.B. RNAP-DcuS). Für den Interaktionstest wurden kompetente Zellen des Reporterstamms XL1 Blue MRF' mit je 10 ng Bait- bzw. Targetvektor transformiert und die Transformationsansätze auf LB-Carbenicillin (300 μ g/ml)-Kanamycin (50 μ g/ml)-Tetracyclin (12,5 μ g/ml)-Chloramphenicol (34 μ g/ml)-Platten ausplattiert. Eine Interaktion zeigte sich durch Wachstum von Carbenicillin-resistenten Kolonien auf den Selektionsplatten. Als Positivkontrolle dienten zwei Plasmide mit Fusionen der Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 aus der Hefe (pBT-LGF2 und pTRG-Gal1^P).

nb: nicht bestimmt; RD: Receiverdomäne von DcuR; PAS/Kinase: Cytoplasmatischer Bereich von DcuS mit PAS- und Kinase-Domäne

Target	Carbenicillin-resistente Kolonien pro Platte				
	Gal11 ^P (pTRG-Gal11)	DcuS (pMW272)	PAS/Kinase DcuS (pMW273)	DcuR (pMW274)	RD DcuR (pMW437)
Bait					
Ohne (pBT)	nb	nb	nb	36	Nb
LGF2 (pBT-LGF2)	48	0	nb	32	200
DcuB (pMW269)	4	1	0	7	44
C-Terminus DcuB (pMW270)	4	3	0	49	110
Loop zw. TM5-TM6 (pMW271)	9	0	0	54	150

4.8 Überexpression von DcuB als Fusionsprotein mit N-terminalem 6xHis-tag

***In vivo* Überexpression von DcuB_{6xHis} (pMW280)**

Zur biochemischen Charakterisierung von DcuB und seiner regulatorischen Funktion sollte der Carrier als Fusionsprotein mit N-terminalem His₆-Anhang in *E. coli* überexprimiert werden. Für die Überexpression wurde das Plasmid pMW280 verwendet. Es enthält das gesamte *dcuB* Gen hinter der Sequenz für einen N-terminalen Anhang aus 6 Histidin-Resten. Der His-tag ermöglicht eine spätere Aufreinigung über eine Ni-NTA-Agarosematrix. Die Überexpression erfolgte in dem Stamm C43(DE3), einem Derivat des Stammes BL21(DE3). Der Stamm trägt eine Spontanmutation im Transkriptions- oder Translationsapparat, wodurch eine bessere Expression von Membranproteinen als in anderen Stämmen möglich sein soll (Miroux und Walker, 1996). Um die Überexpression von DcuB_{6xHis} zu überprüfen, wurde der Stamm C43(DE3) mit dem Plasmid pMW280 transformiert und unter induzierenden Bedingungen angezogen. Von allen Präparationsschritten wurden Proben entnommen und in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 25 A). Mithilfe eines Antikörpers gegen den His_{6x}-Anhang und einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper wurde im Western-Blot die Bildung von DcuB_{6xHis} überprüft (Abb. 25 B). Die erwartete Größe für das DcuB-Fusionsprotein beträgt ca. 52 kD. Die Gesamtproteinfraktion nach Induktion zeigte keine verstärkte Bande mit diesem Molekulargewicht. Auch die einzelnen Fraktionen zeigten keine verstärkten Banden dieses Molekulargewichts. Im Western Blot ließ sich mit Antiserum gegen His_{6x} kein Protein der erwarteten Größe identifizieren, obwohl die Reaktion des Kontrollproteins positiv war (Abb. 25 B). Das bedeutet, dass DcuB_{6xHis} nicht oder nur in sehr geringen Mengen gebildet wurde. Auch durch eine Veränderung des Induktionszeitpunkts oder der Inkubationstemperatur nach Induktion ließ sich die Bildung von DcuB nicht nachweisen. Möglicherweise ist die Bildung von DcuB_{6xHis} für die Zellen toxisch, so dass nur sehr geringe Mengen dieses Proteins gebildet werden. Das ist ein prinzipielles Problem bei der Überproduktion von sekundären Carriern. Ein weiteres Problem konnte die Degradation des Proteins in der Zelle durch Proteasen darstellen.

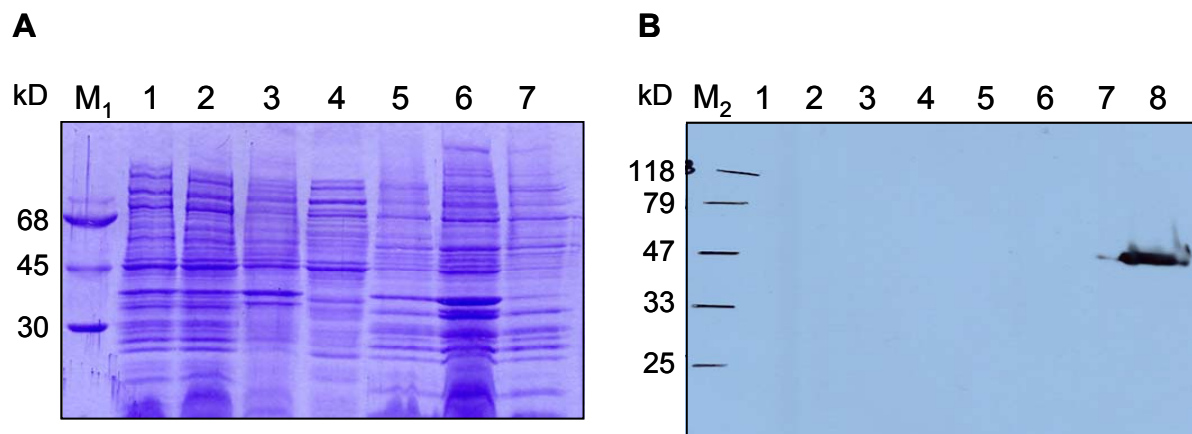


Abb. 25: Überprüfung der Überproduktion von DcuB_{6xHis} im Stamm C43(DE3) bei 30°C. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und wurde durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (A). Mittels His_{6x}-Antiserum sollten durch Western-Blot wurden von Gel (A) Proteine mit His_{6x}-Anhang nachgewiesen (B). Als Positivkontrolle für den Western-Blot diente überproduziertes DcuS-Protein mit His-tag (B, Spur8). Die erwartete Größe für das DcuB_{6xHis}-Protein beträgt ca. 52 kD

- 1: Zellhomogenat vor Induktion
- 2: Zellhomogenat nach Induktion
- 3: Zellhomogenat nach French Press
- 4: Überstand nach Ultrazentrifugation
- 5: Membranfraktion
- 6: Membranen, nach Triton-X-100 Extraktion
- 7: Triton-X-100-Membranextrakt
- 8: DcuS_{His-tag}

M₁: Proteinstandard mit BSA (M_r 68 kD), Ovalbumin (M_r 45 kD) und Carboanhydrase (M_r 30 kD)
M₂: Prestained Molecular Proteinweight Marker (MBI Fermentas)

***In vitro* Translation von DcuB**

Bei der Überexpression von DcuB in *E. coli* Zellen ließ sich kein DcuB_{6xHis} nachweisen. Es sollte deshalb versucht werden, DcuB_{6xHis} mit einem *in vitro* Translationssystem zu bilden. Das EasyXpress System von Qiagen ermöglicht eine zellfreie Protein-Biosynthese mithilfe von *E. coli* Lysaten, die alle Komponenten des Translationsapparats sowie die T7-Polymerase enthalten. Die Kopplung von Transkription und Translation in diesem System erlaubt die Expression von Proteinen, deren Gene unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Als Template können sowohl lineare DNA als auch Plasmid-DNA dienen.

Als Template für die *in vitro* Translation von DcuB wurde das Plasmid pMW280 verwendet, das die Expression von DcuB_{6xHis} ermöglicht. RNase-freies Plasmid wurde zusammen mit *E. coli* Lysat, Reaktionspuffer und Triton-X-100 als Detergenz, um das Protein in Lösung zu halten, inkubiert (Abb. 26). Der proteinhaltige Reaktionsansatz wurde anschließend über Ni-NTA-Agarose gereinigt und durch SDS-PAGE und Western Blot

analysiert. Zur Detektion von His-tag-Protein wird der Penta-His-Antikörper (Qiagen) verwendet, der durch Chemilumineszenz mit einem Röntgenfilm nachgewiesen wird.

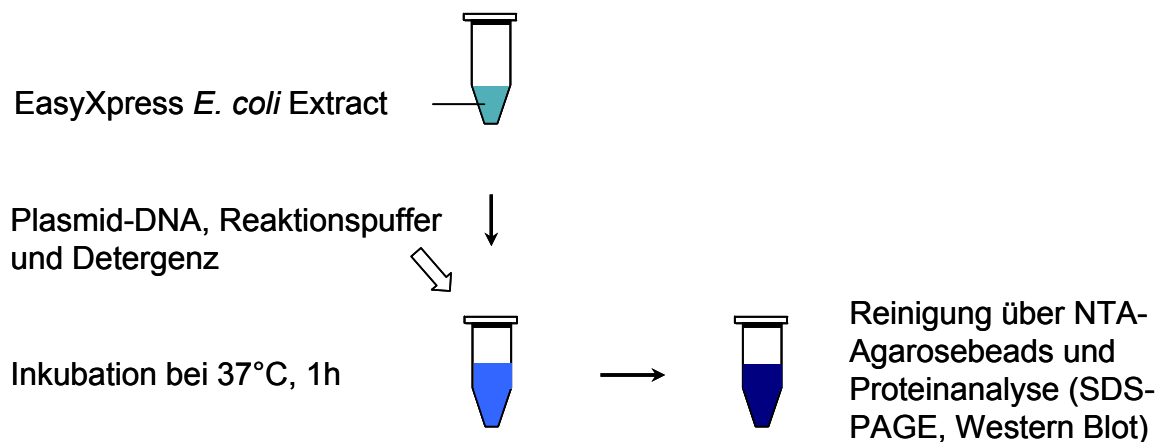


Abb. 26: Schematischer Ablauf der *in vitro* Translation mit dem EasyXpress Protein Synthesis Kit von Qiagen. Ein *E. coli* Zellextrakt wird mit RNase-freiem Plasmid mit dem zu exprimierenden Gen, sowie Reaktionspuffer und gegebenenfalls Detergenz inkubiert. Der Reaktionsansatz mit dem *in vitro* synthetisierten His-tag-Protein wird anschließend über Ni-NTA-Agarosebeads gereinigt. Die Proteine werden in SDS-Page aufgetrennt, His-tag-Proteine können über ein Western-Blot mit einem Anti-His-tag-Antikörper sichtbar gemacht werden.

Als Positivkontrolle diente die Synthese des 32kD großen Elongationsfaktors EF-Ts. Da die Expression von Membranproteinen auch *in vitro* ein Problem darstellt, wurde in einer zweiten Kontrollreaktion DcuS_{6xHis} exprimiert. Die *in vitro*-Translation wurde in Gegenwart von 0,05% oder von 0,025% Triton-X 100 durchgeführt (Abb. 27). Die Reinigung über Ni-NTA-Agarose erfolgte in zwei Schritten. Die Fraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und die His-tag-Proteine über den Western Blot detektiert. Der Elongationsfaktor EF-Ts mit einem Molekulargewicht von 32 kD wurde bei beiden Tritonkonzentrationen gebildet (Abb. 27 A).

Von DcuS war im SDS-Gel keine deutliche Bande in der erwarteten Größe von 63 kD zu erkennen (Abb. 27 A). Im Western Blot war aber im Ansatz mit 0,05% Triton eine schwache Bande in der erwarteten Größe detektierbar (Abb. 27 B). Mit einer Konzentration von 0,025% Triton wurden keine nachweisbaren Mengen an DcuS_{6xHis} gebildet. Für die Expression von DcuS ist die Verwendung einer höheren Triton-Konzentration daher notwendig.

Die SDS-Gelelektrophorese der *in vitro* Translation von DcuB_{6xHis} zeigte keine Bande der erwarteten Größe von 52 kD. Auch im Western Blot war bei beiden Detergenzkonzentrationen keine Reaktion sichtbar. Deshalb scheint die Produktion eines hydrophoben Membranproteins mit vielen Transmembranhelices wie in DcuB sowohl in Zellen als auch im

Reagenzglas ein Problem darzustellen. Die *in vitro* Translation von DcuB_{6xHis} wird zurzeit in Kooperation mit Dr. Uritza von Groll der Firma Qiagen weiter untersucht.

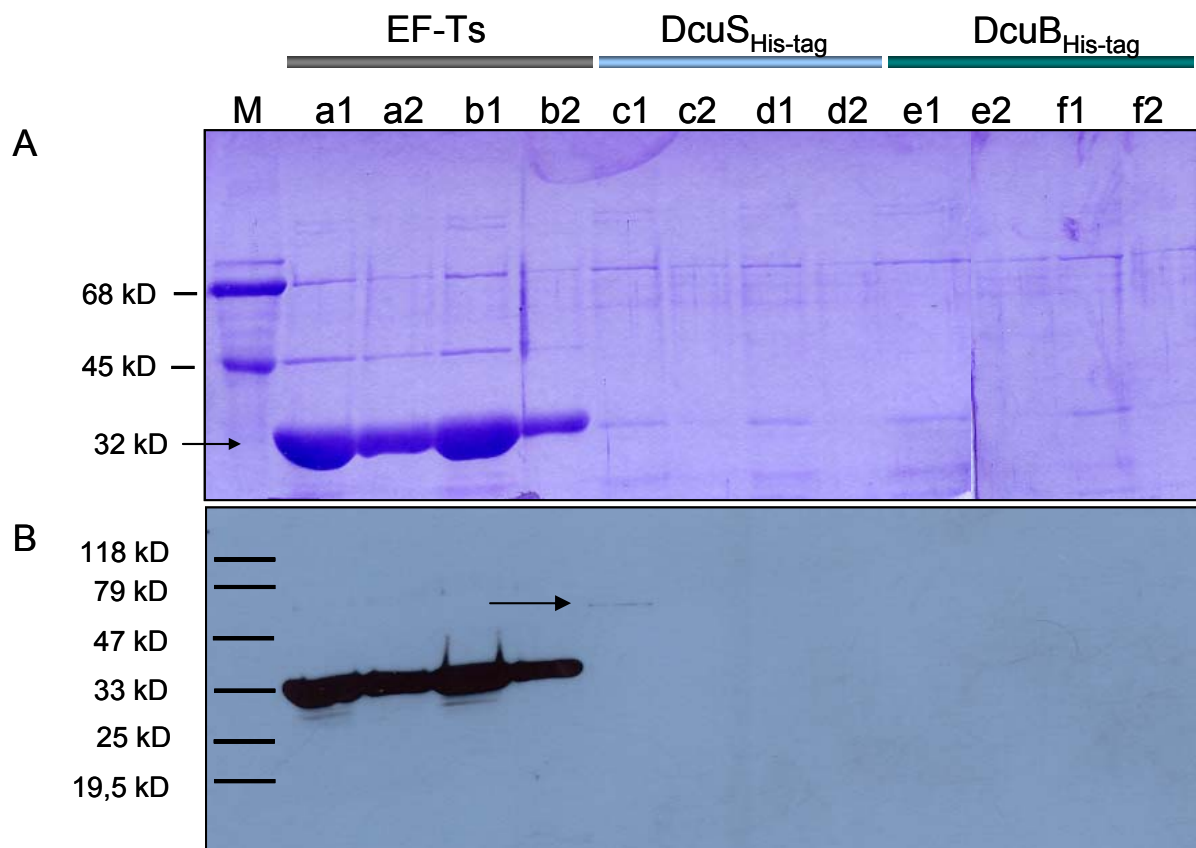


Abb. 27: Ergebnis der *in vitro* Translation von DcuS (hellblauer Balken), DcuB (türkisfarbener Balken) und dem *E. coli* Elongationsfaktor EF-Ts als Positivkontrolle (grauer Balken) mit dem EasyXpress Protein Synthesis Kit (Qiagen). Die Expression der Proteine erfolgte in Gegenwart von 0,05 % (a, c, e) oder 0,025 % (b, d, f) Triton-X-100. Die Elution erfolgte in zwei Schritten (1,2). Abbildung A zeigt eine elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-Page der gebildeten Proteine nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose. Der Pfeil markiert die Höhe des Elongationsfaktors. Abbildung B zeigt den Nachweis der gebildeten His-tag-Proteine mittels Western-Blot über den Penta-His-Antibody (Qiagen) und Chemilumineszenz. Der Pfeil markiert eine schwache Bande auf einer Höhe von ca. 63 kD, die DcuS_{His-tag} entspricht.

5. Diskussion

DcuB als zweiter „Fumarat-Sensor“ in der DcuSR-abhängigen Regulation

In *E. coli* werden die Gene der Fumaratatmung durch das Zweikomponentensystem DcuSR in Anwesenheit von Fumarat und anderen C₄-Dicarboxylaten induziert. Die Erkennung dieser Effektoren als extrazelluläre Signale erfolgt über die periplasmatische Domäne des Sensors DcuS (Six *et al.*, 1994; Kneuper *et al.*, 2005). Diese Arbeit zeigt, dass es neben DcuS weitere Proteine gibt, die einen Einfluss auf die Expression der von DcuSR kontrollierten Gene haben. Der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB beeinflusst die Expression des *dcuB* Gens und weiterer DcuSR-regulierter Gene. Andere Dcu-Carrier (DcuA, DcuC) zeigten diesen Effekt nicht. Im Wildtyp werden für die Stimulierung DcuSR-regulierter Gene Fumarat oder andere C₄-Dicarboxylate benötigt. In der *dcuB* Mutante fand jedoch bereits ohne Fumarat eine vollständige Induktion statt. Diese Stimulierung war nur in einem *dcuS*-positiven Hintergrund zu beobachten und ist folglich von dem Zweikomponentensystem abhängig. DcuB bestimmt somit die Funktion von DcuSR als C₄-Dicarboxylat-Sensor und -Regulator entscheidend mit.

Der Carrier DcuB dient offensichtlich als ein zweiter Sensor für die Erkennung von Fumarat. Es stellt sich somit die Frage, auf welche Art und Weise DcuB das DcuSR-System beeinflusst. Da der Effekt der *dcuB*-Mutation unabhängig von der Anwesenheit der alternativen Carrier DcuA und DcuC und damit der Versorgung der Zelle mit C₄-Dicarboxylaten ist, scheint nicht ein veränderter Stoffwechsel der Auslöser zu sein. Diese Annahme wird direkt durch die DcuB-Mutanten DcuB(Thr394Ile) und DcuB(Asp398Asn) belegt, in denen die Transport- und die Regulationsfunktion voneinander getrennt wurden. Dies spricht dafür, dass der DcuB-Effekt eine von der Transportfunktion unabhängige Eigenschaft des Carriers ist. DcuB reguliert die Genexpression daher wahrscheinlich über eine Interaktion mit dem Zweikomponentensystem.

Die regulatorischen Aminosäuren Thr394 und Asp398 liegen in den Strukturmodellen von DcuB entweder im Periplasma oder innerhalb der Transmembranhelix 10 (Abb. 14). Beide Modelle deuten daher auf eine Interaktion von DcuB mit einem Membranprotein hin. Der nahe liegende Kandidat hierfür ist DcuS. Abb. 28 zeigt in einem Modell, wie DcuB die Funktion von DcuS beeinflussen könnte und in welcher Form die Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuS stattfinden könnte. In dem Modell wird eine direkte Interaktion zwischen DcuB und DcuS angenommen. Aufgrund der konstitutiven Induktion der DcuSR-regulierten Gene in *dcuB* Mutanten würde eine solche Interaktion nur in Abwesenheit von Fumarat stattfinden. Der unbesetzte Carrier würde so den Sensor inhibieren und beispielsweise die Signaltransduktion über die Membran oder die Autophosphorylierung verhindern (Abb. 28

A). Als Folge würden die DcuSR-regulierten Gene nur schwach exprimiert. Sind nun C₄-Dicarboxylate vorhanden, so würden diese sowohl von DcuB als auch von DcuS gebunden (Abb. 28 B). In diesem Zustand hemmt DcuB die Funktion von DcuS nicht länger, und DcuS wird seinerseits durch die Bindung des Stimulus aktiviert. Die Expression der DcuSR-abhängigen Gene würde aktiviert werden. In einer *dcuB* Mutante würde diese Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuS nicht stattfinden (Abb. 28 C). DcuS wäre folglich nicht gehemmt, und die DcuSR-regulierten Gene wären bereits in Abwesenheit von Fumarat induziert.

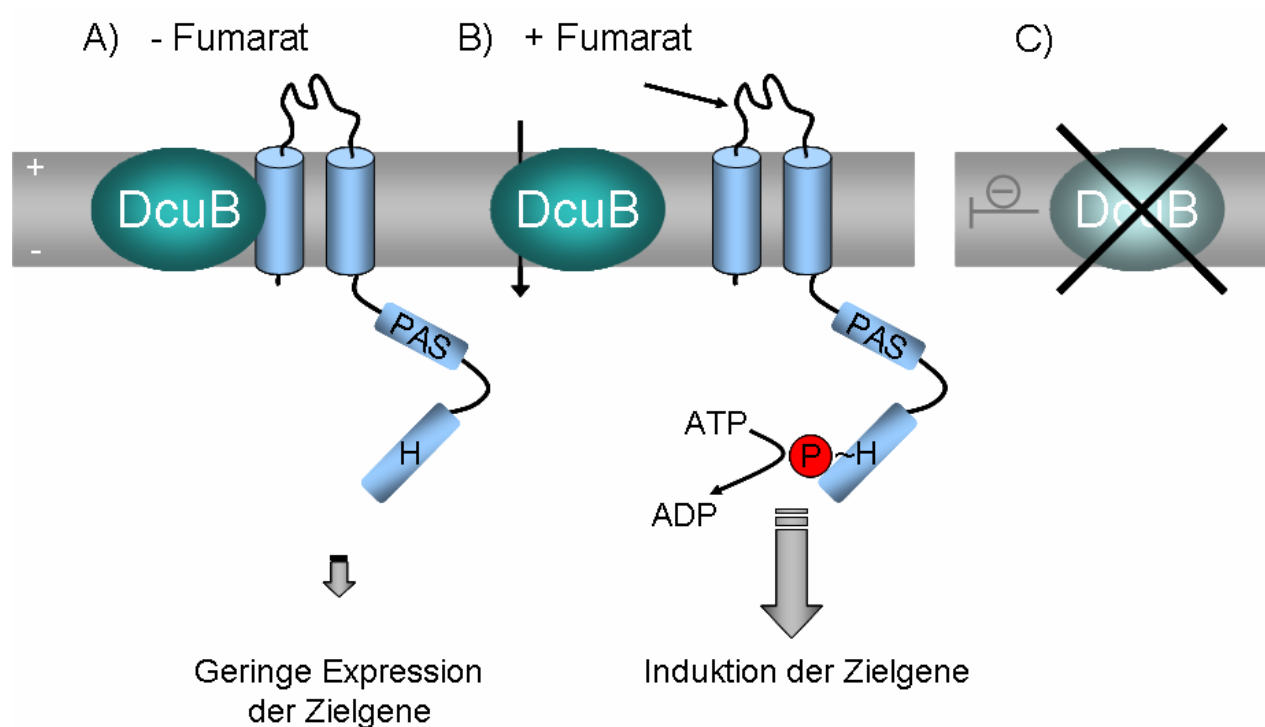


Abb. 28: Schema zur Interaktion zwischen DcuB und DcuS. In Abwesenheit von Fumarat interagiert DcuB mit DcuS und hemmt so den Sensor und die Genexpression (A). Ist Fumarat vorhanden, unterbleibt die Wechselwirkung, die Zielgene können exprimiert werden (B). In einer *dcuB* Mutante kann DcuS nicht gehemmt werden, die Genexpression ist auch ohne Fumarat induziert (C).

Die Expression von *dcuB* unterliegt einer komplexen Regulation. Neben der Aktivierung durch DcuSR wird seine Expression durch Sauerstoff über den Genregulator FNR (Fumarat- und Nitratreduktase Regulator) positiv und durch Nitrat über das Zweikomponentensystem NarXL negativ reguliert (Golby *et al.*, 1998). Die Expression von DcuSR ist dagegen weitgehend konstitutiv, nur in Anwesenheit von Nitrat sinkt die Expression über eine Repression durch NarL um den Faktor 5 (Goh *et al.*, 2005). Tatsächlich ist es also so, dass unter anaeroben Bedingungen und der Abwesenheit von Nitrat immer die gleiche Konzentration an DcuSR in der Zelle vorhanden ist, wohingegen die Konzentration von DcuB

variabel ist. Nach dem oben vorgestellten Modell bedeutet dies, dass in Abwesenheit von Fumarat nur geringe Mengen an DcuB vorhanden sind, diese aber ausreichen, um DcuSR zu inhibieren. Ist Fumarat vorhanden, steigt die Konzentration an DcuB, nicht aber die von DcuS. Obwohl das Verhältnis von DcuB zu DcuS steigt und mehr Carrier für die Hemmung von DcuS zu Verfügung steht, kann die Genexpression induziert werden. Dies ist nur so zu erklären, dass der Großteil der gebildeten DcuB-Proteine das Substrat bindet und so nicht mehr mit dem Sensor wechselwirkt, der seinerseits unabhängig durch die Effektorbindung aktiviert wird. Hierdurch ließe sich auch der Befund erklären, dass in einer *dcuB*-Mutante die Expression ohne Fumarat schon höher ist als im Wildtyp mit Fumarat. Danach würde im Wildtyp auch in Abwesenheit von Fumarat immer ein gewisser Anteil von DcuB, der nicht Substrat-beladen ist, an DcuS binden und dieses inhibieren. In einer *dcuB*-Mutante stünde DcuB nie zur Hemmung zur Verfügung, die Expression wäre daher höher als im Wildtyp unter induzierenden Bedingungen.

Nach dem in Abb. 28 vorgestellten Modell erkennen DcuB und DcuS die Anwesenheit von Substraten unabhängig voneinander. Die Substratbindung an einem der beiden Proteine sollte ausreichen, um die Hemmung des Systems durch eine Wechselwirkung zu unterbinden. So wäre es beispielsweise zu erklären, dass Maleinat die Expression DcuSR-abhängiger Gene induziert, obwohl es vom Carrier nicht transportiert werden kann (Six *et al.*, 1994). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob es Substrate gibt, die von DcuB transportiert, jedoch nicht von DcuS erkannt werden können. Einen Hinweis auf solche Substrate für DcuB könnte der Vergleich mit Substraten anderer C₄-Dicarboxylatcarrier liefern. Für DcuS ist bereits bekannt, dass nur Effektoren, deren beiden Carboxylgruppen in einem Abstand von 3,1 – 3,8 Å voneinander entfernt liegen, erkannt werden (Kneuper *et al.*, 2005). Auf diese Weise sollte es möglich sein, Substrate auszuwählen, die nur vom Transporter erkannt werden. In diesem Fall sollte auch die Substratbindung durch den Carrier die Wechselwirkung stören und eine Aktivierung des DcuSR-Systems ermöglichen.

In dem Knöllchenbakterium *Sinorhizobium meliloti* unterscheiden sich der Transporter DctA und der Sensor DctB des Zweikomponentensystems DctBD in der Erkennung von C₄-Dicarboxylaten (Yurgel *et al.*, 2000). Succinat und Fumarat werden von beiden Proteinen erkannt. Orotat, ein cyclisches Monocarboxylat wird nur von DctA erkannt und transportiert, das Dct-System wird davon nicht induziert. Aspartat und Maleinat werden hingegen nur vom Sensor erkannt, da Aspartat beim Transport von Orotat nur als schwacher Kompetitor wirkt und Maleinat den Transport gar nicht hemmt. Dies weist darauf hin, dass sich in diesem Fall Sensor und Carrier in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Sind DcuS und DcuB tatsächlich

zwei unabhängige Eingänge für die Signalerkennung, so sollte in Anwesenheit eines transportierbaren Substrates, das von DcuS nicht erkannt wird, die Expression von *dcuB* erhöht sein. Wäre dies nicht der Fall, würde dies zeigen, dass für die Signalbildung das Substrat immer direkt von DcuS erkannt werden muss.

Mögliche Wechselwirkungen zwischen DcuB und DcuS

Thr- und Asp-Reste sind an ihrem Hydroxyl- bzw. Carboxylrest phosphorylierbar. Der Effekt der Mutationen in DcuB scheint jedoch nicht mit dem Verlust von Phosphorylierungsstellen zusammenzuhängen, da die Mutante DcuB(Thr394Asn) normale Transportaktivitäten und eine Fumarat-Induktion zeigt. Für die Funktion scheint daher an Stelle 394 eine polare Aminosäure notwendig zu sein. Dies lässt darauf schließen, dass Thr394 und Asp398 an polaren bzw. ionischen Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren beteiligt sind. Mutagenese dieser Reste sollte zum Verlust der Interaktionen führen, die DcuSR-abhängige Genexpression wäre dann dereguliert. Aufgrund mangelnder Strukturinformationen zu DcuB kann die Lage der Punktmutationen nicht genau vorhergesagt werden. Da sie nach den vorgestellten Strukturmodellen entweder im Periplasma oder innerhalb einer Transmembranhelix liegen, könnten mögliche Interaktionsstellen in DcuS daher entweder in der periplasmatischen Domäne von DcuS oder innerhalb einer Transmembranhelix zu finden sein. Eine Interaktion mit der cytoplasmatischen PAS-Domäne von DcuS scheint nach diesen Annahmen weniger wahrscheinlich. PAS-Domänen sind in anderen Sensoren an der Dimerisierung beteiligt (Taylor *et al.*, 1999). Die Funktion der PAS-Domäne von DcuS ist unbekannt; bei geeigneter Topologie von DcuB könnte sie aber eine Rolle bei der Wechselwirkung mit DcuB spielen.

Alternativ könnte DcuB auch mit dem Responseregulator DcuR interagieren. Eine solche Wechselwirkung könnte die Bindung von DcuR an die DNA und somit die Aktivierung der Genexpression verhindern. Sind die Aminosäuren Thr394 und Asp398 an einer Interaktion beteiligt, sollten sie allerdings im Cytoplasma liegen. Bislang ist noch nicht bekannt, ob die Dephosphorylierung von DcuR von einer Phosphatase katalysiert wird oder ob dies ein spontaner Prozess ist. Eine solche Phosphatase wäre ein potentieller Interaktionspartner für DcuB, da auch hierüber die Aktivität von DcuSR und so die Expression reguliert werden kann. In dem osmoregulatorischen Zweikomponentensystem EnvZ/OmpR besitzt der Sensor EnvZ sowohl eine Kinase- als auch eine Phosphataseaktivität zur Regulation des Phosphorylierungszustandes des Responseregulators OmpR (Zhu *et al.*, 2000). Beide Aktivitäten werden von der cytoplasmatischen Domäne von EnvZ katalysiert. Es

ist denkbar, dass auch DcuS gleichzeitig als Kinase und Phosphatase fungieren kann. Eine Regulation der Phosphataseaktivität durch DcuB müsste in diesem Fall wieder durch eine Wechselwirkung mit dem Sensor geschehen.

Suche nach dem Interaktionspartner von DcuB

Die Experimente zeigten, dass die physiologische Funktion von DcuB (d. h. der Transport von Fumarat) unabhängig von der regulatorischen Funktion ist. Deshalb ist es nahe liegend, eine direkte Interaktion von DcuB mit den Proteinen der DcuS-Signalkette zu suchen. Für den Nachweis einer solchen Wechselwirkung stehen verschiedene proteinchemische, molekularbiologische und biophysikalische Methoden zur Verfügung. Da DcuB bislang nicht überproduziert und isoliert werden konnte, wurden die beiden letzteren Ansätze gewählt.

Das Standard Two-Hybrid-System aus Hefe ist für die Untersuchung von bakteriellen Membranproteinen nur eingeschränkt geeignet, da die Insertion und richtige Faltung der Proteine in eukaryotischen Membranen nicht gesichert ist und weil die Interaktion von zwei Membranproteinen kaum die notwendige Interaktion im Transkriptionskomplex zulässt. Aus diesem Grund wurden zwei bakterielle Two-Hybrid-Systeme verwendet, durch die eine Expression der Proteine in *E. coli* möglich ist. Besonders das BACTH-System (Karimova *et al.*, 1998) scheint prinzipiell gut geeignet für die Untersuchung von Membranproteinen, da die Interaktion der Testproteine nicht direkt mit einer DNA-Bindung verknüpft ist. Jedoch ist es auch bei diesem System nicht auszuschließen, dass Struktur und Insertion des Membranproteins durch die Verknüpfung mit einem Fusionsprotein gestört wird und daher Wechselwirkungen unterbleiben. Ein weiteres Problem im Fall von DcuB ist die unbekannte Lage von N- und C-Terminus. Es kann daher keine sichere Voraussage getroffen werden, auf welcher Seite der Membran die angehängten Fusionsproteine exprimiert werden. Es ist daher möglich, dass eine Interaktion stattfindet, aber nicht erkannt wird, da aufgrund der periplasmatischen Expression des angehängten Fusionsproteins dieses nicht in Kontakt mit der zweiten, cytoplasmatisch exprimierten Komponente des Two-Hybrid-Systems treten kann. Wie der Interaktionstest zwischen DcuS und DcuR mit dem BACTH-System außerdem zeigte, ist der Abstand der angehängten Fragmente ein kritischer Schritt bei der Identifizierung von Wechselwirkungen. Obwohl mit den getesteten Two-Hybrid-Systemen eine Interaktion von DcuB mit DcuS nicht nachgewiesen werden konnte, lassen sich aufgrund der geschilderten Probleme Wechselwirkungen zwischen DcuB und DcuS dennoch nicht ausschließen.

Zurzeit werden Wechselwirkungen zwischen DcuB und DcuS biophysikalisch mittels FRET (Fluorescence resonance energy transfer) untersucht (Scheu, Erker & Uden, unveröffentlicht). Mit dieser Methode wird der Fluoreszenztransfer zwischen zwei Chromophoren untersucht. Die beiden Chromophoren besitzen überlappende Absorptions- und Emissionsspektren, wodurch ein Energietransfer möglich ist. Durch Anregung des Donorchromophors mit Licht einer spezifischen Wellenlänge, emittiert dieser Licht, wodurch ein geeigneter Akzeptor angeregt werden kann. Fällt dieser wieder in seinen ursprünglichen Energiezustand zurück, emittiert er Licht einer größeren Wellenlänge. Über die Zunahme dieser Akzeptoremission lässt sich ein Fluoreszenztransfer messen. Eine Voraussetzung für den Fluoreszenztransfer ist die räumliche Nähe der Chromophoren (10-80Å), die in diesem Fall durch Wechselwirkung der angehängten Proteine zustande kommt. Als FRET-Paar werden in diesem Fall Varianten des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP), wie CFP (Cyan-fluoreszierendes Protein) und YFP (Gelb-fluoreszierendes Protein), verwendet, die mit den beiden potentiellen Interaktionspartnern fusioniert werden. Durch Expression dieser Fusionsproteine in *E. coli* werden zurzeit Interaktionen zwischen DcuB und DcuS *in vivo* untersucht. Allerdings wird auch in diesem System die Funktion von DcuB durch die Anhängung des Chromophors beeinträchtigt, so dass die FRET-Messungen bislang keinen Aufschluss über Wechselwirkungen zwischen Carrier und Sensor geben konnten (Scheu, 2005).

Zukünftig soll die Wechselwirkung von DcuB mit DcuS zusätzlich mittels Cross-Linking-Studien untersucht werden. Hierzu soll eine Methode verwendet werden, mit der gezielt nicht-natürliche Aminosäuren in die beiden Proteine mithilfe von modifizierten tRNAs und tRNA-Synthetasen eingebaut werden (Wang *et al.*, 2006). Aufgrund der besonderen chemischen Eigenschaften dieser Aminosäuren können sie *in vivo* und *in vitro* für Funktionsstudien genutzt werden. Zwei dieser künstlichen Aminosäuren, *p*-Azido-Phenylalanin und *p*-Benzoyl-Phenylalanin, tragen reaktive Seitenketten, die durch Anregung bei ca. 365 nm kovalent vernetzt werden können. So ist es möglich, *in vivo* zwei interagierende Proteine, in die an gezielten Stellen solche Aminosäuren eingebaut wurden, kovalent zu verknüpfen. Dadurch entstehen Proteinkomplexe mit einem höheren Molekulargewicht, die mittels SDS-PAGE und Western-Blot nachgewiesen werden können. So könnte beispielsweise durch Modifikation der Reste Thr394 und Asp398 überprüft werden, ob diese an direkten Interaktionen beteiligt sind. Die eingefügten Aminosäuren sollten allerdings die Funktion von Thr und Asp übernehmen können, damit DcuB in seiner Funktion nicht beeinträchtigt wird und Wechselwirkungen noch stattfinden können.

Vergleiche zwischen den Dcu-Carriern

Für die Reste Thr394 und Asp398 in DcuB konnte eine regulatorische Funktion nachgewiesen werden. Da angenommen wird, dass diese Reste an einer Interaktion mit DcuS beteiligt sind, stellt sich die Frage, ob sie auch in DcuB-Proteinen von Bakterien vorkommen, die kein DcuSR-System besitzen. Ein Alignment verschiedener DcuB-Sequenzen zeigte, dass beide Reste in allen gezeigten DcuB-Proteinen konserviert sind (Abb. 29). Dazu zählen auch die DcuB-Proteine aus *Wolinella succinogenes*, *Campylobacter jejuni* und *Corynebacterium diphtheriae*, die kein DcuSR-System besitzen.

Der Carrier DcuA ist in seiner Transportfunktion mit DcuB vergleichbar, besitzt aber keinen regulatorischen Einfluss. Die Aminosäuresequenz von DcuA aus *E. coli* weist eine Identität von 36% zu DcuB auf. Ein Alignment der Proteinsequenzen zeigt, dass Thr394 von DcuB auch in DcuA konserviert ist, nicht jedoch Asp398 (Abb. 29). Hier sitzt an entsprechender Stelle im DcuA-Protein ein Leucin. Dies gilt sowohl für Stämme mit als auch ohne DcuSR-System.

	*	20	*	40	*	60	*	
DCUB_ECOLI :	-----	MLFTIQ	LI	II	ILICLF	YGARKGGI	ALG	LLGGIGLVILV
DCUB_SHIFL :	-----	MLFTIQ	LI	II	ILICLF	YGARKGGI	ALG	LLGGIGLVILV
DCUB_ERWCT :	-----	MDFI	I	Q	LVI	VLI	CLFY	GARKGGI
DCUB_SALTI :	-----	MLFSIQ	LLI	II	ILICLF	YGARKGGI	ALG	LLGGIGLVILV
DCUB_SALCH :	-----	MLFSIQ	LLI	II	ILICLF	YGARKGGI	ALG	LLGGIGLVILV
DCUB_WOLSU :	-----	MEFFLQ	LLV	V	L	GLCLFY	GAKKGGI	ALG
DCUB_CAMJE :	-	MDFLT	SL	SE	AGQ	F	AI	QII
DCUB_CORDI :	MLAS	IL	D	P	T	S	G	I
DCUA_ECOLI :	-----	MLVVELI	I	V	LLA	I	F	L
DCUA_SHIFL :	-----	MLVVELI	I	V	LLA	I	F	L
DCUA_ERWCT :	-----	MLGLE	L	F	I	V	LLA	I
DCUA_SALTI :	-----	MIVVELI	I	V	LLA	I	F	L
DCUA_SALCH :	-----	MIVVELI	I	V	LLA	I	F	L
DCUA_WOLSU :	-----	MLVFE	I	L	V	L	L	A
DCUA_CAMJE :	-----	MDIMI	I	L	Q	V	I	V
DCUA_CORDI :	-----	MVFV	H	I	L	I	V	L
	80	*	100	*	120	*	140	
DCUB_ECOLI :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	IAE	KL	LR	R	N
DCUB_SHIFL :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	IAE	KL	LR	R	N
DCUB_ERWCT :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	LAER	M	L	R	R
DCUB_SALTI :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	IAE	KL	LR	R	N
DCUB_SALCH :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	IAE	KL	LR	R	N
DCUB_WOLSU :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	IAE	KL	LR	R	N
DCUB_CAMJE :	ATLQAS	GGLD	VMLQ	IAER	I	L	R	R
DCUB_CORDI :	ATLQ	Q	A	R	G	L	D	V
DCUA_ECOLI :	SAMQ	V	A	G	G	L	D	Y
DCUA_SHIFL :	SAMQ	V	A	G	G	L	D	Y
DCUA_ERWCT :	AAMQ	V	A	G	G	M	D	Y
DCUA_SALTI :	SAMQ	V	A	G	G	L	D	Y
DCUA_SALCH :	SAMQ	V	A	G	G	L	D	Y
DCUA_WOLSU :	AAMQ	V	A	G	G	L	D	Y
DCUA_CAMJE :	SAMQ	A	G	G	L	D	Y	M
DCUA_CORDI :	SAMQ	R	A	G	G	M	D	Y
	160	*	180	*	200	*	220	
DCUB_ECOLI :	IGAQMGI	I	A	S	P	V	S	V
DCUB_SHIFL :	IGAQMGI	I	A	S	P	V	S	V
DCUB_ERWCT :	IGAQMGI	I	A	S	P	V	S	V
DCUB_SALTI :	IGAQMGI	I	A	S	P	V	S	V
DCUB_SALCH :	IGAQMGI	I	A	S	P	V	S	V
DCUB_WOLSU :	ISSQMGI	C	A	S	P	V	S	V
DCUB_CAMJE :	ISSQMGI	I	A	S	P	V	S	V
DCUB_CORDI :	TAAQMGI	T	A	S	P	V	S	V
DCUA_ECOLI :	VSAQI	A	I	A	T	A	S	P
DCUA_SHIFL :	VSAQI	A	I	A	T	A	S	P
DCUA_ERWCT :	VASQI	A	I	A	T	A	S	P
DCUA_SALTI :	VSAQI	A	I	A	T	A	S	P
DCUA_SALCH :	VSAQI	A	I	A	T	A	S	P
DCUA_WOLSU :	VASQI	A	I	A	T	A	S	P
DCUA_CAMJE :	VSSQI	G	I	T	A	S	P	V
DCUA_CORDI :	PASQ	M	A	T	A	S	P	V

```

*          240          *          260          *          280          *
DCUB_ECOLI : FISVPENREYVYGDATLLDKKLPKSNWLAMWIFLGAIAVVALLGADSDLRPSFG-----GK : 265
DCUB_SHIFL : FISVPENREYVYGDATLLDKKLPKSNWLAMWIFLGAIAVVALLGADSDLRPSFG-----GK : 265
DCUB_ERWCT : FIADPENKQYVYGDATLLDRKLPKSNWVAMWIFLATIAAVVLLGAVEELRPVFA-----GK : 265
DCUB_SALTI : FISVPENRQYVYGDATLLDKKLPKSNWLAMWIFLAAIAVVALLGADSDLRPTFG-----GK : 265
DCUB_SALCH : FISVPENRQYVYGDATLLDKKLPKSNWLAMWIFLAAIAVVALLGADSDLRPTFG-----GK : 265
DCUB_WOLSU : FISNPNKQYVYGESATLLNQKLPQVWAMWIFLANIAVIALLGMPFELRPSFPAKGV-----LK : 271
DCUB_CAMJE : KLKDPKPEFKKYVYGDSTLLGVKLPKSNWVAMWIFLGAIALVALLGVDFDLRPNWQVVKNGIPQVDALGNPKMD : 293
DCUB_CORDI : RLKDPKPEFKKYVYSESHSLIGQRFKQAYRATGIFLGAIAIVVLLGAEWLRPSFPNSNGD-----LK : 282
DCUA_ECOLI : RLEEGLVELRGEKQ-----IEIKSGAKTSVWVFLLLGVVGVVYIAIINSPSMGLVEK-----P : 254
DCUA_SHIFL : RLEEGLVELRGEKQ-----IEIKSGAKTSVWVFLLLGVVGVVYIAIINSPSMGLVEK-----P : 254
DCUA_ERWCT : RLKKGETTRRSNSQ-----HEIKPGAKLSVWMLFLIGI IAVVLYATAISGTVGLIQN-----P : 254
DCUA_SALTI : RLEEGLIELRGEKQ-----IEIKPMAKNSVWVFLLLGVICVVVYIAIVNSPSLGLVEK-----P : 254
DCUA_SALCH : RLEEGLIELRGEKQ-----IEIKPMAKNSVWVFLLLGVICVVVYIAIVNSPSLGLVEK-----P : 254
DCUA_WOLSU : RVAKGMVKLRGQIQ-----YVAKPGAKLSVLI FLVGLI AVVYATAISKNVGLIQN-----P : 254
DCUA_CAMJE : RLKAGLVKDAAGVLIH-----GEDKPGAKLSVVI FLITVAVVLYATAISSNIKWIDP-----V : 259
DCUA_CORDI : RLADGLVAAPGKKES-----YVPTSAAKLSVGI FLVAIVAVMVYATLISDQVGLIAD-----P : 256

          300          *          320          *          340          *          360          *
DCUB_ECOLI : PLSMVLVIQMFMLLTGALII ILLTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKE : 339
DCUB_SHIFL : PLSMVLVIQMFMLLTGALII ILLTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKE : 339
DCUB_ERWCT : PLSMVLVIQMFMLLSGAI I I IATKTNPSSI SKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHLEIKATLGSIVKV : 339
DCUB_SALTI : PLLMVLVIQMFMLLTGALII ILLTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKE : 339
DCUB_SALCH : PLSMVLVIQMFMLLTGALII ILLTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKE : 339
DCUB_WOLSU : PMNMLTIQMFMLLAGALIVIFTKVDTSKISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAMMAETVFLAHLADMKASLGDVVKQ : 345
DCUB_CAMJE : VLSMVSVIQMFMLLAGSLI I I IFTKTDAKK IGSNEIFKSGMIALVAVFGISWMDTMFAVHTPMKKAALGDIVKE : 367
DCUB_CORDI : PLSMNLVIQMI MLVAGALMMLLCKVEPGK IASTTVFKAGMTAVFSVFGVAMADTFFQAHLDSLVDALSGVVQS : 356
DCUA_ECOLI : LMNTTNAILL IMLSVATLTTVICKVDTDN ILLNSSTFKAGMSACICILGVAVLGDTFVSNNDWKDTAGEVIQG : 328
DCUA_SHIFL : LMNTTNAILL IMLSVATLTTVICKVDTDN ILLNSSTFKAGMSACICILGVAVLGDTFVSNNDWKDTAGEVIQG : 328
DCUA_ERWCT : VLPRNEAIVVFMLTIATLITCITCKIDTSL ILSASTFKGMSACICVMGVAVLGDTFVKAHISIDIQTAGALLQS : 328
DCUA_SALTI : LMNTTNAILL IMLSVATLTTLCKVETDA ILLNSSTFKAGMSACICILGVAVLGDTFVSNANIDWKDTAGSVIQG : 328
DCUA_SALCH : LMNTTNAILL IMLSVATLTTLCKVETDA ILLNSSTFKAGMSACICILGVAVLGDTFVSNANIDWKDTAGSVIQG : 328
DCUA_WOLSU : IVGRDSAIMMFMLTTATLIAMFAKIDTDAVLNASTFKSGMTACICVLGVAVLGDTFVSNHINDIKGFAGGILEG : 328
DCUA_CAMJE : VVSRDAAIMSFLLTAAATLITWLCKVEPGK I LDTSVFKSGMTACVCFVGVAVLGNFTFVAGHEASIKVEAGDVVKQ : 333
DCUA_CORDI : ALPRNEAII MSMLTAAITTVMACKIPAGDILNTQVFRSGMSACVCLGVAVLGTTLINHYIEGIKGFSGDILER : 330

          380          *          400          *          420          *          440
DCUB_ECOLI : YPWAYAI VLLLVSKFVNSQAAALAAI VPVALAIG-----VDPAYIVASAPACYGYYILP IYPSDLAAIQFDR : 406
DCUB_SHIFL : YPWAYAI VLLLVSKFVNSQAAALAAI VPVALAIG-----VDPAYIVASAPACYGYYILP IYPSDLAAIQFDR : 406
DCUB_ERWCT : YPWAYAI ILLLVSKFVNSQAAALAAI VPVALAIG-----VDPAYIVASAPACYGYYILP IYPSDLAAIQFDR : 406
DCUB_SALTI : YPWAYAI VLLLVSKFVNSQAAALAAI VPVALAIG-----VDPAYIVASAPACYGYYILP IYPSDLAAIQFDR : 406
DCUB_SALCH : YPWAYAI VLLLVSKFVNSQAAALAAI VPVALAIG-----VDPAYIVASAPACYGYYILP IYPSDLAAIQFDR : 406
DCUB_WOLSU : HPWTYALM LLLVSKFLNSQAAAVATMVPVALGVG-----VEPGYILFAAAACYGYYILP IYPSDLATIOFDR : 412
DCUB_CAMJE : HPWTYAVM LLLISKFVNSQAAAI SAFVPLALGIG-----VEPGYIVAFAAACYGYYILP IYPSDLATIOFDR : 434
DCUB_CORDI : HAWAYALV LLLVSKLVNSQAAAI VAI VPLGLKLG-----LDPATVIGF IGAAYGYFLP IYPSDLACIGFDR : 423
DCUA_ECOLI : HPWLLAVI FFFASALLYSQAATAKALMPMALALN-----VSPLTAVASF AAVSGLF ILE IYPTLVAAVQMDD : 395
DCUA_SHIFL : HPWLLAVI FFFASALLYSQAATAKALMPMALALN-----VSPLTAVASF AAVSGLF ILE IYPTLVAAVQMDD : 395
DCUA_ERWCT : YPWMLAVV LFFAATLLYSQAATAKALMPAALLG-----VSPVTAVASF AAVSALFVLE IYPTLLAAVEMDD : 395
DCUA_SALTI : HPWLLAVI FFFASALLYSQAATAKALMPMALALN-----VSPLTAVASF AAVSGLF ILE IYPTLVAAVQMDD : 395
DCUA_SALCH : HPWLLAVI FFFASALLYSQAATAKALMPMALALN-----VSPLTAVASF AAVSGLF ILE IYPTLVAAVQMDD : 395
DCUA_WOLSU : HPWMLAIT LFFASMLLYSQAATAKALIPAAIALS-----VDPVTLIASFAAVSALFVLE IYPTLLAAVQMDD : 395
DCUA_CAMJE : TPAMLAIV FFFASMLLYSQAATAKAI VPV I I TALGISANPHDSYMLVACFAAVSALFVLE IYPTLLGAVQMDD : 407
DCUA_CORDI : SPWMLAVV LFAAALLYSQAATAKALIPAALAIG-----VSPLTVIASFAAVSALFVLE IYPTLLAAVEMDD : 397

*          460          *          480
DCUB_ECOLI : SGTTHIGRFVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL : 446
DCUB_SHIFL : SGTTHIGRFVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL : 446
DCUB_ERWCT : SGTTRIGRFVINHSFILPGLIGVSTSCVFGWVIFAAMYGFL : 446
DCUB_SALTI : SGTTRIGRFVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL : 446
DCUB_SALCH : SGTTRIGRFVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGFL : 446
DCUB_WOLSU : SGTTRIGKGFVINHSFILPGLIGVSTSCVFGFVILASVMGYV : 452
DCUB_CAMJE : SGTTHIGKGFVINHSFILPGLIGVITSCIAGYFIAMAAGYL : 474
DCUB_CORDI : TGTTRIGKYVLNHSFIIPGFICVIVSICVIGTVLAQVLL-- : 461
DCUA_ECOLI : TGTTRIGKGFVNHPFFIPGTLGVALAVCFGFVLSFML-- : 433
DCUA_SHIFL : TGTTRIGKGFVNHPFFIPGTLGVALAVCFGFVLSFML-- : 433
DCUA_ERWCT : TGSTRIGKGFVNHSFLIPGVIAITLSVIFGFILGSI-- : 433
DCUA_SALTI : TGTTRIGKGFVNHPFFIPGTLGVVLAICSGFLLGSFML-- : 433
DCUA_SALCH : TGTTRIGKGFVNHPFFIPGTLGVVLAIVCFGLLSFML-- : 433
DCUA_WOLSU : TGSTRIGKGFVNHPFFIVPGVLAIGISVALGFIVAPILL-- : 433
DCUA_CAMJE : TGTTRIGKGFVNHSFFIPGVLAIAIAVALGFVLAAPMLI-- : 445
DCUA_CORDI : TGSTRIGKAVFNHPFLIPGTVGIAISVALGFLLGGLIL-- : 435

```

Abb. 29.: Alignment der Aminosäuresequenzen von DcuB und DcuA aus Bakterien mit DcuSR-System (*E. coli*, *Shigella flexneri*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*) und Bakterien ohne DcuSR (*Wolinella succinogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium diptheriae*). Farblich markiert sind Thr394 und Asp398 von DcuB und die entsprechenden Reste in DcuA.

Die Lage der Transmembranhelices in DcuA wurde experimentell bestimmt (Golby *et al.*, 1998). DcuA enthält nach diesem Modell 10 Transmembranhelices. Die Helices 5 und 6 sind durch eine große, hydrophile Schleife im Cytoplasma voneinander getrennt, N- und C-

Terminus liegen im Periplasma (Abb. 30 A). Da das Topologiemodell für DcuB in diesem Fall von DcuA abgeleitet wurde, sind die Topologiemodelle vergleichbar. Bei der Berechnung der Sekundärstruktur von DcuA mit dem TMHMM Server 2.0 werden wie für DcuB 11 Transmembranhelices vorgeschlagen (Abb. 30 B). Das DcuA-Modell entspricht dabei einer Inversion des für DcuB vorgeschlagenen Modells. Da für die beiden Proteine eine ähnliche Struktur zu erwarten wäre und das DcuB-Modell die „positive-inside“-Regel (von Heijne, 1986; 1989; 1992) nicht erfüllt, ist es anzunehmen, dass das DcuB-Modell bei der Berechnung durch den TMHMM Server invertiert wurde. In diesem Fall wäre der N-Terminus von DcuB wie bei DcuA im Periplasma und die beiden regulatorischen Aminosäuren der Transmembranhelix 10 zur periplasmatischen Seite orientiert.

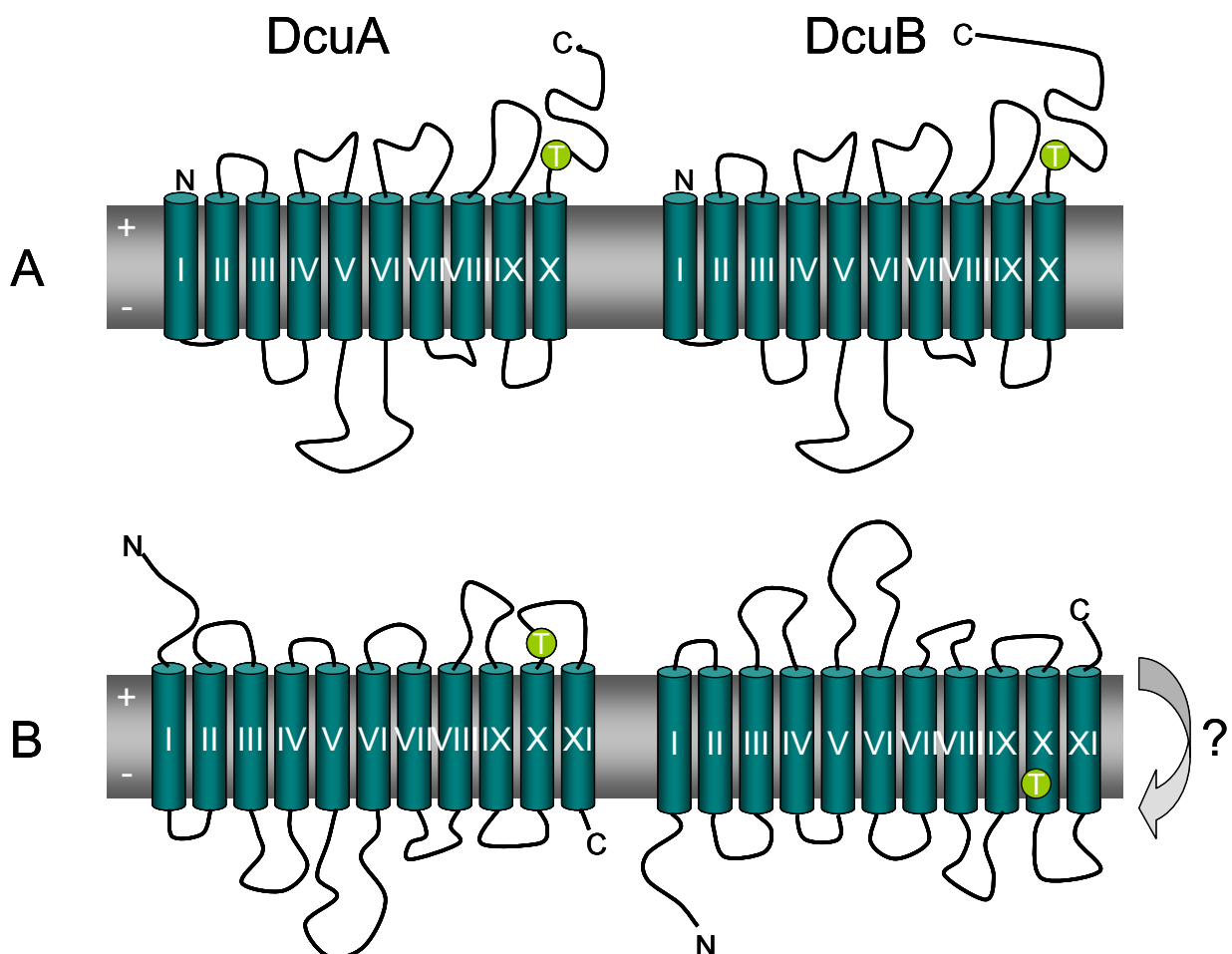


Abb. 30: Vergleich der Topologiemodelle von DcuA und DcuB. A) Strukturmodell nach experimenteller Bestimmung der Transmembranhelices in DcuA. Das Modell für DcuB wurde in Analogie zu DcuA erstellt. B) Topologie von DcuA und DcuB nach Berechnung mit dem TMHMM Server. Das DcuB-Modell wurde vermutlich bei der Berechnung invertiert.

Eine Inaktivierung von *dcuA* bewirkte keine Induktion der *dcuB* Expression. Tatsächlich ist die Expression in einer *dcuA*-Mutante ohne Fumarat immer etwas niedriger als in den Vergleichsstämmen. Trotz der hohen Sequenzidentität der beiden Proteine, strukturellen Ähnlichkeiten, vergleichbaren Transportkapazitäten und dem Vorhandensein des regulatorischen Thr-Restes besitzt DcuA nicht die gleichen regulatorischen Eigenschaften wie DcuB. Es scheint daher noch weitere Faktoren zu geben, die DcuB zu einem zweiten Fumarat-Sensor machen, nicht aber DcuA.

DcuC katalysiert ebenfalls Gegentausch, Aufnahme und Efflux von C₄-Dicarboxylaten, seine Hauptfunktion scheint jedoch der Efflux von Succinat bei der Fermentation von Glucose zu sein (Zientz *et al.*, 1996). DcuC ist Teil der DcuC-Familie von Transportern und besitzt 24% Identität zu DcuB (Zientz *et al.*, 1996; Janausch *et al.*, 2001). Thr394 und Asp398 sind in DcuC nicht konserviert, an entsprechender Stelle in DcuC sitzen ein Arginin- und ein Phenylalanin-Rest (Abb. 31). DcuC kann teilweise die Transportfunktion von DcuA und DcuB übernehmen, eine sensorische Funktion scheint dieser Carrier jedoch nicht zu erfüllen, was aufgrund der geringen Ähnlichkeit und dem Fehlen von Thr394 und Asp398 erklärbar ist.


```

*      20      *      40      *      60      *
DCUB_ECOLI : -----MLFTTQLIIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPGKPPVDVMLVI IAVVAASA : 63
DCUB_SHIFL : -----MLFTTQLIIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPGKPPVDVMLVI IAVVAASA : 63
DCUB_ERWCT : -----MDFIIQLVIVLILICLFYGARKGGIALGLLGGVGLVILVVFIFKLQPGKPPVDVMLVI IAVVAASA : 63
DCUB_SALTI : -----MLFSIQLLIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPGKPPVDVMLVI IAVVAASA : 63
DCUB_SALCH : -----MLFSIQLLIILICLFYGARKGGIALGLLGGIGLVILVVFVHLPQPGKPPVDVMLVI IAVVAASA : 63
DCUC_ECOLI : -MLTFIELLIIGVVIVGVARYI IKGYSATGVLFVGGLLLLLII SAIMGHKVLPSSQASTGYSATDIVEYVKILLM : 73
DCUC_SHIFL : -MLTFIELLIIGVVIVGVARYI IKGYSATGVLFVGGLLLLLII SAIMGHKVLPSSQASTGYSATDIVEYVKILLM : 73
DCUC_ERWCT : ---MLELLIGVAVTILVGRYI IKGYSATGVLLVGGLLLLLII SAMLGKNILPASVKATGWSATDIFEYVKILLM : 70
DCUC_SALTI : -MLTVIELLIIGVVIVGVARYI IKGYSATGVLFVGGVLLLII SALMGHKVLPASETSTGYTATDIVEYKILLM : 73
DCUC_SALCH : -MLTVIELLIIGVVIVGVARYI IKGYSATGVLFVGGVLLLII SALMGHKVLPASETSTGYTATDIVEYKILLM : 73

*      80      *      100     *      120     *      140
DCUB_ECOLI : TLQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYITILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSI : 137
DCUB_SHIFL : TLQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYITILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSI : 137
DCUB_ERWCT : TLQASGGLDVMLQIAERMLRRNPKYVSIAPFVTCTLTILCGTGHVVYITILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSI : 137
DCUB_SALTI : TLQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYITILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSI : 137
DCUB_SALCH : TLQASGGLDVMLQIAEKLLRRNPKYVSIVAPFVTCTLTILCGTGHVVYITILPIIYDVAIKNNIRPERPMAASSI : 137
DCUC_ECOLI : SRGGDLGMMIMMLCGFAAYMTHIGANDMVVVLASKPLQYINSPYLLMIAAYFVACLMSLAVSSATGLGVLLMAT : 147
DCUC_SHIFL : SRGGDLGMMIMMLCGFAAYMTHIGANDMVVVLASKPLQYINSPYLLMIAAYFVACLMSLAVSSATGLGVLLMAT : 147
DCUC_ERWCT : SRGGDLGMMIMMLCGFAAYMTHIGANDVVVVLVSRPLKMINSPYLLMIAAYFVACLMSLAVSSATGLGVLLMAT : 144
DCUC_SALTI : SRGGDLGMMIMMLCGFAAYMTHIGANDMVVVLASKPLQYINSPYLLMIAAYFVACLMSLAVSSATGLGVLLMAT : 147
DCUC_SALCH : SRGGDLGMMIMMLCGFAAYMTHIGANDMVVVLASKPLQYINSPYLLMIAAYFVACLMSLAVSSATGLGVLLMAT : 147

*      160     *      180     *      200     *      220
DCUB_ECOLI : GAQMGI IASPVSVAVVSLVAMLGN-VTFDGRHLEFLDLLAITIPSTLIGILAIGIFSWFRGKDLKDEEFQKFI : 210
DCUB_SHIFL : GAQMGI IASPVSVAVVSLVAMLGN-VTFDGRHLEFLDLLAITIPSTLIGILAIGIFSWFRGKDLKDEEFQKFI : 210
DCUB_ERWCT : GAQMGI IASPVSVAVVSLVAMLAN-FTFQKHLGFLDLSITIPSTLLGILAIGIFSWFRGKDLKDPDFQKFI : 210
DCUB_SALTI : GAQMGI IASPVSVAVVSLVAMLGN-VTFDGHLEFLDLSITIPSTLLGILAIGIFSWFRGKDLKDEAFQKFI : 210
DCUB_SALCH : GAQMGI IASPVSVAVVSLVAMLGN-VTFDGHLEFLDLSITIPSTLLGILAIGIFSWFRGKDLKDEAFQKFI : 210
DCUC_ECOLI : LFPVMVNVGISRGA AAAICASPAAI ILAPTSGDVVLAQAASEMSLIDFAFKTTLPI SIAAI IGMAIAHFFWQRY : 221
DCUC_SHIFL : LFPVMVNVGISRGA AAAICASPAAI ILAPTSGDVVLAQAASEMSLIDFAFKTTLPI SIAAI IGMAIAHFFWQRY : 221
DCUC_ERWCT : LFPVMVNVGISRGA AAAICASPVALILSPTSGDVVLAQAASQMKLVDFAFKATLPI SIAI IAVCMVAHFFWQRY : 218
DCUC_SALTI : LFPVMVNVGISRGA AAAICASPAAI ILSPTSGDVVLAAKAAEMPLIDFAFKTTLPI SIAAI IGMAIAHFFWQRY : 221
DCUC_SALCH : LFPVMVNVGISRGA AAAICASPAAI ILSPTSGDVVLAAKAAEMPLIDFAFKTTLPI SIAAI IGMAIAHFFWQRY : 221

*      240     *      260     *      280     *
DCUB_ECOLI : SVPENREYVYGDATALLDKKLPKSNWLA MWIFLGAIAVVALLGADSDLRPSFG-----GKPL : 267
DCUB_SHIFL : SVPENREYVYGDATALLDKKLPKSNWLA MWIFLGAIAVVALLGADSDLRPSFG-----GKPL : 267
DCUB_ERWCT : ADPENRQYVYGDATALLDRKLPRSNWVAMIFLATAIAAVVLAGAVEELRPVFA-----GKPL : 267
DCUB_SALTI : SVPENRQYVYGDATALLDKKLPKSNWLA MWIFLGAIAVVALLGADSDLRPTFG-----GKPL : 267
DCUB_SALCH : SVPENRQYVYGDATALLDKKLPKSNWLA MWIFLGAIAVVALLGADSDLRPTFG-----GKPL : 267
DCUC_ECOLI : LD--KKEHISHEMLDVSEITTTAPAFYAILPFTPI IGVLIFDGKWPQLHI IT-----ILVIC : 277
DCUC_SHIFL : LD--KKEHISHEMLDVSEITTTAPAFYAILPFTPI IGVLIFDGKWPQLHI IT-----ILVIC : 277
DCUC_ERWCT : LD--NKENASHEILDVSEITTTNTPRFYAILPFTPI MGVLVFDGKWPQLHI IT-----VLVIC : 274
DCUC_SALTI : LD--KKENISHEMLDVAEITTTAPAFYAILPFTPI IGVLIFDGKWPQLHI IT-----ILVIC : 277
DCUC_SALCH : LD--KKENISHEMLDVAEITTTAPAFYAILPFTPI IGVLIFDGKWPQLHI IT-----ILVIC : 277

*      300     *      320     *      340     *      360     *
DCUB_ECOLI : SMVLVIQMFMLLTGALII IILTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGI AWMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP : 341
DCUB_SHIFL : SMVLVIQMFMLLTGALII IILTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGI AWMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP : 341
DCUB_ERWCT : SMVLVIQMFMLLSGALII IIAKTKNPSISKNEVFRSGMIAIVAVYGI AWMAETMFGAHLEEKATLGLSLVKEYP : 341
DCUB_SALTI : LMVLVIQMFMLLTGALII IILTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGI AWMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP : 341
DCUB_SALCH : SMVLVIQMFMLLTGALII IILTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGI AWMAETMFGAHMSEIQGVLGEMVKEYP : 341
DCUC_ECOLI : MLIASILEFLRSFNQKVFSGLEVAYRGMADAFANVVMLLVAAGVFAQGLSTIGFIQSLISIATSFGSASI ILM : 351
DCUC_SHIFL : MLIASILEFLRSFNQKVFSGLEVAYRGMADAFANVVMLLVAAGVFAQGLSTIGFIQSLISIATSFGSASI ILM : 351
DCUC_ERWCT : MVLAAVLEFVRSFNNAKVFVFDGLDVAYRGMADAFSSVVILLVAAGVFAQGLTIGFISGLIQLAQSFGSGGLVIM : 348
DCUC_SALTI : MLLAAVLEFVRGNTQNVFSGLEVAYRGMADAFAGVVMLLVAAGVFAQGLSTIGFIQSLISIATSFGSASI ILM : 351
DCUC_SALCH : MLLAAVLEFVRGNTQNVFSGLEVAYRGMADAFAGVVMLLVAAGVFAQGLSTIGFIQSLISIATSFGSASI ILM : 351

*      380     *      400     *      420     *      440
DCUB_ECOLI : WAYAIVLLLVS K FVNSQAAALAAI VPVALAIGVDPAYIVASAPA-CYGYIILETPSDLAAIQFDRSGTTHIGR : 414
DCUB_SHIFL : WAYAIVLLLVS K FVNSQAAALAAI VPVALAIGVDPAYIVASAPA-CYGYIILETPSDLAAIQFDRSGTTHIGR : 414
DCUB_ERWCT : WAYAIVLLLVS K FVNSQAAALAAI VPVALAIGVDPAYIVASAPA-CYGYIILETPSDLAAIQFDRSGTTHIGR : 414
DCUB_SALTI : WAYAIVLLLVS K FVNSQAAALAAI VPVALAIGVDPAYIVASAPA-CYGYIILETPSDLAAIQFDRSGTTRIGR : 414
DCUB_SALCH : WAYAIVLLLVS K FVNSQAAALAAI VPVALAIGVDPAYIVASAPA-CYGYIILETPSDLAAIQFDRSGTTRIGR : 414
DCUC_ECOLI : LVLVILTMLAAVTTGSGNAPFYAFVEMIPKLAHSSGINPAYLTI PMLQASNLGRITLSPVSGVVAVAGMAKISP : 425
DCUC_SHIFL : LVLVILTMLAAVTTGSGNAPFYAFVEMIPKLAHSSGINPAYLTI PMLQASNLGRITLSPVSGVVAVAGMAKISP : 425
DCUC_ERWCT : LVLVITMLAAMTTGSGNAPFYAFVELIPKLAHQMGINPAYLAIPMLQASNLGRITLSPVSGVVAVAGMAKISP : 422
DCUC_SALTI : LVLVILTMLAAMTTGSGNAPFYAFVEMIPKLAHSSGINPAYLSIPMLQASNLGRITLSPVSGVVAVAGMAKISP : 425
DCUC_SALCH : LVLVILTMLAAMTTGSGNAPFYAFVEMIPKLAHSSGINPAYLSIPMLQASNLGRITLSPVSGVVAVAGMAKISP : 425

*      460     *      480
DCUB_ECOLI : FVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGF----- : 446
DCUB_SHIFL : FVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGF----- : 446
DCUB_ERWCT : FVINHSFIFPGLIGVSTSCVFGWVFAAMYGF----- : 446
DCUB_SALTI : FVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGF----- : 446
DCUB_SALCH : FVINHSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAAMYGF----- : 446
DCUC_ECOLI : FEVVKRTSVPVLVGLVIVIVATELMPVPGTAAAVTGK : 461
DCUC_SHIFL : FEVVKRTSVPVLVGLVIVIVATELMPVPGTAAAVTGK : 461
DCUC_ERWCT : FEVVKRTSVPVLVGLVIVVVVATEIMIPA----- : 450
DCUC_SALTI : FEVVKRTSVPVIVGLLIVIVATEIMVPGASSAVTGK : 461
DCUC_SALCH : FEVVRRTSVPVIVGLLIVIVATEIMVPGASSAVTGK : 461

```

Abb. 31.: Alignment der Aminosäuresequenzen von DcuB und DcuC aus *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Erwinia carotovora*, *Salmonella typhi* und *Salmonella cholerae-suis*. Farblich markiert sind Thr394 und Asp398 von DcuB und die entsprechenden Reste in DcuC.

DctA als „Sensor“ im aeroben Stoffwechsel

Der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB wird in *E. coli* nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert aber auch Gene des aeroben C₄-Dicarboxylat-Stoffwechsels. Offensichtlich übernimmt der Succinat-Aufnahme-Carrier DctA unter aeroben Bedingungen die Rolle von DcuB. Die Expression von *dctA* wird durch DcuSR und Succinat stimuliert. In einer *dctA* Mutante hingegen war die Expression von *dctA* auch in Abwesenheit von C₄-Dicarboxylaten stark stimuliert, konnte aber durch Zugabe von Succinat weiter stimuliert werden. Damit zeigte die Expression von *dctA* gewisse Parallelen zu der von *dcuB* bezüglich der Abhängigkeit von dem regulierten Carrier. Möglicherweise gibt es aber noch ein weiteres Regulationssystem für Succinat, das die Expression von *dctA* beeinflusst.

Unter anaeroben Bedingungen hatte die Inaktivierung von *dcuB* einen ähnlichen Effekt auf die Expression von *dctA* wie auf die von *dcuB*, obgleich die Expression von *dctA* anaerob schwach ist. Es scheint somit, als würde die Funktion des Zweikomponentensystems DcuSR sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen durch C₄-Dicarboxylat-Carrier moduliert (Abb. 32). Obwohl die beiden Carrier unter zwei verschiedenen Bedingungen exprimiert werden, können sie scheinbar über die Wechselwirkung mit DcuS auch gegenseitig ihre Expression beeinflussen.

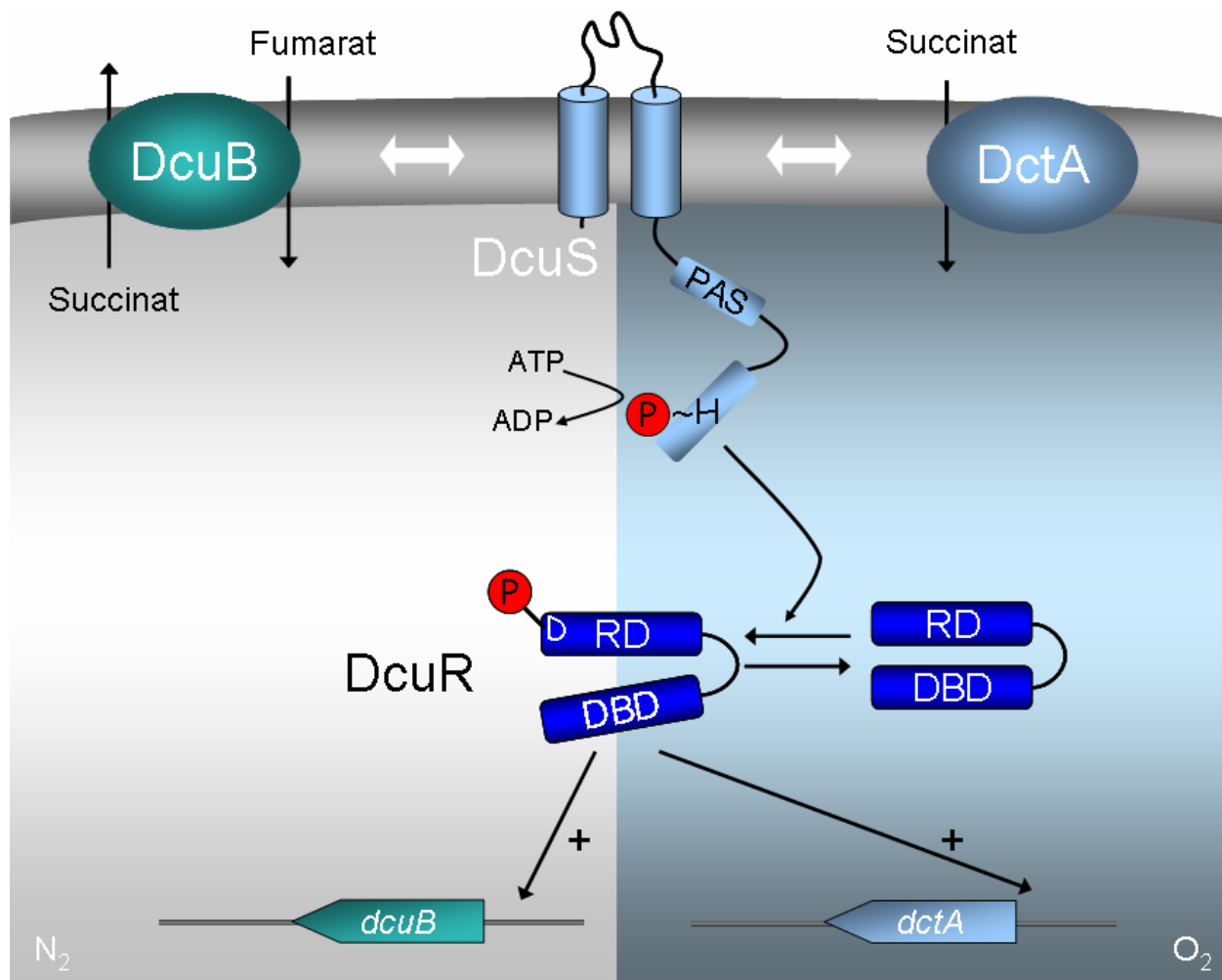


Abb. 32: Modell zur Wechselwirkung zwischen dem anaeroben Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB und dem aeroben Succinat-Aufnahme-Carrier DctA mit dem Zweikomponentensystem DcuSR. Unter anaeroben Bedingungen (N_2) hemmt DcuB in Abwesenheit von Fumarat die Funktion des Zweikomponentensystems DcuSR über Interaktion mit der Sensorkinase DcuS. In Anwesenheit von Fumarat wird die Interaktion gestört, DcuS kann an dem konservierten Histidinrest der Transmitterdomäne phosphoryliert werden. Nach Übertragung des Phosphatrests auf den Responseregulator DcuR kann dieser die Transkription seiner Zielgene (*dcuB*) aktivieren. Unter aeroben Bedingungen (O_2), in Abwesenheit von Succinat, unterbindet DctA in analoger Weise die Aktivierung DcuS. Ist Succinat vorhanden, kann DctA nicht mehr mit DcuS interagieren und die Expression der DcuSR-abhängigen Gene (*dctA*) wird stimuliert.

Ein Alignment von DcuB und DctA zeigt, dass Thr394 von DcuB gegen einen Serin-Rest (Ser 380) in DctA ausgetauscht ist. Der Austausch Thr394Ser hatte keine Auswirkungen auf die Funktion von DcuB. Möglicherweise erfüllt Ser380 in DctA die gleiche Funktion wie Thr394 in DcuB und vermittelt eine Wechselwirkung mit DcuS. Eine Berechnung der Sekundärstruktur sagt für DctA acht Transmembranhelices voraus. Nach diesem Modell liegt Ser380 im Cytoplasma sechs Aminosäuren nach der letzten Transmembranhelix (Abb. 33). In diesem Fall wäre eine Wechselwirkung mit DcuS nur über cytoplasmatische Bereiche möglich. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob Substitution von Ser380 durch einen

unpolaren Rest die Expression des *dctA*-Gens induziert und dieser Rest die gleiche Funktion wie Thr394 in DcuB erfüllt.

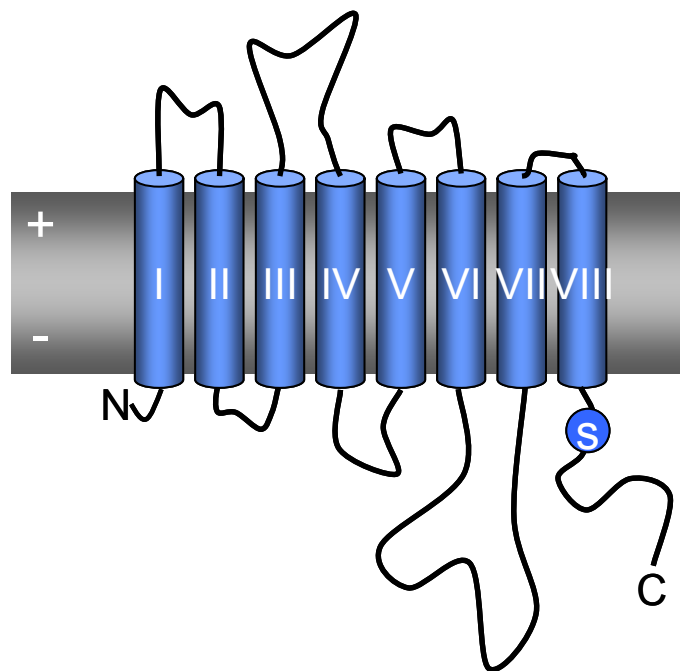


Abb. 33: Sekundärstruktur von DctA, berechnet mit dem TMHMM Server 2.0. Ser380 liegt sechs Aminosäuren hinter der letzten Transmembranhelix.

Carrier als Sensoren

In Bakterien gibt es verschiedene Beispiele für Carrier, die gleichzeitig an Transport und Signalerkennung beteiligt sind. Ein solches Beispiel ist der C₄-Dicarboxylattransporter DctA des Knöllchenbakteriums *Rhizobium leguminosarum* (Reid *et al.*, 1998). Die Expression von *dctA* wird von dem Zweikomponentensystem DctBD, bestehend aus der Sensorkinase DctB und dem Responseregulator DctD, kontrolliert. Die Expression von *dctA* wird in Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten wie Succinat und Aspartat induziert. Es wird angenommen, dass DctA durch eine Interaktion mit dem Sensor DctB seine eigene Expression beeinflusst. Sind keine C₄-Dicarboxylate vorhanden, kann der Carrier mit DctB interagieren und so dessen Aktivierung verhindern. Werden C₄-Dicarboxylate von DctA gebunden, stört dies die Interaktion zwischen DctA und DctB. DctB kann so freigesetzt und aktiviert werden. DctA ist außerdem für die Signalspezifität von DctB wichtig. In Abwesenheit von DctA ist DctB weniger sensitiv für C₄-Dicarboxylate und die DctB-abhängige Genexpression reagiert auf ein breiteres Spektrum von Substraten. DctB wird in einer *dctA* Mutante beispielsweise auch von Asparagin und verschiedenen Succinat-Analoga wie 2-Methyl-Succinat oder 2,2-Dimethyl-Succinat aktiviert. In diesem System wäre DctB zwar der direkte Sensor für C₄-Dicarboxylate, DctA wäre aber für die richtige Signalerkennung und -spezifität notwendig. Es

gibt jedoch keine Untersuchungen, wie und auf welcher Ebene die Regulation durch den Carrier beeinflusst wird.

Das Phosphat-(PHO)-Regulon aus *E. coli* umfasst mehr als 30 Gene, die für die Assimilation von anorganischem Phosphat (P_i) zuständig sind (Wanner, 1993). Die Expression dieser Gene wird von dem Zweikomponentensystem PhoRB kontrolliert. Die Sensorkinase PhoR kann dabei einerseits als Aktivator fungieren und über die Phosphorylierung des Responseregulators PhoB die Genexpression aktivieren oder als Repressor die Dephosphorylierung von PhoB katalysieren (Makino *et al.*, 1989). Die Genexpression wird in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration an P_i reguliert. Ist Phosphat im Überschuss vorhanden, wird es von einem Transporter (Pit) mit niedriger Affinität aufgenommen, der nicht unter der Kontrolle des PHO-Regulons steht. Sinkt die Konzentration an Phosphat, wird die Synthese des hoch-affinen Transporters PstSCAB induziert. Es wird angenommen, dass unter reprimierenden Bedingungen der Transporter einen Komplex mit einem weiteren Protein mit unbekannter Funktion, PhoU, bildet und so die Expression des PHO-Regulons negativ reguliert. Die Repression ist nicht vom eigentlichen P_i -Transport durch den PstSCAB-Transporter abhängig (Cox *et al.*, 1989). Auch in diesem System könnte die Regulation über eine Interaktion des Transporterkomplexes mit dem P_i -Sensor PhoR vermittelt werden (Steed *et al.*, 1993).

Die Aufnahme von Glucose-6-Phosphat (Glc6P) erfolgt in *E. coli* durch den Transporter UhpT. Dessen Gen ist Teil des *uhp*-Operons zusammen mit den Genen der Sensorkinase UhpB, des Transkriptionsaktivators UhpA und UhpC, einem membranständigen Sensor für extrazelluläres Glc6P (Kadner *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass UhpC in Anwesenheit von Glc6P die Autophosphorylierung von UhpB induziert. UhpB~P transferiert den Phosphatrest auf UhpA, der die Expression von *uhpT* aktiviert (Wright *et al.*, 2001). Die Expression von *uhpC* ist dagegen konstitutiv und daher unabhängig von der Anwesenheit von extrazellulärem Glc6P. Die Aminosäuresequenz von UhpC besitzt eine 32%ige Identität zu der des Transporters UhpT und für beide Proteine wurde eine Membrantopologie von 12 Transmembranhelices vorhergesagt. Neben der sensorischen Funktion konnte für UhpC auch der Antiport von Glc6P/ P_i nachgewiesen werden (Schwöppe *et al.*, 2002). Die Transportaktivität von UhpC ist allerdings niedriger als die von UhpT und reicht nicht zum Wachstum auf Glc6P. In diesem System fungiert daher der weniger aktive, nicht regulierte Carrier als Sensor. Mithilfe von Punktmutanten konnte gezeigt werden, dass die Transportfunktion des Carriers von dessen sensorischer Funktion unabhängig ist (Schwöppe *et al.*, 2003). Mutagenese von vier Arginin-Resten führte ohne Glc6P zur vollen Induktion des

uhpT-Gens. UhpC könnte so in eine aktivierte, induzierende Konformation überführt worden sein, die die Transportfähigkeit nicht verändert. Die Einführung einer intramolekularen Salzbrücke, die in UhpT vorhanden ist, führte hingegen bei UhpC zu einer erhöhten Transportaktivität und dem Verlust der sensorischen Funktion. Durch Entfernen der Salzbrücke in UhpT konnte dieser allerdings nicht in einen Transporter umgewandelt werden. Auch in diesem Fall scheint es weitere Faktoren zu geben, die UhpC, nicht aber UhpT zu einem Transporter mit sensorischer Funktion machen.

Der Carrier BetP von *Corynebacterium glutamicum* katalysiert die Aufnahme von Glycin mit Betain, einem kompatiblen Solut, um die Zelle vor hyperosmotischem Stress zu schützen (Csonka, 1989). BetP fungiert dabei sowohl als Osmosensor als auch als Osmoregulator (Rübenhagen *et al.*, 2000). Der Transporter weist in seiner Strukturvorhersage cytoplasmatisch lokalisierte Bereiche an N- und C-Terminus auf, die essentiell für die Regulation der Transportaktivität in Abhängigkeit von der externen Osmolalität sind (Peter *et al.*, 1998). Die Transportaktivität von BetP ist so über den physiologischen Zustand der Zelle regulierbar. Durch einen Anstieg der externen Osmolalität steigt auch die Transportaktivität von BetP (Morbach & Krämer, 2005). Durch eine Verkürzung der N-terminalen und der C-terminalen Enden verliert BetP seine Funktion als Osmosensor, die Fähigkeit zum Transport bleibt jedoch erhalten. Als osmotisches Signal wird von BetP vermutlich die interne Konzentration an K^+ -Ionen erkannt (Rübenhagen *et al.*, 2001). Durch die Aufnahme von kompatiblen Soluten kann BetP die Zelle vor osmotischem Stress schützen. Durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus kann BetP die Aufnahmeaktivität von Betain wieder reduzieren, wenn in der Zelle genügend kompatible Solute vorhanden sind (Morbach & Krämer, 2005). Das eigentliche Signal, das dabei von BetP erkannt wird, ist jedoch noch nicht bekannt.

Thr394 und Asp398 von DcuB liegen am C-terminalen Ende, jedoch nicht im Cytoplasma. Verkürzungen am C-Terminus von DcuB führten zum Verlust sowohl der Regulations- als auch der Transportfunktion in Funktionstests. Der Funktionsverlust könnte damit zusammenhängen, dass die verkürzte Form von DcuB nicht gebildet oder eingebaut wird. Ein Sequenzvergleich der beiden Carrier ergab keine signifikanten Übereinstimmungen, die auf eine Verwandtschaft der sensorischen Bereiche zu dem C-terminalen Ende von BetP hinweisen.

Ein Beispiel für ein Transportsystem mit Beteiligung einer periplasmatischen Transportkomponente an der Signalerkennung ist der Tripartit-Tricarboxylat-Transporter BctCBA aus *Bordetella pertussis*. BctCBA katalysiert die Aufnahme von Citrat (Antoine *et*

al., 2003). Er besteht aus dem periplasmatischen Substratbindeprotein BctC sowie den beiden membranständigen Proteinen BctB und BctA. Die Expression des *bctCBA*-Operons wird in Anwesenheit von Citrat im Medium induziert. Die Expression wird dabei sowohl von BctC selbst als auch von dem Zweikomponentensystem BctDE kontrolliert, wobei BctE der Sensor und BctD der Responseregulator ist (Antoine *et al.*, 2005). Das Zweikomponentensystem ist für die Transkription des *bctCBA*-Operons notwendig, eine Induktion durch Citrat findet jedoch nur in Anwesenheit von BctC statt. Eine Interaktion zwischen BctC und der Sensorkinase BctE wurde durch ein Two-Hybrid-System nachgewiesen. Es wird angenommen, dass Citrat-beladenes BctC im Periplasma sowohl von dem Transportsystem über Interaktion mit BctBA als auch dem Signalerkennungsweg über eine Interaktion mit dem Sensor gebunden wird. BctC hat daher eine Funktion bei der Citrat-Aufnahme und bei der Signalerkennung. In der Chemotaxis von *E. coli* spielen ebenfalls periplasmatische Bindeproteine eine Rolle, die die Signalerkennung durch transmembrane Methylakzeptierenden-Chemotaxis-Proteine (MCP) beeinflussen (Zhulin, 2001).

Es gibt einige Beispiele für Carrier mit zusätzlicher sensorischer Funktion. Der Mechanismus, über den die Transportproteine die Genexpression beeinflussen können, ist in den meisten Fällen weitgehend ungeklärt. Obwohl es zwischen den vorgestellten Systemen deutliche Unterschiede gibt, sind bei allen Carriern mit sensorischer Funktion der Transport und die Signalerkennung oder -bildung nicht miteinander gekoppelt. Mit Ausnahme von BetP vermittelten alle Carrier ihre sensorische Funktion über ein Zweikomponentensystem. Wie DcuB sind auch DctA, BstCBA und PstSCAB auf diese Weise an der Regulation ihrer eigenen Strukturgene beteiligt. Eine direkte Interaktion einer Transportkomponente mit einer Sensorkinase konnte bislang nur für die lösliche Komponente des BctCBA-Systems gezeigt werden.

Signalerkennung durch das Cit-System

Die Anwesenheit von Citrat erfolgt in *Klebsiella pneumoniae* und in *E. coli* über das CitAB-Zweikomponentensystem (Bott *et al.*, 1995). CitA gehört zusammen mit DcuS zur CitA-Familie von Histidinkinasen. Die Sensorproteine besitzen eine hohe Sequenzidentität. Auch die periplasmatischen Domänen weisen ähnliche Strukturen auf (Kaspar *et al.*, 1999; Gerharz *et al.*, 2003; Pappalardo *et al.*, 2003). Die Bindung von Citrat an die periplasmatische Domäne von CitA von *Klebsiella* konnte mittels Kristallographie nachgewiesen werden (Gerharz *et al.*, 2003). Obwohl CitA als hochspezifischer Citratsensor sich in seiner Affinität und Substratspezifität von DcuS unterscheidet, sind bei der Substraterkennung in beiden Proteinen

die gleichen, konservierten Aminosäuren beteiligt. Aufgrund der hohen Homologie zwischen DcuS und CitA in Struktur und Funktion stellt sich die Frage, ob auch CitA in seiner Aktivität durch einen Carrier beeinflusst wird. In *Klebsiella pneumoniae* gibt es drei verschiedene Transportsysteme für Citrat. CitH wird unter aeroben Bedingungen konstitutiv exprimiert und katalysiert den elektrogenen Symport von Citrat mit drei Protonen (van der Rest *et al.*, 1991; 1992). Der Transporter CitS wird bei anaerobem Wachstum auf Citrat synthetisiert und ist Teil des *cit*-Regulons, dessen Expression von CitAB reguliert wird (Bott *et al.*, 1995). CitS katalysiert die Aufnahme von Citrat im Symport mit zwei Na-Ionen und im Antiport mit einem Na-Ion und einem Hydroxyl-Ion (Pos & Dimroth, 1996). CitW wird vermutlich ebenfalls unter anaeroben Bedingungen exprimiert und vermittelt die Aufnahme von Citrat im Gegentausch mit Acetat (Kästner *et al.*, 2002). In *E. coli* katalysiert der Carrier CitT den Antiport von Citrat mit Succinat (Pos *et al.*, 1998). *citT* wird vermutlich mit denen Genen für die Citratfermentation (*citCDEFG*) kotranskribiert, deren Expression ebenfalls von dem CitAB-Zweikomponentensystem reguliert wird (Bott *et al.*, 1995; Kaspar *et al.*, 2002). Da sowohl die Expression von CitS in *Klebsiella* als auch die von CitT in *E. coli* wie im Fall von DcuB von dem Zweikomponentensystem reguliert wird, sind beide gute Kandidaten für Carrier mit regulatorischer Funktion. Bislang gibt es noch keine Untersuchungen, ob einer dieser Carrier tatsächlich die Signalerkennung durch CitA beeinflussen kann. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der beiden Cit-Carrier mit DcuB zeigt keine Übereinstimmungen zu den regulatorischen Aminosäuren in DcuB (Abb. 34).

```

          *           20           *           40           *           60           *
DCUB_ECOLI : ---MLFTIQLLIILICLFYGARKGGIALGLGGIGLVILVVFVHLQ-PGKPPVDVMLVI IAVVAASATLQASGG : 70
CITT_ECOLI : MSLAKDNIWKLKLLAPLVVMGVMLFIPVDPGMPPQAWHYFAVFMIVGMILEPIPATAISFIAVTCIVIGSNYLL : 74
CITS_KLEPN : MTNMSQPPATEKKGVSDDLGFKIFGMPLPLYAFALITLLLSHFYNALPTDIVGGFAMFIIIGAI FGEIGKRLPI : 74
          80           *           100          *           120          *           140
DCUB_ECOLI : LDVMLQIAEKLRRNPKYVSIVAPFVTCITLTILCGTG-HVVYITILP I IYDVAIKNNIRPERPMAASSIGAQMGI : 143
CITT_ECOLI : FDAKELADPAFNAQKQALKWGLAGFSSTTVLVFGAF-IFALGYEVSGLGRRIALFLVKFMGKRTLLTGYAIVI : 147
CITS_KLEPN : FNKYIGGAPVMIFLVAAYFVYAGIFTOKEIDAISNVMDKSNFLNLF IAVLITGAILSVNRRLLKLSLLGYIPTI : 148
          *           160          *           180          *           200          *           220
DCUB_ECOLI : IASPVSAVVSLVAMLGNTVDFGRHLEFLDLLAITIPSTLIGILAIGIFSWFRGKD-LDKDEEFQKFI SVPENR : 216
CITT_ECOLI : IDILLAPFTPSNTARTGGTVFP--VIKNLPLPKSFPNDPSARRIGGYLMWMMVIS-TSLSS--SMFVTGAAPN : 216
CITS_KLEPN : LMGIVGASIFGIAIGLVFGIPVDRIMMLYVLPIMGGNGAGAVPLSEIYHSVTGRSREYYSTAIAILTIANIF : 222
          *           240          *           260          *           280          *
DCUB_ECOLI : EYVYGD TATLLDKKLPKSNWLA MWIFLGAIAVVALLGADSDLRP-----SFGGKPL : 267
CITT_ECOLI : VLGLEFVSKIAGIQISWLQWFLCFLPVGVILLI IAPWLSYVLYKPEITHSEEVATWAGDELKTMGALTRREWTL : 290
CITS_KLEPN : AIVFAAVLDIIGKKHTWLSGEGELVRKASFVVEDEKGTQITHR----- : 266
          300          *           320          *           340          *           360          *
DCUB_ECOLI : SMVLVIQMFMLLTGALIIILTKTNPASISKNEVFRSGMIAIVAVYGIAWMAETMFGAHMSEIQGVLG----- : 334
CITT_ECOLI : IGLVLLSLGLWVFGSEVINATAVGLLAVSLMLALHVVPWKDITRYNSAWNTLVNLATLVVMANGLTRSGFIDWF : 364
CITS_KLEPN : ETAVGLVLSTTCFLLAYVVAKKILPSIGGVAIHFAWMVLI VAALNASGLCSPEIKAGAKRLSDFFS----- : 333
          380          *           400          *           420          *           440
DCUB_ECOLI : -----EMVKEYPWAYAI VLLLVS KVFNSQAALAAI V PVALAIGVDPAYIVASAPACYG--YYILP T Y P S D L A : 400
CITT_ECOLI : AGTMSHLEGFSPNATVIVLVLVFYFAHYLFASLSAHTATMLPVLAVGKGI PGVPMEQLCILLVLSI GIMGCL : 438
CITS_KLEPN : -----KQLLWVLMVGVGV CYTDLQEI INAITFANVVI AAI I V I GAVLGA AIGWLMGF FPIES A I T A G L C : 398
          *           460          *           480          *
DCUB_ECOLI : AIQFDRSGTTHIGRFVIN-----HSFILPGLIGVSVSCVFGWIFAA MYGFL : 446
CITT_ECOLI : TPYATGPGVI IYGCYVKS KDYWR LG AIFGVIYISMLLLVGVPI LAMWN-- : 487
CITS_KLEPN : MANRGGSGDLEVL SACNRMNLSIYAQISSRLGGGIVLVIA SIVFGMMI--- : 446

```

Abb. 34.: Vergleich der Aminosäuresequenz von DcuB aus *E. coli* mit CitT aus *E. coli* und CitS aus *Klebsiella pneumoniae*. Die Reste Thr394 und Asp398 aus DcuB sind rot markiert, die entsprechenden Reste in CitT und CitS grau.

Ausblick

Für den Carrier DcuB konnte eine neuartige Funktionsweise als zweiter Sensor des Genregulationssystems DcuSR nachgewiesen werden. Der Mechanismus, mit dem DcuB die Signalerkennung von DcuSR beeinflusst, ist jedoch noch unklar. Die induzierenden, aber transportaktiven Punktmutanten legen die Vermutung nahe, dass beim Mechanismus Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Weitere Interaktionsstudien sollen zeigen, ob DcuB tatsächlich mit einer Komponente des Zweikomponentensystems DcuSR interagiert. Vor allem mithilfe der Cross-Linking-Studien soll gezeigt werden, ob die regulatorischen Aminosäuren tatsächlich an Protein-Protein-Kontakten beteiligt sind.

Zur genaueren Vorhersage des Interaktionspartners von DcuB sollte die Lage der beiden Aminosäuren, die regulatorisch relevant sind, innerhalb des Proteins bekannt sein. Es ist daher notwendig, in Zukunft genauere Strukturinformationen zu DcuB zu erhalten. Aus diesem Grund soll weiterhin an der Überexpression von DcuB für biochemische Untersuchung gearbeitet werden, um beispielsweise die Lokalisation der Reste Thr394 und Asp398 bestimmen zu können. Eine weitere interessante Anwendung von isoliertem DcuB wäre die Korekonstitution mit DcuS *in vitro*, um so den Einfluss von DcuB auf DcuS gezielt untersuchen zu können. Auf diese Weise könnte getestet werden, ob die Anwesenheit von DcuB den Phosphorylierungszustand und damit die Aktivität von DcuS verändert. Die Stimulierung der Autophosphorylierung von DcuS nach Rekonstitution in Liposomen durch Fumarat ist deutlich schwächer als die Stimulierung der Genexpression *in vivo* (Janausch *et al.*, 2002). Es ist daher anzunehmen, dass *in vitro* noch eine weitere Komponente wie DcuB fehlt, die zur vollständigen Stimulierung von DcuS notwendig ist.

Bisher ist noch unbekannt, welche Aminosäuren von DcuB für die Bindung von Fumarat wichtig sind. Da anzunehmen ist, dass die Bindung von C₄-Dicarboxylaten über positiv-geladene Aminosäuren erfolgt, sollen die mittels gerichteter Mutagenese hergestellten Punktmutanten, in denen verschiedene His-, Arg- und Lys-Reste ausgetauscht wurden, in Transportmessungen untersucht werden. Hierbei wäre von besonderem Interesse, ob die Reste, die für die Fumarat-Bindung wichtig sind, in anderen Domänen als die regulatorischen Aminosäuren liegen.

Der Einfluss des aeroben Carriers DctA auf das DcuSR-System ist bislang nur wenig charakterisiert. Aufgrund der vergleichbaren Effekte zu DcuB sollte es auch im Falle von DctA möglich sein, Transport und Regulation voneinander zu trennen. Hierbei sollte vor allem die Funktion der Aminosäure Ser380 untersucht werden. Da Ser380 im Sequenzvergleich der regulatorischen Aminosäure Thr394 von DcuB entspricht, könnte diese

Aminosäure ebenfalls an Wechselwirkungen beteiligt sein. Auf diese Weise könnte aufgeklärt werden, ob DcuB und DctA über einen vergleichbaren Mechanismus die Aktivität von DcuSR regulieren.

6. Literatur

Abo-Amer, A.E., Munn, J., Jackson, K., Aktas, M., Golby, P., Kelly, D.J. and Andrews, S.C. (2005)

DNA interaction and phosphotransfer of the C₄-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 186: 1879-1889

Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., Drobecq, H., Willery, E., Lesjean, S. and Loch, C. (2003).
Overrepresentation of a gene family encoding extracytoplasmic solute receptors in *Bordetella*.

J. Bacteriol. 185: 1470-1474.

Antoine, R., Huvent, I., Chemlal, K., Deray, I., Raze, D., Loch, C. and Jacob-Dubuisson, F. (2005)

The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction.

J. Mol. Biol. 351: 799-809

Bock, V. (2004, Diplomarbeit)

Substratspezifität und Signaltransduktion des Sensors DcuS von *Escherichia coli*
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

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

Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*
Mol. Microbiol. 18: 533-546.

Cox, G. B., Webb, D. and Rosenberg, H. (1989)

Specific amino acid residues in both the PstB and PstC proteins are required for phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system.

J. Bacteriol. 171: 1531-1534.

Csonka, N. L. (1989)

Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress.
Microbiol. Rev. 53: 121-147

Davies, S. J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S. A., Harrington, V. L., Guest, J. R., Kelly, D. J. and Andrews, S.C. (1999)

Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 181: 5624-5635

Datsenko K.A. and Wanner B.L. (2000)

One-step inactivation of chromosomal genes in *E. coli* K-12 using PCR products
PNAS 97: 6640-6645

Engel P., Krämer, R., and 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. and Unden, G. (1994)
Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux.
Eur. J. Biochem. 222: 605-614
- Farinha, M. A. and Kropinski, A. M. (1990)
High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions.
FEMS Microbiol. Lett. 58: 221-225.
- Gerharz, T., Reinelt, S., Kaspar, S., Scapozza, L. and Bott, M. (2003)
Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA.
Biochem. 42: 5917-5924.
- Goh, E.-B., Bledsoe, P. J., Chen, L.-L., Gyaneshwar, P., Stewart, V. and Igo, M. M. (2005)
Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system.
J. Bacteriol. 187 (14): 1-10.
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D. J., Guest, J. R. and 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. and 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
- Gutowski, S.J. and Rosenberg, H. (1975)
Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K-12
J. Biochem. 152: 647-654
- Heeb S., Itoh Y., Nishijyo T., Schnider U., Keel C., Wade J. et al. (2000)
Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria.
Mol. Plant Microbe Interact. 13: 232-237.
- Heijne von, G. (1986).
The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the transmembrane topology.
EMBO J. 5: 3021-3027.
- Heijne von, G. (1989).
Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues.
Nature 341: 456-8.

- Heijne von, G. (1992).
Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule.
J. Mol. Biol. 225: 487–494.
- Hidaka, Y., Park, H. and Inouye, M. (1997)
Demonstration of dimer formation of the cytoplasmic domain of a transmembrane osmosensor protein, EnvZ, of *Escherichia coli* using Ni-histidine tag affinity chromatography
FEBS Letters 400: 238-242
- Janausch, I. G., Kim, O. B. and Uden, G. (2001)
DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers.
Arch. Microbiol. 176: 224-230
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A. and Uden, G. (2002)
C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria.
Biochim. Biophys. Acta. 1553: 39-56
- Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I., Lehnen, D., Zeuner, Y. and Uden, G. (2004)
Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*.
Microbiology 150: 877-83.
- Kadner, R.J., Island, M.D., Dahl, J.L. and Webber, C.A. (1994)
A transmembrane signalling complex controls transcription of the Uhp sugar phosphate transport system.
Res. Microbiol. 145: 381–387.
- Kästner, C. N., Schneider, K. Dimroth, P. and Pos, K. M. (2002)
Characterization of the citrate/acetate antiporter CitW of *Klebsiella pneumoniae*.
Arch. Microbiol. 177: 500-506
- Karimova, G., Pidoux, J, Ullmann, A. and Lardant, D. (1998)
A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5752–5756
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L. and Bott, M. (1999)
The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor.
Mol. Microbiol. 33: 858-872.
- Kaspar, S. and Bott, M. (2002)
The sensor CitA (DpiB) of *Escherichia coli* functions as a high affinity citrate receptor.
Arch. Microbiol. 177: 313-321.

- Kim, O. B. (2006, Promotion)
Carrier und Regulatoren des Tartrat- und C₄-Dicarboxylatstoffwechsels in *Escherichia coli*
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Kleefeld, A. (2002, Diplomarbeit)
Der Einfluss der C₄-Dicarboxylat-Carrier DcuB und DctA auf die DcuSR-abhängige Genregulation in *Escherichia coli*
Johannes Guterberg-Universität, Mainz
- Kneuper, H., Janausch, I.G., Vijayan, V., Zweckstetter M., Bock, V., Griesinger, C. and 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
- Krogh, A., Larsson, B, von Heijne, G and Sonnhammer E. L. L (2001)
Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Applications to complete genomes.
J. Mol. Biol. 305: 567-580
- Lucht, J. & Bremer, E., (1992)
nicht veröffentlichte Daten
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. and Nakata, A. (1989)
Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins.
J. Mol. Biol. 210: 551-559.
- Miller, J. H. (1992)
A short course in bacterial genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miroux B. and Walker, J.E. (1996)
Guidelines for users of *Escherichia coli* C 41 (DE3) and C 43 (DE3) over-expression host strains
J. Mol. Biol. 260: 289-298
- Morbach, S. and Krämer, R. (2005)
Structure and function of the betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*: Strategies to sense osmotic and chill Stress.
J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 10(2-4):143-53
- Nohno, T. Noji, S., Taniguchi, S. and Saito, T. (1989)
The narX and narL genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes.
Nucleic Acids Res. 17(8):2947-57

- Oden, K.L., De Veaux, L.C., Vibat, C.R., Cronan, J.E. and Gennis R.B. (1990)
Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmids DNA
Gene 96: 29-36
- Ostrow, K.S., Silhavy, T. J. and Garrett, S. (1986)
Cis-Acting sites required for osmoregulation of *ompF* expression in *Escherichia coli* K-12
J. Bacteriol. 168(3): 1165-1171
- Pappalardo, L., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Uden, G. and 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.
- Peter, H., Burkovski, A. and Krämer, R. (1998)
Osmo-sensing by N- and C-terminal Extensions of the Glycine Betaine Uptake System BetP of *Corynebacterium glutamicum*
J. Biol. Chem. 273: 2567-2574
- Pos, K. M and Dimroth, P. (1996)
Functional properties of the purified Na⁺-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*: evidence for asymmetric orientation of the carrier protein in proteoliposomes.
Biochemistry 35: 1018–1026
- Pos, K. M., Dimroth, P. and 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.
- Reid, C. J. and Poole, P. S. (1998)
Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol. 180: 2660-2669.
- Rübenhagen, R., Rösch, H., Jung, H., Krämer, R. and Morbach, S. (2000)
Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes.
J. Biol. Chem. 275: 735-741.
- Rübenhagen, R., Morbach, S. and Krämer, R. (2001)
The osmoreactive betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* is a sensor for cytoplasmic K⁺.
EMBO J. 20: 5412-5420
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Scheu, P. (2005, Diplomarbeit)
Der Fumaratsensor DcuS von *Escherichia coli*.
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Schwöppe, C., Winkler, H.H. and Neuhaus, H.E. (2002)
Properties of the glucose 6-phosphate transporter from *Chlamydia pneumoniae* (HPTcp) and the glucose 6-phosphate sensor from *Escherichia coli* (UhpC).
J. Bacteriol. 184: 2108–2115.
- Schwöppe, C., Winkler, H.H. and Neuhaus, H.E. (2003)
Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. 270: 1450-1457
- Silhavy, T.J., Berman, M. and Enquist, L.W. (1984)
Experiments with gene fusions
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Six, S., Andrews, S. C., Uden, G. and 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
- Steed, P. M. and Wanner, B. L. (1993)
Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: Evidence for a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon.
J. Bacteriol. 175: 6797-6809
- Stewart, V. (1993)
Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*
Mol. Microbiol. 9: 425-434
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986)
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes
J. Mol. Biol. 189: 113 - 130
- Taylor, B. L. and Zhulin, I. B. (1999)
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 479-506
- Ullmann, R., Gross, R., Simon, J., Uden, G. and Kröger, A. (2000)
Transport of C₄-dicarboxylates in *Wolinella succinogenes*.
J. Bacteriol. 182: 5757-5764

- Uندن, G. and Kleefeld, A. (2004)
C₄-Dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth.
Module 3.4.5 In R. Curtiss III (Editor in Chief), *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*.
(Online) <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.
- Van der Rest, M. E., Abee, T., Molenaar, D. and Konings, W. N. (1991)
Mechanism and energetics of a citrate-transport system of *Klebsiella pneumoniae*.
Eur. J. Biochem. 195: 71–77
- Van der Rest, M. E., Molenaar, D. and Konings, W. N. (1992)
Mechanism of Na⁺-dependent citrate transport in *Klebsiella pneumoniae*.
J. Bacteriol. 174: 4893–4898
- Wallace, B.J. and Young, I.G. (1977)
Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*
Biochim. Biophys. Acta 233: 109 – 122
- Wang, L., Xie, J. and Schultz, P. (2006)
Expanding the genetic code.
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35: 225-249
- Wanner, B. L. (1993)
Gene regulation by phosphate in enteric bacteria.
J. Cell. Biochem. 52: 47-54.
- Winans, S.C., Elledge, S.J., Heilig Krüger, J. and Walker, G.C. (1985)
Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 161: 1219 – 1221
- Wright, J.S. III and Kadner, R.J. (2001)
The phosphoryl transfer domain of UhpB interacts with the response regulator UhpA.
J. Bacteriol. 183, 3149–3159.
- Yang, Y. and Inouye, M. (1991)
Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 11057-11061
- Yanisch-Perron, C.J., Vierara, J. and Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors
Gene 33: 103 – 119
- Yurgel, S., Mortimer, M. W., Rogers, K. N. and Kahn, M. L. (2000)
New substrates for the dicarboxylate transport system of *Sinorhizobium meliloti*.
J. Bacteriol. 182: 4216-4221.

- Yurgel, S. and Kahn, M. L. (2004)
Dicarboxylate transport by rhizobia.
FEMS Microbiol. Rev. 28: 489-501
- Zientz, E., Six, S. and 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.
- Zientz, E., Bongaerts, J. and 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.
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. and Inouye, M. (2000)
Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain.
Proc Natl Acad Sci USA 97: 7808–7813.
- Zhulin, I. B. (2001)
The superfamily of chemotaxis transducers: from physiology to genomics and back.
Adv. Microb. Physiol. 45: 157-198.

7. Veröffentlichungen

Kleefeld, A. and Uden, G. (2006)

DcuB as a secondary site for the DcuSR fumarate sensory system.
In Bearbeitung.

Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emödy, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V. F. and Uden, G. (2005)

Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*.
Microbiology. 151: 3287-3298

Uden, G. and Kleefeld, A. (2004)

C₄-dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth.
Module 3.4.5 In R. Curtiss III (Editor in Chief), *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*.
(Online) <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.

Zhang, J., Zeuner, Y., Kleefeld, A., Uden, G. and Janshoff, A. (2004)

Multiple site-specific binding of Fis protein to *Escherichia coli nuoA-N* promoter DNA and its impact on DNA topology visualised by means of scanning force microscopy.
ChemBioChem 5: 1286-1289

