

**Phylogenie von [FeS]-haltigen O₂-Sensoren
und
Interaktion des O₂-Sensors NreB mit dem Nitratsensor NreA
aus *Staphylococcus carnosus***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christine Barth
geb. am 29.04.1990 in Mainz

Mainz, Mai 2018

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2018

Für Mama

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
Abstract	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Molekularer Sauerstoff O ₂ und seine Bedeutung.....	3
2.2 Wahrnehmung von Sauerstoff und ROS	4
2.3 Direkte [4Fe-4S] ²⁺ -haltige Sauerstoffsensoren	7
2.4 Fragestellung zur Phylogenie von [Fe-S]-haltigen O ₂ -Sensoren	16
2.5 Die Rolle des GAF-Domänenproteins NreA - Nitratsensor des NreABC-Systems.....	17
2.6 Fragestellung zur Interaktion zwischen dem O ₂ -Sensor NreB und dem Nitratsensor NreA.....	19
3 Material und Methode.....	20
3.1 Bioinformatische Methoden	20
3.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide.....	22
3.3 Anzucht der Bakterien.....	22
3.4 Biochemische Methoden.....	24
3.5 Molekulargenetische Methoden	27
4 Ergebnisse	30
4.1 Phylogenetische Verteilung von FNR, NreB, WhiB3 und CRP.....	30
4.2 FNR _{Ec} aus <i>E. coli</i>	32
4.3 FNR _{Bs} aus <i>B. subtilis</i>	40
4.4 NreB aus <i>S. aureus</i>	44
4.5 WhiB3 aus <i>M. tuberculosis</i>	48
4.6 Zusammenfassung der Daten zur phylogenetischen Verteilung der O ₂ -Sensoren.....	50
4.7 Interaktionsstudien mit dem BACTH-System zur Untersuchung der NreA/NreB- Heterodimerisierung und der NreA/NreA-Homodimerisierung.....	51
4.8 Funktionsstudien der NreA-Varianten	57
4.9 Zusammenfassung der BACTH-Interaktions- sowie der <i>narG-lip</i> -Funktionsstudien	59
4.10 Interaktionsstudien mit Cystein-Crosslinking für die NreA/NreA-Homodimerisierung	60
4.11 Bestimmung des Dimerisierungszustands von NreA-Varianten durch <i>in vitro</i> Gelfiltration	64
5 Diskussion	66
5.1 FNR aus <i>E. coli</i> – Sauerstoffsensor der Proteobakterien	66
5.1.1 4Cys- und 0Cys-Homologe von FNR _{Ec}	67

5.1.2	1Cys-Varianten von FNR _{Ec} – FNR-homologer Redox-Switch?	71
5.1.3	2Cys-Varianten von FNR _{Ec} – FNR-homologer Disulfid-Switch?	72
5.1.4	3Cys-Varianten von FNR _{Ec} – FNR-Homologe mit alternativen Liganden?.....	74
5.2	FNR aus <i>B. subtilis</i> – Sauerstoffsensor der Bacilli	75
5.2.1	0Cys-Varianten von FNR _{Bs} – CRP-ähnliche Transkriptionsfaktoren	75
5.2.2	4Cys-Homologe von FNR _{Bs} – Regulatoren von O ₂ -abhängigen Prozessen.....	77
5.3	NreB aus <i>S. aureus</i> – Sauerstoffsensor der Staphylokokken	79
5.3.1	0Cys-Varianten von NreB _{sa} – Sensorkinasen der HisKA_3 Familie	79
5.3.2	NreB _{sa} -Homologe	80
5.3.3	4Cys-Homologe von NreB _{sa} – Regulation der Nitratatmung	80
5.3.4	3Cys-Varianten von NreB _{sa} – alternative Funktion außerhalb der Nitratregulation?	81
5.3.5	2Cys-Varianten von NreB _{sa} – NreB-Homologe mit alternativem Mechanismus?	82
5.3.6	1Cys-Varianten von NreB _{sa} – Regulation außerhalb der Nitratatmung durch Redox-Switch?.....	82
5.4	WhiB3 aus <i>M. tuberculosis</i> – Redoxsensor der Actinobakterien.....	83
5.4.1	3Cys-Varianten von WhiB3 _{Mt} – Alternative Redoxsensoren etabliert?	84
5.4.2	4Cys-Homologe von WhiB3 _{Mt} – Regulation verschiedener redoxabhängiger zellulärer Prozesse	84
5.5	Verbreitung und Evolution der [4Fe-4S]-haltigen O ₂ -Sensoren	86
5.6	Multiple [Fe-S]-haltige Sensoren innerhalb eines Organismus	87
5.7	Ist CRP der Vorfahre der [Fe-S]-haltigen FNR-Sensoren?	89
5.8	Chemie der [Fe-S]-Cluster	90
5.9	Schlussfolgerung zur Phylogenie der [Fe-S]-haltigen O ₂ -Sensoren	92
5.10	Interaktion zwischen dem O ₂ -Sensor NreB und dem Nitratsensor NreA.....	93
5.11	Interaktionsmodell von NreA und NreB basierend auf den BACTH-Studien.....	93
5.11.1	Einfluss von NreC auf die BACTH-Interaktion zwischen NreA und NreB	94
5.11.2	Widersprüchliche NreA*/NreB-BACTH-Interaktion in Abhängigkeit von NreC.....	95
5.12	Zusammenhang zwischen Funktion und Interaktion von NreA-Varianten	95
5.13	Cystein-Crosslinking zur Bestätigung der NreA-Dimerisierungsfläche	96
5.13.1	Der Einfluss von Nitrat auf die Zugänglichkeit der Cysteinvarianten	97
5.14	Die Gelfiltrationsstudien bestätigen NreA als Monomer	98
5.15	Alternative Interaktionsstudien zur Identifizierung der Interaktionsstellen in NreA	99
5.15.1	NreA/NreB-Interaktion mittels HPINE.....	99
5.16	Bildet NreA Dimere aus?	99
5.17	Schlussfolgerung zur Interaktion innerhalb des NreABC-Systems aus <i>S. carnosus</i>	100

6	Literatur.....	102
I	Anhang.....	I
II	Lebenslauf	X
III	Veröffentlichungen, Konferenzen und Präsentationen	XI
IV	Danksagung	XII
V	Erklärung	XIII

1 Zusammenfassung

Sauerstoffsensoren sind für fakultativ anaerobe Bakterien essentiell, um den Stoffwechsel an die gegebenen Bedingungen anzupassen. FNR aus *E. coli* und *B. subtilis*, NreB aus *S. aureus* sowie WhiB3 aus *M. tuberculosis* besitzen je ein [4Fe-4S]-Cluster mit dem sie O₂ direkt wahrnehmen können. Die O₂-Sensoren sind nicht verwandt, koordinieren ihr Cluster über unterschiedliche Cluster-Bindemotive, zeigen jedoch eine ähnliche Clusterdegradation in Anwesenheit von O₂.

Mit Hilfe von bioinformatischen Studien wurde die phylogenetische Verteilung der O₂-Sensoren sowie die Frage, ob die Sensoren einen gemeinsamen Vorfahren besitzen, untersucht.

FNR_{Ec} und Homologe sind dominant in den Proteobakterien, wohingegen FNR_{Bs} hauptsächlich innerhalb der Bacilli, spezifischer in der Gattung *Bacillus*, identifiziert werden konnte. NreB_{Sa} und homologe Proteine existieren vor allem in den Bacilli innerhalb der Gattung *Staphylococcus*. Die Existenz von WhiB3_{Mt} und Homologen ist ausschließlich auf die Actinobakterien begrenzt. Zusätzlich wurden vor allem für FNR_{Ec} und NreB_{Sa} Varianten mit reduzierter Anzahl an Cluster-koordinierenden Cysteinresten außerhalb ihrer dominanten Bakterienklassen identifiziert, was auf lateralen Gentransfer mit anschließendem Cysteinverlust hindeuten kann. Diese Varianten verwenden im Vergleich zu den Referenzsensoren möglicherweise andere Regulationsmechanismen. Während 3Cys-Varianten einen alternativen Liganden zur Cluster-Koordination verwenden könnten, ist für 2Cys-Varianten ein Disulfid-Switch und für 1Cys-Varianten ein thiolbasierter Redox-Switch vorstellbar.

CRP aus *E. coli*, ein globaler cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor, weist große Ähnlichkeiten mit FNR auf, weshalb CRP als Vorfahre von FNR postuliert wird. CRP_{Ec} ist weit verbreitet in vielen verschiedenen Bakterienphyla. Eine direkte Korrelation in der Verbreitung von CRP und FNR konnte mit den Studien nicht bestätigt werden.

Studien mit Custeranalogen sowie die durchgeführten Analysen deuten auf eine unabhängige Entwicklung der [4Fe-4S]-haltigen O₂-Sensoren hin, die durch die chemischen Eigenschaften sowie die Reaktivität der [Fe-S]-Cluster getrieben wurde. Die Proteinstruktur bestimmt dabei allerdings die Sensitivität der O₂-Sensoren sowie die Art der Reizweiterleitung.

Zusätzlich wurden die funktionell wichtigen Interaktionsstellen des Nitratsensors NreA mit dem O₂-Sensor NreB aus *S. carnosus* untersucht. Dazu wurde NreA gerichtet mutiert und verschiedene *in vivo* und *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt. Basierend auf *in vivo* BACTH-Studien wurde ein Interaktionsmodell erstellt, welches Cluster I („Nitratbindetasche“) als NreA-Dimerisierungsstelle und Cluster II auf der gegenüberliegenden Proteinoberfläche („N-Terminus“) als Interaktionsstelle zwischen NreA und NreB postuliert. Mit weiteren, unabhängigen Methoden konnte das Modell allerdings nicht bestätigt werden. Ein Hauptproblem ist dabei das Fehlen von geeigneten *in vivo* Testsystemen für *S. carnosus*.

Abstract

Oxygen sensors are essential for facultative anaerobic bacteria to adapt their metabolism to the present conditions. FNR from *E. coli* and *B. subtilis*, NreB from *S. aureus* as well as WhiB3 from *M. tuberculosis* use a O₂-sensitive [4Fe-4S]-Cluster for direct O₂-sensing. These sensors are not related, use different cluster-binding motifs but show a similar reaction of the clusters in response to O₂.

For investigation of the phylogenetic distribution as well as the origin of the sensors, bioinformatic studies containing for e.g. the identification of homologous proteins, were used.

FNR_{Ec} and homologs are predominant in Proteobacteria whereas FNR_{Bs} is mostly identified in the Bacilli in the genus *Bacillus*. NreB_{Sa} and homologous proteins are also distributed in the Bacilli, but mainly in the *Staphylococcus* group. The occurrence of WhiB3_{Mt} and homologs is restricted to the Actinobacteria. Especially for FNR_{Ec} and NreB_{Sa} variants with less than four conserved Cys residues were identified outside their dominant classes suggesting lateral gene transfer with subsequent cysteine loss. Those variants use probably different regulation mechanisms. 3Cys-variants could use an alternative ligand for cluster coordination whereas 2Cys-variants and 1Cys-variants could regulate their activity by using a disulfide or thiol-based redox switch, respectively.

CRP from *E. coli* is a global cAMP-dependent transcriptional activator which is very similar to FNR. Therefore it was postulated that FNR derived from CRP. CRP_{Ec} is widely distributed in many bacterial phyla. In the present study no evidence for CRP being the ancestor of FNR could be found.

Studies with cluster analogs as well as the present study suggest an independent development of the [4Fe-4S]-containing direct O₂-sensors which was driven by the chemical properties as well as the reactivity of the [Fe-S]-clusters. The protein structure of the O₂-sensors determines the sensitivity of the sensors and the way the stimulus is transferred.

Additionally, the functional important interaction sites of the nitrate sensor NreA with the O₂-sensor NreB from *S. carnosus* were studied. NreA was mutated site directed in the potential interaction sites and several *in vivo* as well as *in vitro* interaction studies were performed. Based on *in vivo* BACTH measurements a potential interaction model was created. According to this, Cluster I ("nitrate binding pocket") is responsible for the NreA dimerization whereas Cluster II ("N-Terminus") on the opposite NreA surface is necessary for the interaction between NreA and NreB. The model was not confirmed with other independent methods due to the problem of missing suitable *in vivo* test systems for *S. carnosus*.

2 Einleitung

2.1 Molekularer Sauerstoff O₂ und seine Bedeutung

Für die Entstehung der heutigen Lebensformen war die Akkumulation von atmosphärischem Sauerstoff auf der Erde Grundvoraussetzung. Erste fossile Hinweise von tierischem Leben gibt es aus dem Proterozoikum, einem Äon der erdgeschichtlichen Entwicklung im Präkambrium, welches von vor etwa 2,5 bis vor ca. 0,541 Milliarden Jahren reicht (Gradstein, 2012).

Die Evolution des Photosystem II vor 2,75 Milliarden Jahren ermöglichte durch die oxygene Photosynthese von Cyanobakterien und Pflanzen die Akkumulation von Sauerstoff auf der Erde (Canfield *et al.*, 2000; Imlay, 2006). Das Cloud-Walker-Kasting-Holland (C-W-K-H) Modell geht von der Zunahme des atmosphärischen Sauerstoffgehaltes im *Great Oxidation Event* zwischen 2,25 und 2,05 Milliarden Jahren vor unserer Zeit aus. Verschiedene Untersuchungen bestätigen die Sauerstoff-Akkumulation im Proterozoikum. Allerdings wurde erst im späten Neoproterozoikum (vor ca. 0,54 Milliarden Jahren) die heutige Sauerstoffkonzentration von 21 % erreicht (Canfield & Teske, 1996; Holland, 1999; Canfield *et al.*, 2000).

Die Zunahme des Sauerstoffgehaltes in der Atmosphäre führte zu vielen evolutionären Neuerungen wie beispielsweise der Entstehung der aeroben Atmung zur Energiegewinnung. Molekularer Sauerstoff konnte als terminaler Endakzeptor und als universeller Elektronenakzeptor genutzt werden. Das Vorhandensein von Sauerstoff führte ebenso zur Oxidation von Metallen, welche eine Limitierung von unter anderem Eisen als Nährstoff verursachte. Mikroorganismen entwickelten im Laufe der Evolution eine Reihe von Mechanismen und Lösungen, um sich an die veränderten Sauerstoffbedingungen anzupassen (Imlay, 2002, 2006).

Mikroorganismen werden je nach ihrer Verwendung bzw. ihrer Toleranz gegenüber Sauerstoff in verschiedene Gruppen eingeteilt. Obligat aerobe Mikroorganismen sind auf Sauerstoff angewiesen und können nur in einer sauerstoffreichen Umgebung überleben. Für obligat anaerobe Bakterien ist Sauerstoff toxisch. Leben ist demnach nur in sauerstofffreiem Medium möglich. Fakultativ anaerobe Bakterien können sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Sauerstoff existieren. Mikroaerobe Bakterien sind in der Lage Sauerstoff in niedriger Konzentration zu tolerieren und damit zu wachsen (Fuchs *et al.*, 2014).

Molekularer Sauerstoff O₂ ist der wichtigste Elektronenakzeptor in aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien und reguliert demnach den Energiestoffwechsel. Während der aeroben Atmung dient O₂ als Elektronenakzeptor in der Atmungskette, um Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zu konservieren. Fakultativ anaerobe Bakterien, wie *Escherichia coli* (*E. coli*), sind in der Lage neben O₂ auch noch andere Substrate als Endakzeptoren innerhalb der anaeroben Atmung zu nutzen. Die ATP-

Ausbeute während der Atmung ist abhängig vom jeweiligen Redoxpotential der genutzten Elektronenakzeptoren. Molekularer Sauerstoff weist ein Redoxpotential (E_m') von 0,82 V auf und ist damit deutlich positiver als das Redoxpotential alternativer Akzeptoren wie beispielsweise Nitrat (E_m' 0,42 V). Ein höheres Redoxpotential führt zu einer höheren Energieausbeute, sodass Sauerstoff hierarchisch anaerobe Stoffwechselwege wie die Nitratatmung und die Fermentation reprimiert (Unden & Bongaerts, 1997).

Eine plötzlich stark erhöhte O_2 Konzentration führt zu oxidativem Stress. Die Funktion der aeroben Atmung kann zur Entstehung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) wie dem Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder dem Hydroxylradikal ($HO\cdot$) führen. Diese sind toxisch für Mikroorganismen, da sie zu massivem, zellulärem Schaden führen können (Imlay, 2002, 2003, 2013). Bakterien haben diverse Schutzmechanismen entwickelt, um die reaktiven Spezies zu neutralisieren. Hierzu zählt beispielsweise die Superoxiddismutase, die gemeinsam mit der Katalase das Superoxidanion zurück in harmlosen Sauerstoff umwandelt (Kargalioglu & Imlay, 1994; Imlay, 2008a).

2.2 Wahrnehmung von Sauerstoff und ROS

Um sich an ändernde Umweltbedingungen optimal zu adaptieren, benötigen vor allem fakultativ anaerobe Mikroorganismen Sensoren, mit deren Hilfe sie äußere Reize, wie den Sauerstoffgehalt oder das Vorhandensein von radikalen Spezies, wahrnehmen können. Es gibt verschiedene Arten von Sauerstoffsensoren, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen. Es wird zwischen direkten und indirekten Sauerstoffsensoren unterschieden. Direkte Sauerstoffsensoren besitzen einen redox-aktiven Co-Faktor wie Häm oder Eisen-Schwefel-Cluster, mit dem der Sauerstoff direkt reagieren kann. Indirekte Sauerstoffsensoren hingegen sprechen auf die metabolische Situation an und sind oftmals an Komponenten der Atmungskette gekoppelt. Das Zusammenspiel von direkten und indirekten Sensoren führt zu einem komplexen, regulatorischen Netzwerk, welches die optimalste Anpassung an die gegebenen Umweltbedingungen gewährleistet (Green & Paget, 2004; Unden *et al.*, 2013).

2.2.1 Indirekte O_2 -Sensoren

Indirekte Sauerstoffsensoren sind nicht in der Lage direkt mit Sauerstoff beispielweise durch Bindung zu interagieren. Vielmehr nehmen sie den metabolischen Zustand der Zelle wie z.B. den Redoxzustand der Quinone oder von cytoplasmatischen Faktoren wie NADH wahr.

Der Repressor Rex aus *Streptomyces coelicolor* (*Sm. coelicolor*) ist ein indirekter NADH-gekoppelter Sauerstoffsensoren, der die Gene für den Redoxstoffwechsel in Abhängigkeit vom NADH/NAD⁺ Verhältnis reguliert. Das Verhältnis von NADH zu NAD⁺ ist abhängig vom Elektronenfluss durch die Atmungskette. Unter Aerobiose wird NADH zu NAD⁺ reoxidiert und das Verhältnis NADH/NAD⁺ nimmt ab. NAD⁺ wird von Rex gebunden und der Repressor liegt in aktiver Form vor. Diese Form bindet an die DNA und

reprimiert die Expression der Zielgene. Unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen liegt hauptsächlich die reduzierte Form von NADH vor. NADH wird ebenfalls von Rex gebunden, allerdings führt die Bindung zu einer strukturellen Veränderung, welches die DNA-Bindung und somit die Repressorfunktion verhindert (Brekasis & Paget, 2003; Green & Paget, 2004; Uden *et al.*, 2010).

Das ArcB-ArcA (Anoxic Redox Control) Zweikomponentensystem (ZKS) von *E. coli* ist ein globaler Regulator der Genexpression unter mikroaeroben und anaeroben Bedingungen. Viele Gene des ArcBA-Systems werden mit FNR (Fumarat-Nitrat-Regulator, s. Kapitel 2.3.1) co-reguliert. Die membrangebundene Sensorikine ArcB besitzt zwei cytoplasmatische, redox-aktive Cysteinreste. Diese werden unter aeroben Bedingungen durch die Quinone der Atmungskette oxidiert, was zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken führt. Als Folge wird die Kinase inaktiviert und es findet keine Expression der Zielgene des anaeroben Stoffwechsels statt. In Abwesenheit von Sauerstoff hingegen ist die Kinase aktiv und wird autophosphoryliert. Die Phosphorylgruppe wird auf den Antwortregulator ArcA übertragen, welcher in phosphorylierter, aktiver Form die Expression der Zielgene aktiviert (Iuchi & Lin, 1988; Iuchi *et al.*, 1989; Malpica *et al.*, 2004; Bekker *et al.*, 2010; Green & Paget, 2004; Uden *et al.*, 2010).

2.2.2 Direkte O₂-Sensoren

Direkte Sauerstoffsensoren zeichnen sich durch redox-aktive Co-Faktoren aus, die direkt mit O₂ reagieren oder interagieren können. Die häufigsten Co-Faktoren sind Eisen-Schwefel-Cluster, redox-sensitive Aminosäure-Seitenketten wie Cysteinthiole oder Hämgruppen mit einem zentralen Eisenion, welches maximal sechs Liganden besitzen kann. Bei den Eisen-Schwefel-haltigen Sensoren führt der Sauerstoff zur Oxidation und Umstrukturierung des redox-sensitiven Clusters, wohingegen die Hämgruppen Sauerstoff direkt an das Eisenion binden können. Beide Mechanismen führen zu strukturellen Änderungen des Proteins, wodurch der entsprechende Signaloutput erzielt wird (Green & Paget, 2004; Green *et al.*, 2009; Uden *et al.*, 2010).

FixL aus *Sinorhizobium meliloti* (*Sr. meliloti*) ist ein hämhaltiger O₂-Sensor, der als Teil einer regulatorischen Kaskade die Expression von Genen der Stickstoff- (N-) Fixierung reguliert. Die Sensorikine koordiniert in der PAS-Domäne (Per-ARNT-Sim) (Ponting & Aravind, 1997) eine über fünf Reste koordinierte Hämgruppe. In Sauerstoffabwesenheit befindet sich das zentrale Eisenion im *High-Spin* Zustand, was zur Aktivierung der Kinase und demnach auch zur Aktivierung des Antwortregulators und der Zielgene führt. In Anwesenheit von Sauerstoff wird dieser als sechster Ligand an das Eisen gebunden, wodurch das Eisen in den *Low-Spin* Zustand wechselt. Dieser Zustandswechsel führt zu strukturellen Änderungen innerhalb der Sensorikine, sodass der Antwortregulator und die Zielgene nicht mehr aktiviert werden können (Fischer, 1994; Gilles-Gonzalez *et al.*, 1995; Green & Paget, 2004; Green *et al.*, 2009; Uden *et al.*, 2010).

OhrR aus *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) besitzt einen reaktiven Cysteinrest, der durch Peroxidstress in Form von z.B. H_2O_2 reversibel zu Cys-Sulfensäure oxidiert. In dieser Form ist der Repressor inaktiv und das Peroxid Resistenz Gen *ohrA* wird exprimiert (Fuangthong & Helmann, 2002; Antelmann & Helmann, 2011; Green & Paget, 2004).

2.2.3 [Fe-S]-haltige Sauerstoffsensoren

Eisen-Schwefel-Cluster zählen zu den ältesten Co-Faktoren in Proteinen. Sie sind in allen Formen des Lebens zu finden (Beinert *et al.*, 1997) und sollen bereits vor der Akkumulation des Sauerstoffs in der Atmosphäre entstanden sein (Williams & Rickaby, 2012). Die Funktionen der [Fe-S]-haltigen Proteine sind sehr vielseitig. Neben ihrer ursprünglichen Funktion im Elektronentransport, können sie auch als enzymatische Katalysatoren und als Genregulatoren fungieren (Beinert *et al.*, 1997; Bian & Cowan, 1999; Crack *et al.*, 2014a; Crack & Le Brun, 2017).

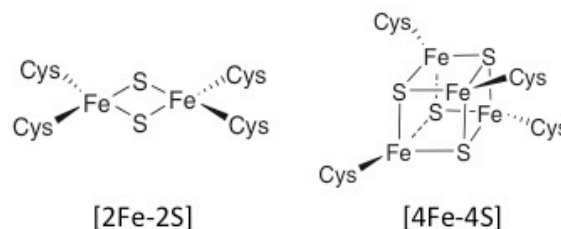


Abb. 1: Struktur des planaren [2Fe-2S]- und des kubischen [4Fe-4S]-Clusters. Die Eisenatome werden über Cysteinreste (Cys) gebunden. Geändert nach Fontecave (2006)

[Fe-S]-haltige Genregulatoren besitzen entweder ein planares [2Fe-2S]-Cluster oder ein kubisches [4Fe-4S]-Cluster (Crack *et al.*, 2012b). Die Struktur der Cluster ist in Abb. 1 dargestellt. In der Regel werden die Cluster an den Eisenatomen durch Cysteinthiolate im Protein koordiniert, allerdings können auch alternative Liganden vorkommen wie z.B. Aspartat (Gruner *et al.*, 2011; Calzolari *et al.*, 1995; Muraki *et al.*, 2010), Histidin (Davidson *et al.*, 1992; Lubitz *et al.*, 2014), Glutamin (Dobritzsch *et al.*, 2001), Methionin (Layer *et al.*, 2005) wie auch spezifische Substrate oder Wasser (Beinert & Kennedy, 1989; Lauble *et al.*, 1992).

Die Cluster-koordinierenden Cysteinreste sind hoch konserviert und in einer spezifischen Konsensus-Sequenz angeordnet. Alleine in *E. coli* konnten mehr als 30 verschiedene Cystein-Bindemotive in unterschiedlichsten Proteinen identifiziert werden (Fontecave, 2006).

In Anwesenheit von Oxidationsmitteln kommt es zur schrittweisen Clusterumwandlung oder gar zum Verlust des Clusters. Diese Sensitivität der [Fe-S]-Cluster befähigt sie als direkte Sauerstoffsensoren zu fungieren, um sich schnell an ändernde Bedingungen anzupassen. Die [Fe-S]-haltigen Sauerstoffsensoren regulieren mit Hilfe des Clusters die O_2 -abhängige Expression der jeweiligen Zielgene. Oftmals reagieren die Sensoren nicht nur auf einen spezifischen Reiz (O_2), sondern können

auch andere Reizmoleküle wie beispielsweise Stickoxid (NO) wahrnehmen (Cruz-Ramos *et al.*, 2002; Crack *et al.*, 2012b, 2014a; Crack *et al.*, 2012a; Crack & Le Brun, 2017).

2.3 Direkte [4Fe-4S]²⁺-haltige Sauerstoffsensoren

Im Folgenden werden die vier Sensoren, welche Gegenstand der Untersuchungen sind, detailliert vorgestellt.

2.3.1 FNR_{Ec} aus *E. coli*

Das fakultativ anaerobe Bakterium *E. coli* ist metabolisch sehr vielseitig und kann eine Reihe von Substraten unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen verstoffwechseln (Guest, 1995). Neben dem ZKS ArcBA ist FNR der globale Regulator des anaeroben Stoffwechsels in *E. coli*, der über 300 Gene reguliert (Kiley & Beinert, 1998; Salmon *et al.*, 2003; Crack *et al.*, 2012a).

FNR_{Ec} besteht aus einer cysteinreichen N-terminalen Sensordomäne sowie einer C-terminalen DNA-Bindedomäne (Unden & Guest, 1985; Melville & Gunsalus, 1990; Scott *et al.*, 2003) und zeigt einige homologe Strukturen zu CRP (cAMP Rezeptor Protein) (Shaw *et al.*, 1983). Die Kristallstruktur von FNR aus *Aliivibrio fischeri* wurde aufgeklärt und bestätigt die strukturellen Ähnlichkeiten mit CRP (Volbeda *et al.*, 2015). Aufgrund ihrer Ähnlichkeiten, vor allem in der DNA-Bindedomäne, werden sie zur FNR-CRP-Superfamilie der Transkriptionsregulatoren zusammengefasst (Korner *et al.*, 2003).

In der N-terminalen Sensordomäne befinden sich vier konservierte Cysteinreste, wobei aber nur Cys20, Cys23 und Cys29 essentiell für die Bindung des [4Fe-4S]-Clusters und die damit verbundene Funktionalität von FNR_{Ec} sind (Melville & Gunsalus, 1990; Khoroshilova *et al.*, 1995). Der vierte Clusterligand ist der Cysteinrest 122, welcher in der FNR-Region liegt, die ähnlich zur cAMP-Bindedomäne von CRP ist (Melville & Gunsalus, 1990; Kiley & Reznikoff, 1991; Green *et al.*, 1993). In Anwesenheit von Sauerstoff liegt monomeres, inaktives FNR_{Ec} vor und zeigt weder DNA-Bindeaktivität noch eine Cluster-Koordination (Lazazzera *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1993; Khoroshilova *et al.*, 1995). Unter anaeroben Bedingungen liegt FNR_{Ec} als Dimer vor und koordiniert pro Monomer ein [4Fe-4S]²⁺-Cluster. Diese Form zeigt eine hohe DNA-Bindeaffinität und ist daher transkriptionell aktiv (Green *et al.*, 1993; Lazazzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). Der Einbau des [Fe-S]-Clusters während Sauerstoffmangels führt zu strukturellen Änderungen, welche wiederum die Dimerisierung und die damit verbundene DNA-Bindung begünstigen (Bates *et al.*, 1995; Lazazzera *et al.*, 1996; Moore & Kiley, 2001).

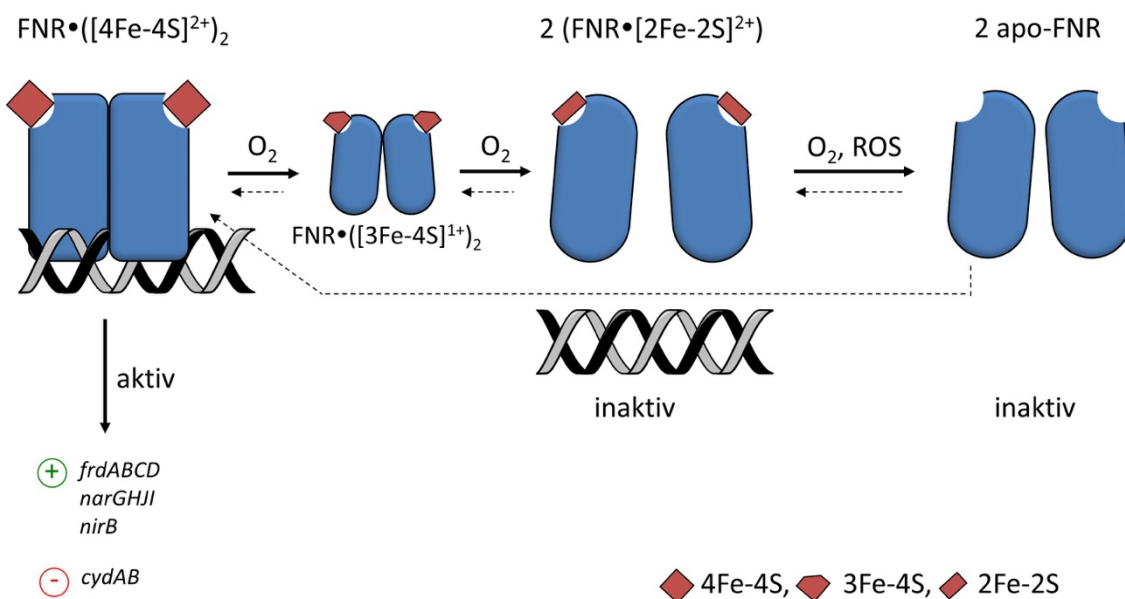


Abb. 2: Regulation des anaeroben Stoffwechsels durch den direkten [Fe-S]-haltigen Sauerstoffsensor FNR_{Ec} aus *E. coli*. Unter anaeroben Bedingungen liegt FNR_{Ec} in aktiver, dimerer Form vor und koordiniert N-terminal pro Monomer ein kubisches [4Fe-4S]²⁺-Cluster. Die aktive Form zeigt hohe DNA-Bindeaktivität und aktiviert die Expression der Fumaratreduktase (*frdABCD*), der Nitratreduktase (*narGHJI*) und der Nitritreduktase (*nirB*), während Gene des aeroben Stoffwechsels (*cydAB*) reprimiert werden. In Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zur Umwandlung des kubischen Clusters zu einem planaren [2Fe-2S]²⁺-Cluster mit dem [3Fe-4S]¹⁺-Intermediat. Da das planare Cluster durch dieselben Cysteinreste koordiniert wird, kommt es zu strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins, was wiederum zur Monomerisierung von FNR_{Ec} und zum Verlust der DNA-Bindung führt. Bei andauernder Exposition mit O₂ oder anderen radikalischen Sauerstoffspezies kommt es zum vollständigen Verlust des [Fe-S]-Clusters und es entsteht apo-FNR_{Ec}. Sowohl apo-FNR_{Ec} als auch die inaktive [2Fe-2S]-Form können wieder zu aktivem [4Fe-4S]-FNR regeneriert werden. Neueste Erkenntnisse ergaben bei der Umwandlung des [3Fe-4S]¹⁺-Intermediats zu dem planaren [2Fe-2S]²⁺-Cluster eine Oxidation der Sulfidionen zu Sulfan. Diese bilden zusammen mit zwei der Cys-Liganden ein Persulfid aus, welches als Speicherung des Schwefels für die reversible Umwandlung zum anaeroben [4Fe-4S]²⁺-Cluster dient.

Wird aktives FNR_{Ec} Sauerstoff ausgesetzt, kommt es zur Umwandlung des kubischen [4Fe-4S]²⁺-Clusters zu einem planaren [2Fe-2S]²⁺-Cluster. Diese Umwandlung bringt strukturelle Änderungen mit sich, da dieselben Cysteinreste zur Cluster-Koordination genutzt werden. Als Folge kommt es wiederum zur Monomerisierung und Inaktivierung von FNR_{Ec} (Lazizzera *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997; Crack *et al.*, 2004). Die Umwandlung des Clusters geschieht in zwei Schritten. Im ersten Schritt kommt es zur O₂-abhängigen Oxidation des [4Fe-4S]²⁺-Clusters, welche zu einem schnellen Verlust eines Eisenions und dem Zwischenprodukt [3Fe-4S]¹⁺ führt. Im zweiten Schritt werden spontan zwei Sulfidionen sowie ein weiteres Eisenion freigesetzt und es entsteht das [2Fe-2S]²⁺-Cluster (Crack *et al.*, 2004; Crack *et al.*, 2006; Crack *et al.*, 2007; Crack *et al.*, 2008). Der Redoxzustand der freigesetzten Eisenionen und die Geschwindigkeit des zweiten Schritts ist abhängig von Chelatoren und anderen Redoxbedingungen der Umwelt (Sutton *et al.*, 2004; Crack *et al.*, 2008). Während der Oxidation des [Fe-S-Clusters] durch O₂, wird dieser gleichzeitig reduziert. Je nach Oxidation entstehen entweder H₂O₂ oder das Superoxidion als toxische Reduktionsprodukte, welche

wiederum ebenfalls mit weiteren [Fe-S]-Clustern reagieren oder mittels Dismutaseaktivität recycelt werden können (Crack *et al.*, 2004; Crack *et al.*, 2007; Crack *et al.*, 2008; Bolann & Ulvik, 1993; Kargalioglu & Imlay, 1994). Neueste Untersuchungen der Cluster Umwandlung haben ergeben, dass die im zweiten Schritt freiwerdenden Sulfidionen nicht in die Umgebung freigesetzt werden. Vielmehr kommt es zu einer zweiten Oxidation der Ionen zu Sulfan (S^0), welche mit zwei der Cys-Liganden ein Persulfid ausbilden. Dieser Mechanismus ermöglicht ein Speichern des Schwefels, sodass O_2 -inaktiviertes FNR_{Ec} ohne die Mithilfe der Eisen-Schwefel-Biosynthese-Maschinerie wieder zur anaeroben $[4Fe-4S]^{2+}$ -Form umgewandelt werden kann (Zhang *et al.*, 2012; Crack *et al.*, 2017).

Bei anhaltender Sauerstoffexposition degradiert das $[2Fe-2S]^{2+}$ -Cluster sehr langsam und es entsteht apo- FNR_{Ec} . Sowohl apo- FNR_{Ec} als auch die inaktive $[2Fe-2S]$ -Form können wieder zur aktiven $[4Fe-4S]$ -Form regeneriert werden, wobei der Clustereinbau wesentlich langsamer verläuft als die Degradation (Khoroshilova *et al.*, 1997; Dibden & Green, 2005; Crack *et al.*, 2008; Tolla & Savageau, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

FNR_{Ec} wird konstitutiv exprimiert und liegt in konstanter Konzentration von etwa $6 \mu M$ in der Zelle vor (Unden & Duchene, 1987; Sutton *et al.*, 2004). Je nach Sauerstoffgehalt ändert sich die Konzentration von aktivem, inaktivem und apo- FNR_{Ec} in der Zelle um permanent, schnell und sensitiv die O_2 -Konzentration der Umgebung wahrzunehmen (Tolla & Savageau, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Crack *et al.*, 2014b). Bereits eine Sauerstoffkonzentration von $1 \mu M$ ist ausreichend um FNR_{Ec} zu inaktivieren (Becker *et al.*, 1996).

Die Sauerstoffsensitivität von FNR_{Ec} kann durch Substitutionen in der Nähe der Cluster-koordinierenden Cys-Reste verändert werden. Dies ermöglicht die Adaptation an alle physiologisch relevanten O_2 -Konzentrationen in der jeweiligen Umweltische (Jervis *et al.*, 2009).

Neben O_2 kann FNR_{Ec} unter anaeroben Bedingungen auch mit Stickoxid NO reagieren. Dies führt zur Expression bestimmter Enzyme, welche wichtig für die Entgiftung sind. NO ist ein Signal- und Abwehrmolekül, welches in pathophysiologischen Konzentrationen von $5-10 \mu M$ von FNR_{Ec} wahrgenommen werden kann. Die Reaktion von NO mit dem [Fe-S]-Cluster führt zur Bildung eines Dinitrosyl-Eisen-Cystein-(DNIC)-Komplexes und der Inaktivierung von FNR_{Ec} (Cruz-Ramos *et al.*, 2002).

FNR fungiert in *E. coli* mit seinem sensitiven $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster als direkter Sauerstoffsensor, um die Genexpression des anaeroben Stoffwechsels bestmöglich an die gegebenen Umweltbedingungen anzupassen.

2.3.2 FNR_{Bs} aus *B. subtilis*

B. subtilis ist ebenso wie *E. coli* ein fakultativ anaerobes Bakterium, welches in der Lage ist unter anaeroben Bedingungen Nitratatmung oder Gemischte-Säuregärung zu betreiben (Nakano & Hulett,

1997). Für die Regulation der Genexpression unter Anaerobiose sind die drei Hauptregulatoren ResDE, FNR_{B_s} und Rex (Vgl. Kapitel 2.2.1) verantwortlich. Das ZKS ResDE (aerobic and anaerobic respiration regulator) aktiviert in Sauerstoffabwesenheit FNR_{B_s} und weitere Gene für den anaeroben Stoffwechsel. FNR_{B_s} wiederum induziert die Gene für die Nitratatmung, wohingegen Rex die Gärungsgene reprimiert, solange die Elektronentransportkette aktiv ist (Cruz Ramos *et al.*, 1995; Hartig & Jahn, 2012).

Das FNR_{B_s}-Regulon besteht aus zehn Operons mit 37 Genen, von denen aber nur ein Teil direkt von FNR_{B_s} aktiviert wird. Hierzu zählen das Operon der Nitratreduktase (*narGHJ*), des Nitrittransporters mit FNR_{B_s} (*nark-fnr*) und einem weiteren anaeroben Transkriptionsregulator (*arfM*, anaerobic respiration and fermentation modulator). Die anderen Gene werden indirekt über die Nitratreduktase reguliert (Reents *et al.*, 2006b).

FNR_{B_s} ist Mitglied der CRP-FNR-Aktivatorfamilie. Im Vergleich zum *E. coli*-Homolog weist FNR_{B_s}, neben konservierten Merkmalen und ähnlichen Sekundärstrukturen im Bereich der DNA-Bindedomäne, allerdings entscheidende Unterschiede in der Lokalisation des [Fe-S]-Clusters auf. Die Clusterkoordinierende Domäne mit den konservierten Cysteinen befindet sich in FNR_{B_s} am C-Terminus (Cruz Ramos *et al.*, 1995).

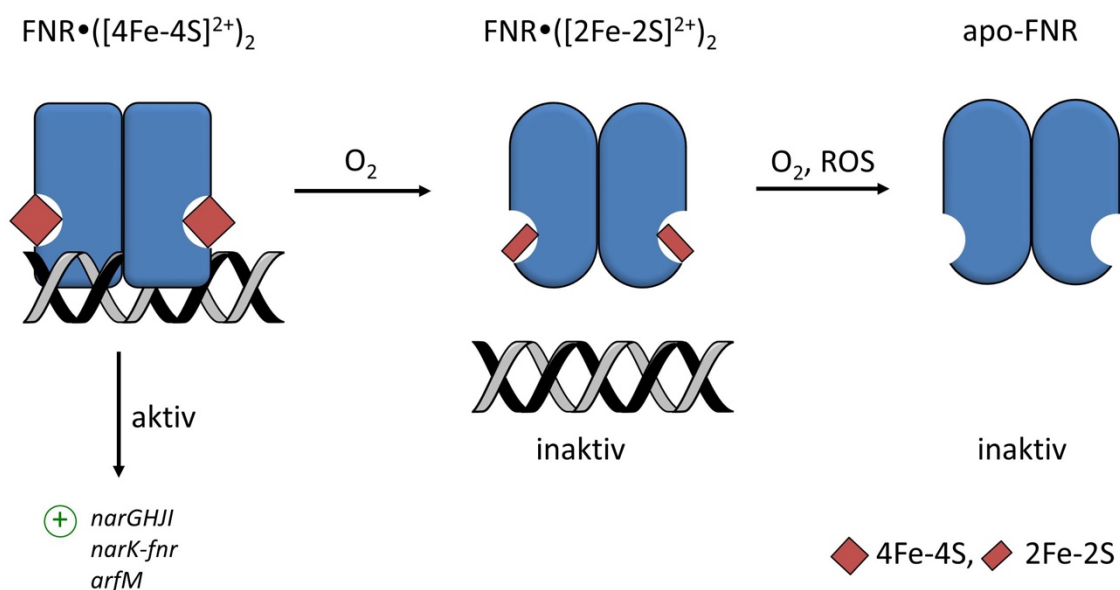


Abb. 3: Regulation des anaeroben Stoffwechsels durch den direkten [Fe-S]-haltigen Sauerstoffsensoren FNR_{B_s} aus *B. subtilis*. Unter anaeroben Bedingungen liegt FNR_{B_s} in aktiver, dimerer Form vor und koordiniert C-terminal pro Monomer ein kubisches [4Fe-4S]²⁺-Cluster. Die aktive Form zeigt hohe DNA-Bindeaktivität und aktiviert die Expression der Nitratreduktase (*narGHJ*), des Nitrattransporters (*nark*) und des anaeroben Gärungsregulators (*arfM*) sowie sich selbst (*fnr*). In Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zur Umwandlung des kubischen Clusters zu einem planaren [2Fe-2S]²⁺-Clusters. Da das planare Cluster durch dieselben Aspartat- und Cysteinreste koordiniert wird, kommt es vermutlich zu strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins, was wiederum zum Verlust der DNA-Bindung führt. Bei andauernder Exposition mit O₂ oder anderen radikalischen Sauerstoffspezies kommt es zum vollständigen Verlust des [Fe-S]-Clusters und es entsteht apo-FNR_{B_s}.

Unter Anaerobiose wird ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster C-terminal über den Aspartatrest Asp141 und drei der vorhandenen vier Cysteine gebunden. Die Ligation des Clusters mit Aspartat statt Cystein führt zu einer weniger starken Bindung, welche die Oxidation bzw. Reduktion des Clusters erleichtert. FNR_{B_5} liegt als permanentes Dimer vor, sodass die An- oder Abwesenheit des Clusters über die FNR_{B_5} -Aktivität entscheidet und nicht der Dimerisierungszustand des Proteins (Reents *et al.*, 2006a; Gruner *et al.*, 2011). Die physiologische Rolle des apo- FNR_{B_5} ist unbekannt.

FNR_{B_5} agiert als direkter Sauerstoffsensoren mit einem sensitivem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster als Co-Faktor und reguliert dadurch die Genexpression anaerober Gene, um eine bestmögliche Anpassung an die gegebenen Umweltbedingungen zu gewährleisten.

2.3.3 NreB aus *Staphylococcus*

In Staphylokokken existiert kein FNR Protein. In den Bakterien übernimmt die Sensorkinase NreB aus dem NreABC-System (nitrogen regulation) die Funktion als direkter Sauerstoffsensoren. Die Gene für NreABC aus *Staphylococcus carnosus* (*S. carnosus*) sind co-lokalisiert mit den Genen für die Nitratreduktase (*narGHJ*), der Nitritreduktase (*nirBD*) und dem Nitrat-Nitrit-Transporter (*narT*) (Fedtke *et al.*, 2002). Im pathogenen Verwandten *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sind die Proteine des NreABC-Systems zwischen 50 und 85 % identisch, wobei der Transporter hier NarK heißt (Schlag *et al.*, 2008). Neben dem NreABC-System, das die Gene der anaeroben Nitratatmung reguliert (Fedtke *et al.*, 2002; Mullner *et al.*, 2008; Nilkens *et al.*, 2014), gibt es noch das SrrAB-System (Staphylococcal respiratory response), welches Homolog zum ResDE-System in *B. subtilis* ist und ein Hauptregulator-System für die anaerobe Genregulation darstellt (Schlag *et al.*, 2008; Unden *et al.*, 2010).

Die Sensorkinase NreB besteht aus einer N-terminalen PAS-Domäne, welche vier konservierte Cysteinreste für die Koordination des $[\text{Fe-S}]$ -Clusters trägt (Kamps *et al.*, 2004), sowie einer C-terminalen Kinasedomäne. Unter anaeroben Bedingungen liegt NreB in aktiver Form vor und besitzt ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster. Es kommt zur Autophosphorylierung der Kinase, der Phosphorylrest wird auf den Antwortregulator NreC übertragen, der wiederum als positiver Transkriptionsfaktor die Gene der Nitratatmung aktiviert (Fedtke *et al.*, 2002; Mullner *et al.*, 2008; Reinhart *et al.*, 2010; Nilkens *et al.*, 2014). In Anwesenheit von Sauerstoff degradiert das Cluster zu einem planaren $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster bis hin zu apo-NreB. Dies führt zu Konformationsänderungen, welche wiederum die Kinaseaktivität inhibieren und NreB inaktivieren (Mullner *et al.*, 2008; Reinhart *et al.*, 2010). Ob apo-NreB eine physiologische Bedeutung besitzt, ist unklar. NreA fungiert als Nitratsensoren und inhibiert Nitrat-abhängig die Autophosphorylierung von NreB (Niemann *et al.*, 2014; Nilkens *et al.*, 2014). Unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff (Mullner *et al.*, 2008) oder Nitrat (Koch-Singenstreu, 2013) liegt NreB als permanentes Dimer vor.

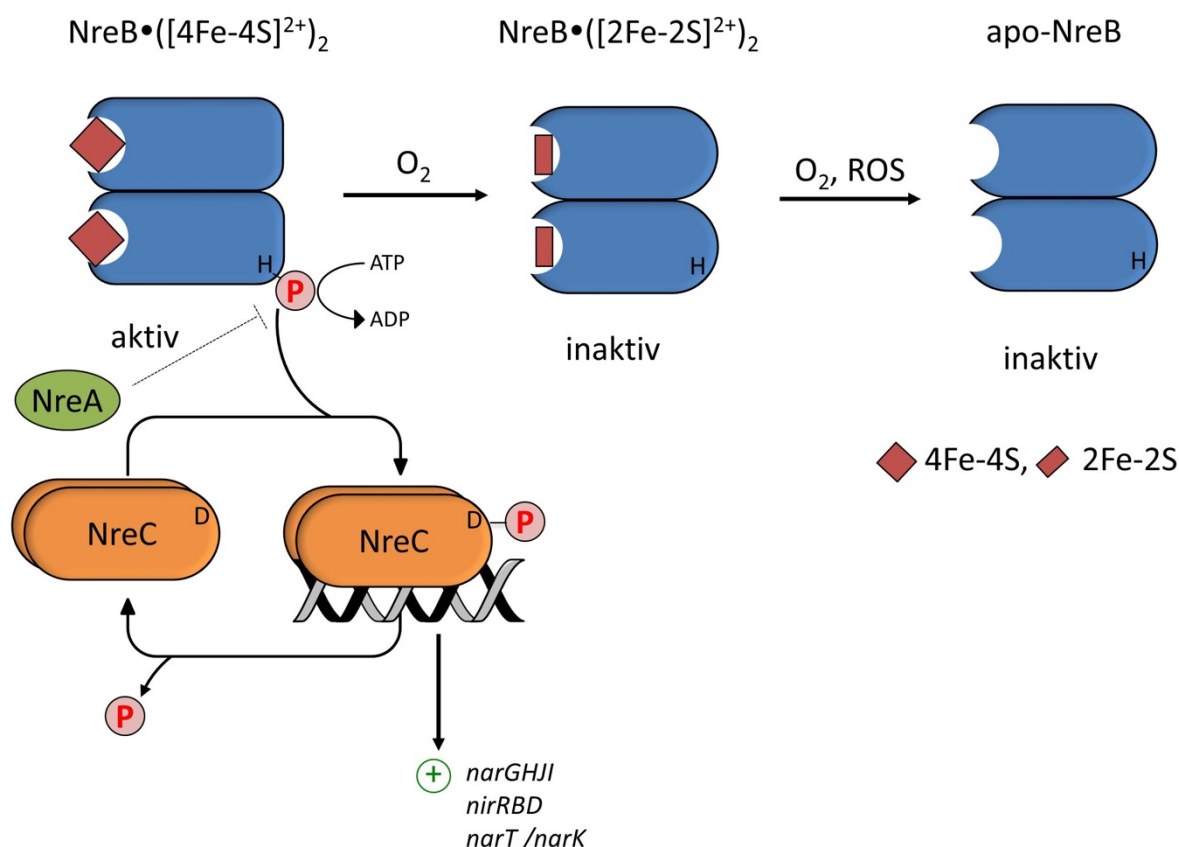


Abb. 4: Regulation des anaeroben Nitratstoffwechsels durch das NreABC-System aus *Staphylococcus*. Das NreABC-System besteht aus dem ZKS NreBC und dem Nitratsensor NreA. Die dimere Sensorkinase NreB fungiert als direkter Sauerstoffsensoren und koordiniert unter anaeroben Bedingungen in der N-terminalen PAS-Domäne ein [4Fe-4S]²⁺-Cluster pro Monomer. Es kommt zur Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest. Die Phosphorylgruppe wird an den Antwortregulator NreC weitergegeben, der in aktiver, phosphorylierter Form die Expression der Nitratreduktase (*narGHJ*), der Nitritreduktase (*nirBD*) und des Nitrat-Nitrit-Transporters (*narT* bzw. *narK*) aktiviert. In Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zur Umwandlung des kubischen Clusters zu einem planaren [2Fe-2S]²⁺-Cluster. Da das planare Cluster durch dieselben Cysteinreste koordiniert wird, kommt es zu strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins, was wiederum zur Inaktivierung der Kinasedomäne führt. Bei andauernder Exposition mit O₂ oder anderen radikalen Sauerstoffspezies kommt es zum vollständigen Verlust des [Fe-S]-Clusters und es entsteht apo-NreB.

Im NreABC-System von *S. carnosus* fungieren NreB mit seinem [4Fe-4S]²⁺-Cluster und NreA als direkte Co-Sensoren für Sauerstoff und Nitrat, um eine effiziente, adaptierte Genexpression zu gewährleisten (Nilkens *et al.*, 2014).

2.3.4 WhiB3 aus *Mycobacterium tuberculosis*

WhiB3 gehört zu den WhiB-ähnlichen Proteinen (Wbl), die ausschließlich in Actinobakterien als Transkriptionsfaktoren zu finden sind. Es gibt über 1600 Homologe mit unterschiedlichen Funktionen (Soliveri *et al.*, 2000; Saini *et al.*, 2012b), wobei lediglich funktionelle Untersuchungen in Streptomyceten (Molle *et al.*, 2000; Jakimowicz *et al.*, 2005; Crack *et al.*, 2009), Corynebakterien (Lee *et al.*, 2012) und Mykobakterien durchgeführt wurden.

In *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) gibt es sieben WhiB-Proteine, welche zusammen auf einem Genlocus lokalisiert sind und sehr große strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Es handelt sich um kleine Proteine, die aus einer WhiB-Domäne mit vier hoch konservierten Cysteinresten und einer AT-Hook-ähnlichen Domäne, die als DNA-Bindemotiv gilt, bestehen. Über die vier Cysteinreste wird ein labiles $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster gebunden, welches sowohl auf O_2 als auch NO reagiert. Dies befähigt die WhiB-Proteine als direkte Redoxsensoren zu agieren (Soliveri *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2012a; Larsson *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2012b).

Die multiplen WhiB-Proteine sind wichtig für die Persistenz von *M. tuberculosis* innerhalb der Makrophagen eines Wirtes und damit essentiell für den Erfolg als Pathogen (Singh *et al.*, 2007; Crack *et al.*, 2012b). Jedoch besitzt jedes WhiB eine spezifische Funktion (Geiman *et al.*, 2006; Larsson *et al.*, 2012), die von der Regulation der Antibiotika Resistenz (Morris *et al.*, 2005), über die Regulation der Zellteilung (Konar *et al.*, 2012) bis hin zur Regulation der oxidativen Stressantwort (Alam *et al.*, 2007; Chawla *et al.*, 2012) und weiteren Regulationen, die zur Virulenz von *M. tuberculosis* beitragen (Alam *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010; Casonato *et al.*, 2012), reichen.

WhiB3 wird konstitutiv exprimiert (Mulder *et al.*, 1999) und ist essentiell für das Überleben in den Makrophagen (Singh *et al.*, 2007). Neben der Regulation der (virulenten) Lipid- und Polyketid-Biosynthese als Antwort auf die Wirt-Makrophagen (Singh *et al.*, 2009; Domenech *et al.*, 2001), interagiert WhiB3 auch direkt mit dem Sigmafaktor RpoV (Steyn *et al.*, 2002). Dieser ist essentiell für die Virulenz und unterstreicht die Wichtigkeit von WhiB3 für die Virulenz und Pathogenität von *M. tuberculosis*. WhiB3 wird unter Säurestress stark hochreguliert, was auf einen sauren pH-Wert als direktes Signal hindeutet (Mehta *et al.*, 2016; Geiman *et al.*, 2006).

Das labile $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster von WhiB3 reagiert mit Sauerstoff analog zu FNR_{Ec} . Unter anaeroben Bedingungen koordiniert WhiB3 ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, welches in Anwesenheit von Sauerstoff über ein $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Intermediat zu einem planaren $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster degradiert. Allerdings degradiert das Cluster von FNR_{Ec} wesentlich schneller als das WhiB-Cluster (Singh *et al.*, 2007). Neben O_2 reagiert WhiB3 auch mit NO zu einem monomeren DNIC-Komplex, welcher die Aktivität von WhiB3 *in vivo* beeinflussen könnte (Singh *et al.*, 2007).

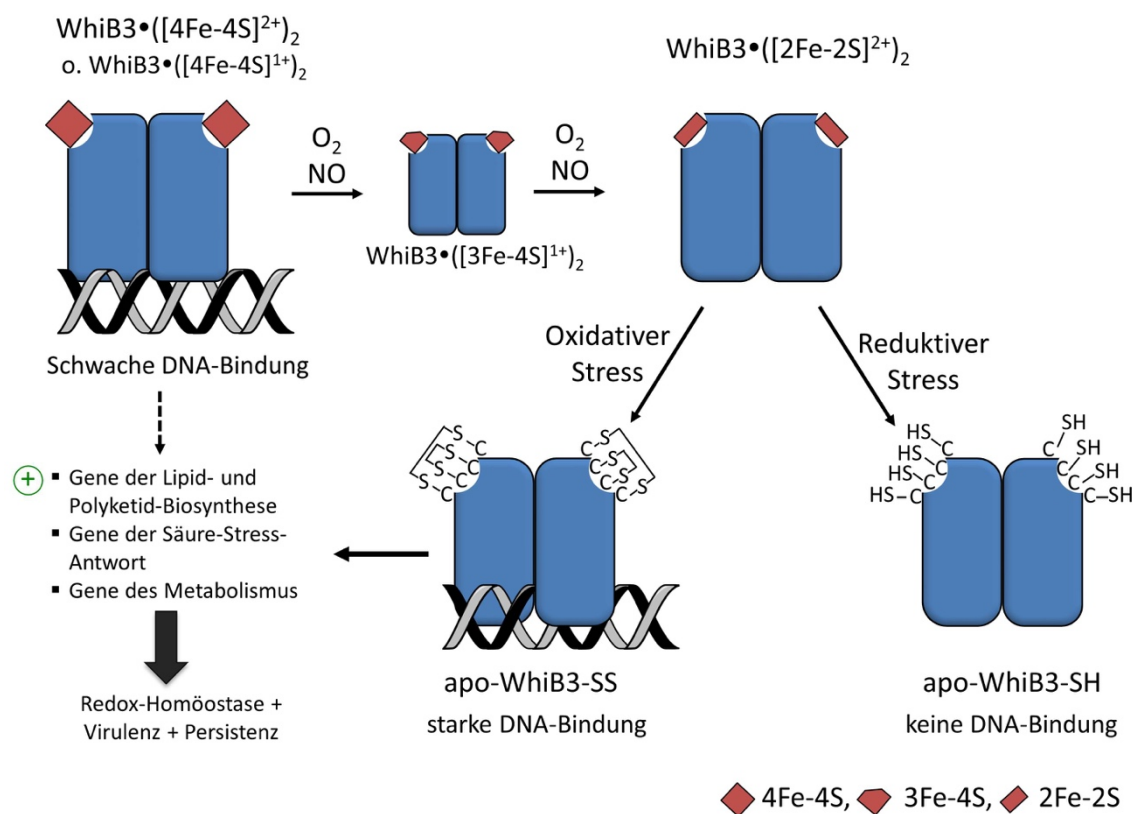


Abb. 5: Regulation der Redox-Homöostase, der Virulenz und Persistenz in *M. tuberculosis* durch den direkten [Fe-S]-haltigen Redoxsensor WhiB3. Unter anaeroben Bedingungen liegt WhiB3 in aktiver, dimerer Form vor und koordiniert N-terminal über vier konservierte Cysteinreste ein kubisches [4Fe-4S]²⁺-Cluster pro Monomer. Die aktive Form zeigt eine schwache DNA-Bindeaktivität. In Anwesenheit der Dormanz-Signale O₂ oder NO kommt es zur Umwandlung des kubischen Clusters zu einem planaren [2Fe-2S]²⁺-Cluster mit dem [3Fe-4S]¹⁺-Intermediat. Bei andauernder Exposition mit O₂ oder anderen radikalen Sauerstoffspezies kommt es zum vollständigen Verlust des [Fe-S]-Clusters und es entsteht apo-WhiB3. Je nach vorliegenden Redoxbedingungen liegen die Cysteinthiole in reduzierter oder oxidiertem Zustand vor. Unter oxidativen Bedingungen bilden sich zwei intramolekulare Disulfidbrücken, welche die DNA-Bindeaktivität stark erhöhen. WhiB3 reguliert redoxabhängig Gene des virulenten Lipid- und Polyketid-Anabolismus, Gene für die Säure-Stress-Antwort sowie Gene des Metabolismus. Mit Hilfe des redoxsensitiven [4Fe-4S]²⁺-Clusters reagiert WhiB3 auf die vorliegenden Umweltsignale, um die Redox-Homöostase und die virulente Persistenz innerhalb der Makrophagen des Wirtes aufrecht zu erhalten.

Die DNA-Bindeaktivität von WhiB3 wird nicht durch den Redoxzustand des Clusters beeinflusst, sondern durch den Redoxzustand der Cysteinreste. Die Cysteine von WhiB3 werden posttranslational modifiziert als Antwort auf ein Redoxungleichgewicht, welches durch die Wirtantwort während der Infektion verursacht wird. Unter oxidativen Stressbedingungen durch NO oder O₂ wird apo-WhiB3 an den Cysteinresten oxidiert und zwei intramolekulare Disulfidbrücken werden gebildet, die wiederum die DNA-Bindeaffinität von WhiB3 stark erhöhen. Bei stark reduktiven Stressbedingungen, die durch die Akkumulation von Fettsäuren des Wirtes entstehen können, liegen die Cysteinthiole von WhiB3 reduziert vor, was die DNA-Bindung verhindert (Singh *et al.*, 2009).

WhiB3 agiert mit seinem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster als direkter Redoxsensor, der die Umweltsignale mit dem, für das Überleben essentiellen, Intermediärstoffwechsel integriert, um die Redox-Homöostase und die Persistenz aufrecht zu erhalten (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009).

2.3.5 Vergleich der vier direkten O_2 -Sensoren

FNR aus *E. coli* und *B. subtilis*, NreB aus *Staphylococcus* und WhiB3 aus *M. tuberculosis* koordinieren über stark konservierte Cysteinreste ein O_2 -labiles $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, was sie zu direkten Sauerstoffsensoren macht. Bei Exposition mit Sauerstoff zeigen die vier Sensoren eine ähnliche Cluster-Degradation zu einem planaren $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster, bis hin zu einem vollständigen Verlust des Clusters in apo-Protein, wobei die physiologische Bedeutung der letzten Schritte in einigen Sensoren unklar ist.

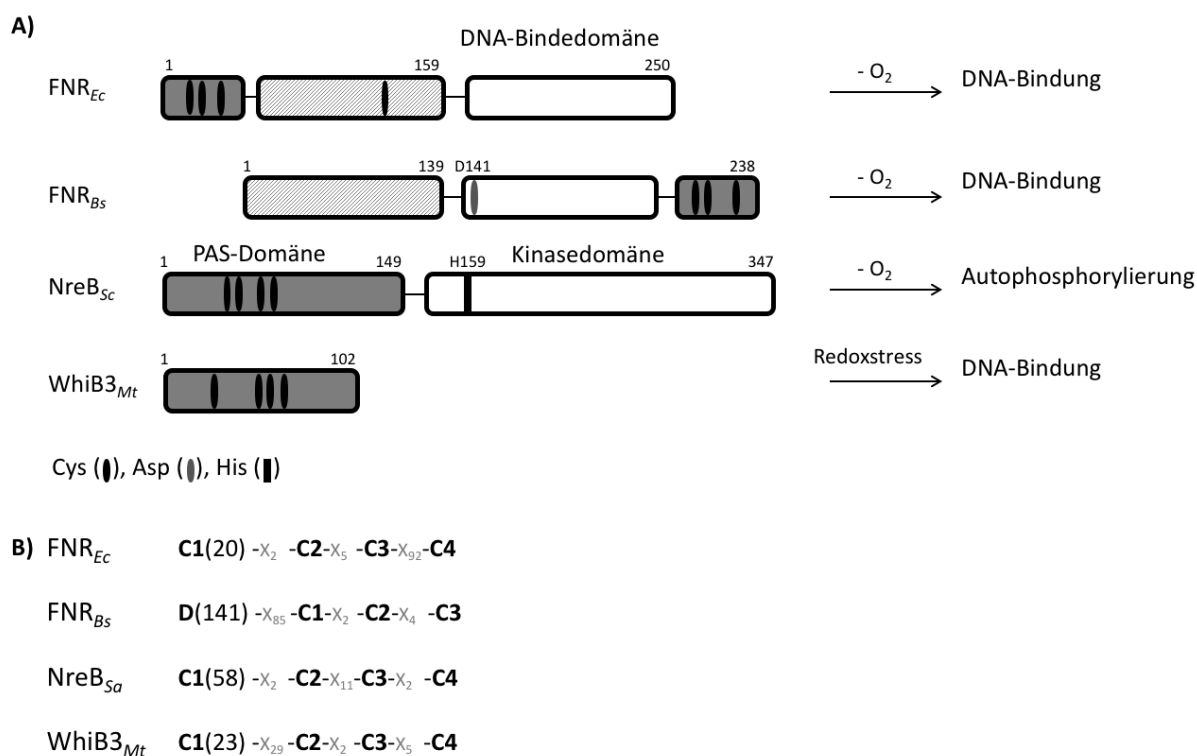


Abb. 6: Domänenstruktur und Cluster-koordinierendes Cysteinmotiv der $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -haltigen Sensoren FNR_{Ec}, FNR_{Bs}, NreB und WhiB3. A) stellt die cysteintragenden sensorischen Domänen (dunkelgrau), die Outputdomänen (weiß) sowie die Art der Antwort (DNA-Bindung oder Autophosphorylierung) dar. Die Positionen der $[\text{Fe-S}]$ -Cluster-bindenden konservierten Cystein- und Aspartatreste sowie der konservierte Phosphorylierungsrest His159 der Sensorkinase NreB aus *S. carnosus* sind eingezeichnet. B) zeigt die Sequenzmotive der konservierten Cystein (C)- und Aspartat (D) -reste, die das $[\text{Fe-S}]$ -Cluster binden, sowie die Position innerhalb der Proteinsequenz. Variable Aminosäurereste zwischen den Cluster-koordinierenden Resten sind mit x und der entsprechenden Anzahl gekennzeichnet. Verändert nach Uden *et al.* (2013).

Trotz der ähnlichen Clusterreaktionen mit O_2 , gibt es doch Unterschiede zwischen den Proteinen, die in Abb. 6 dargestellt sind. Während FNR und WhiB3 als direkte DNA-bindende Transkriptionsfaktoren agieren, handelt es sich bei NreB um eine Sensorkinase, die die Genexpression indirekt über ihren Antwortregulator NreC steuert. FNR_{Ec} besteht aus einer N-terminalen Sensordomäne mit dem $[\text{Fe-S}]$ -

Cluster und der C-terminalen DNA-Bindedomäne (Unden & Guest, 1985; Melville & Gunsalus, 1990). FNR_{B_s} zeigt eine ähnliche Domänenstruktur, jedoch befindet sich am C-Terminus die Cystein-tragende Domäne (Reents *et al.*, 2006a). Die Sensorkinase NreB trägt das Cluster ebenfalls am N-Terminus in der PAS-Domäne, an die sich die Kinasedomäne anschließt (Mullner *et al.*, 2008). WhiB3 besteht nur aus einer Domäne, die sowohl das Cluster koordiniert, als auch das DNA-Bindemotiv aufweist (Soliveri *et al.*, 2000).

Die jeweilige Konsensus-Sequenz der Cluster-koordinierenden Reste ist für jeden Sensor spezifisch (Abb. 6B). Bei FNR_{E_c} und WhiB3 liegen jeweils drei Cysteinreste relativ nah beieinander (**C-x₂-C-x₅-C**), wohingegen der vierte Rest einen Abstand von 92 bzw. 29 Resten aufweist (Green *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2007). In NreB sind die zwei Cysteinpaare (**C-x₂-C**) lediglich durch elf Aminosäuren voneinander getrennt (Kamps *et al.*, 2004). Das *Spacing* der drei Cluster-koordinierenden Cysteine aus FNR_{B_s} ähnelt dem von FNR_{E_c} (**C-x₂-C-x₄-C**), allerdings befindet dieses sich am C-Terminus. Der vierte Ligand des Clusters ist ein Aspartatrest, der sich 85 Aminosäuren davor in der DNA-Bindedomäne befindet (Reents *et al.*, 2006a; Gruner *et al.*, 2011).

Entsprechend der Lage der konservierten Cysteinreste befinden sich die [Fe-S]-Cluster von FNR_{E_c}, NreB und WhiB3 in der N-terminalen Domäne, während FNR_{B_s} sein Cluster in der C-terminalen Domäne trägt.

In *E. coli* ist die FNR_{E_c}-Aktivität als Transkriptionsfaktor abhängig von der Vollständigkeit des [4Fe-4S]²⁺-Clusters, was wiederum zur Dimerisierung und Genexpression führt (Lazazzera *et al.*, 1996). FNR_{B_s} und NreB liegen als permanente Dimere vor, sodass allein der Zustand des [Fe-S]-Clusters über die Aktivität entscheidet. Durch den Zerfall des Clusters nach O₂-Exposition kommt es zu strukturellen Änderungen innerhalb der Proteine, da das planare Cluster von denselben Resten, wie das kubische Cluster, gebunden wird (Gruner *et al.*, 2011; Mullner *et al.*, 2008). Bei WhiB3 von *M. tuberculosis* entscheidet der Redoxzustand der Cysteinreste über die Aktivität, sodass WhiB3 eher ein Redoxsensor der Dormanz-Signale NO und O₂ als ein primärer Sauerstoffsensoren ist (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009).

2.4 Fragestellung zur Phylogenie von [Fe-S]-haltigen O₂-Sensoren

FNR, NreB und WhiB3 sind nicht-verwandte Sensoren, die sehr ähnliche [Fe-S]-Cluster mit einer ähnlichen Reaktion mit Sauerstoff aufweisen. Sie besitzen jedoch andere Funktionen und Wirkungsmechanismen. Diese Tatsache führt zu folgenden Fragen: Sind diese [4Fe-4S]-haltigen Sauerstoffsensoren mehrfach unabhängig voneinander entstanden? Oder besitzen sie einen gemeinsamen Vorfahren, von dem sich alle ableiten lassen? Wie sieht die phylogenetische Verteilung der Sensoren aus?

Aufgrund der Tatsache, dass FNR Teil der FNR-CRP-Superfamilie ist und Ähnlichkeiten zu CRP aufweist (Shaw *et al.*, 1983; Korner *et al.*, 2003), wurde bereits postuliert, dass FNR von CRP abstammen könnte (Shaw *et al.*, 1983; Cruz Ramos *et al.*, 1995).

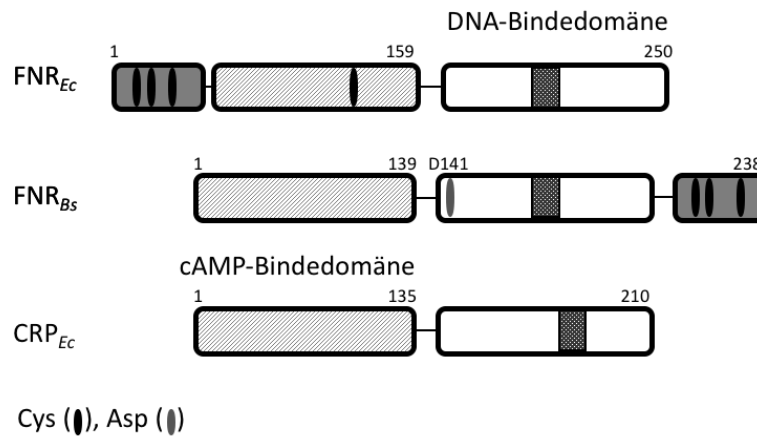


Abb. 7: Domänenstruktur von FNR aus *E. coli* und *B. subtilis* und CRP aus *E. coli*. Dargestellt sind die cysteinetragenden sensorischen Domänen (dunkelgrau) der O₂-Sensoren FNR, die cAMP-bindende Domäne (hellgrau schraffiert) von CRP sowie die DNA-Bindedomänen (weiß). Die Positionen der [Fe-S]-Cluster-bindenden konservierten Cystein- und Aspartatreste sowie des Helix-Turn-Helix (HTH)-Motivs (grau schraffiert) innerhalb der DNA-Bindedomäne sind angedeutet.

CRP ist kein Sauerstoffsensor, sondern ein cAMP-abhängiger globaler Genaktivator. Wie in Abb. 7 dargestellt, besteht er aus einer sensorischen cAMP-Bindedomäne und einer Helix-Turn-Helix-(HTH)-DNA-Bindedomäne (Korner *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2009). Die DNA-Bindedomänen der drei Transkriptionsfaktoren zeigen viele Ähnlichkeiten. Sowohl die Länge der Domänen von etwa 70-80 Aminosäuren, als auch die Lage des HTH-Motivs ähneln sich. Die FNR_{Bs}-Bindestellen sind identisch mit den *E. coli* CRP-Bindestellen (TGTGAN₆TCACA), wohingegen die FNR_{Ec}-Bindestelle davon abweicht (Cruz Ramos *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996). Nach der Akkumulation von Sauerstoff auf der Erde könnte sich FNR aus CRP entwickelt haben, indem ein O₂-sensitives Cluster entweder N-terminal (*E. coli*) oder C-terminal (*B. subtilis*) addiert wurde.

Um diese Fragen zu beantworten wurden bioinformatische Studien zu den Sensoren FNR aus *E. coli* und *B. subtilis*, NreB aus *S. aureus* und WhiB3 aus *M. tuberculosis*, sowie von CRP aus *E. coli* durchgeführt. In diesen Studien wurden mit Hilfe von Sequenzanalysen für jedes Protein homologe Proteine identifiziert und diese in ihre entsprechende Proteinfamilie geclustert (Nelson-Sathi *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2016). Es wurden phylogenetische Stammbäume und eine Anwesenheitsmatrix erstellt, um die Verteilung der Sensoren darzustellen.

2.5 Die Rolle des GAF-Domänenproteins NreA - Nitratsensor des NreABC-Systems

Das NreABC-System ist in Staphylokokken essentiell für die Regulation der Nitratatmung unter anaeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen (Mullner *et al.*, 2008; Nilkens *et al.*, 2014). Während NreB

als direkter O₂-Sensor die vorliegenden O₂-Bedingungen über ein [4Fe-4S]²⁺-Cluster registriert (Mullner *et al.*, 2008), fungiert NreA durch direkte Bindung von Nitrat als Nitratsensor (Niemann *et al.*, 2014).

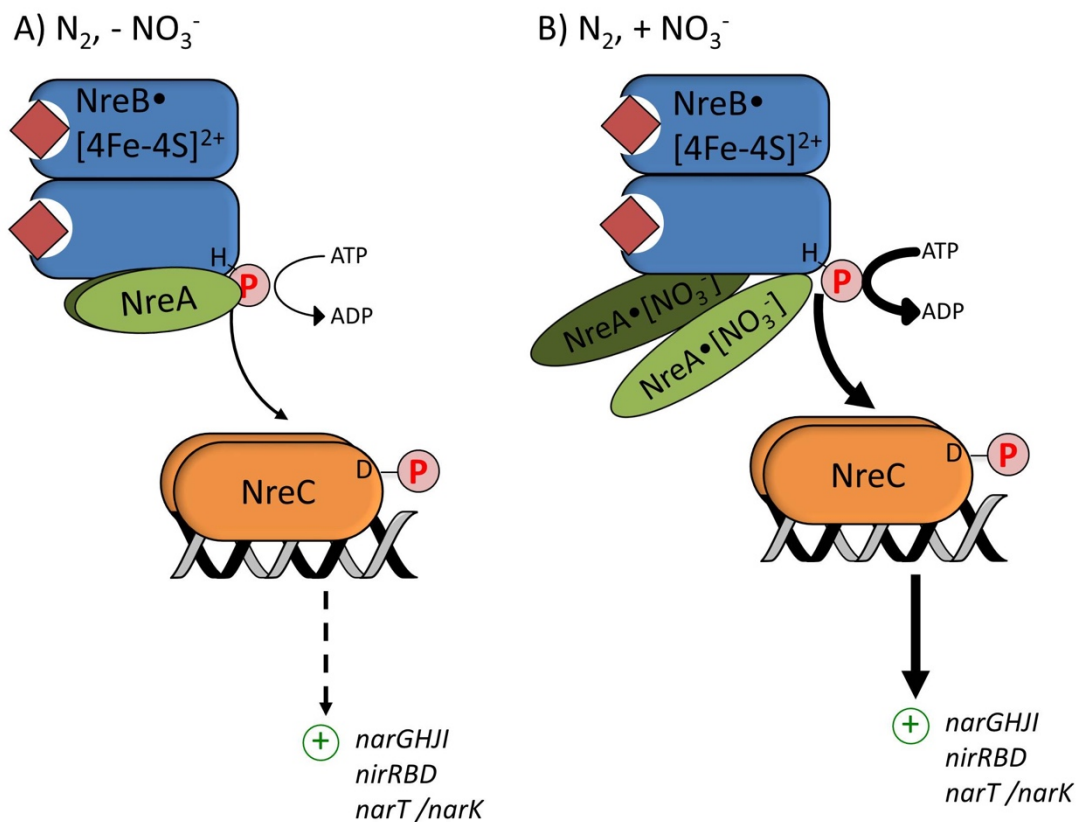


Abb. 8: Regulation der Nitratatmung durch das NreABC-Systems in *S. carnosus*. NreA interagiert unter anaeroben Bedingungen in dimerer Form mit NreB und reguliert dadurch die Autophosphorylierungsaktivität von NreB herunter. In Anwesenheit von Nitrat bildet sich der NreA[NO₃⁻]-Komplex aus, was zu einer veränderten Interaktion zwischen NreA und NreB führt. Der negative Effekt von NreA auf NreB geht in Anwesenheit von Nitrat verloren und die Zielgene werden maximal exprimiert (Nilkens *et al.*, 2014).

Unter anaeroben Bedingungen sowie Fehlen von Nitrat bindet NreA als Dimer an NreB und reguliert dessen Autophosphorylierung herunter (Abb. 8). In Anwesenheit von Nitrat wird der inhibierende Effekt von NreA auf NreB aufgehoben, da die Ligandenbindung zu einer Konformationsänderung in NreA führt. Diese resultiert wiederum in einer veränderten Interaktion der beiden NreA-Monomere sowie zwischen NreA und NreB (Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014; Koch-Singenstreu, 2013).

NreA ist ein kleines GAF-Domänenprotein, dessen ligandgebundene Form bereits kristallisiert wurde (Niemann *et al.*, 2014). GAF-Domänen (benannt nach cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylatzyklase, Transkriptionsfaktor FhlA aus *E. coli*) binden im Allgemeinen kleine regulatorische Moleküle wie Nitrat oder cGMP und sind deswegen in Proteinen zu finden, die für die sensorische Wahrnehmung und Übertragung von Signalen zuständig sind (Aravind & Ponting, 1997; Ho *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002a; Martinez *et al.*, 2002b).

Mit Hilfe von multiplen Sequenzvergleichen wurden zwei konservierte Bereiche auf der NreA-Oberfläche identifiziert, die auf zwei potentielle Interaktionsflächen hindeuten (Koch-Singenstreu, 2013). Einer der Bereiche könnte für die Homodimerisierung zweier NreA-Monomere zuständig sein, wohingegen der zweite Bereich die Interaktionsstelle zwischen NreA und NreB darstellen könnte.

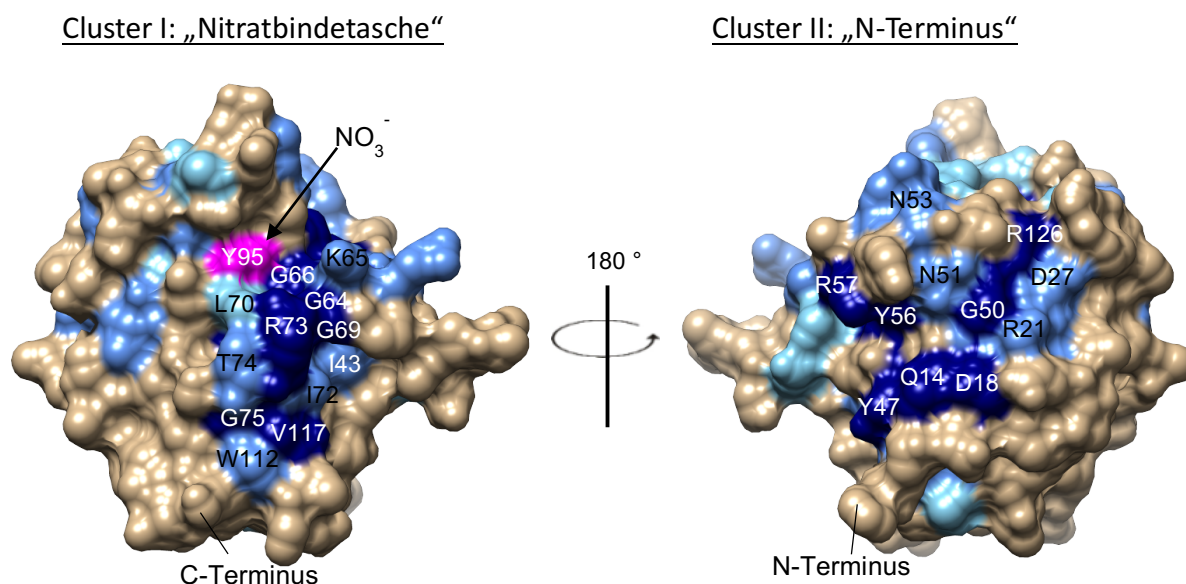


Abb. 9: Konservierte Aminosäurereste auf der NreA-Oberfläche. Als Grundlage für die Colorierung der oberflächenexponierten Reste diente ein multiples Alignment von NreA und Homologen aus Staphylokokken, Laktobazillen und anderen Spezies (Koch-Singenstreu, 2013). Der Grad der Konservierung steigt von beige (nicht konserviert) bis dunkelblau (vollständig konserviert). Die Nitratbindetasche ist durch Y95 angedeutet und in Magenta eingefärbt.

Cluster I ist im Bereich der Nitratbindetasche, welche durch den Tyrosinrest Y95 angedeutet wird, lokalisiert. Y95 bildet eine Art Deckel über die Bindetasche, sodass gebundenes Nitrat vollständig abgeschirmt wird (Niemann *et al.*, 2014). Der zweite konservierte Bereich des Cluster II liegt auf der gegenüberliegenden Proteinseite um den N-Terminus herum.

2.6 Fragestellung zur Interaktion zwischen dem O₂-Sensor NreB und dem Nitratsensor NreA

Um den regulatorischen Mechanismus des NreABC-Systems, wie den inhibitorischen Effekt von NreA auf NreB, im Detail verstehen zu können, ist die Identifizierung der funktionell wichtigen Interaktionsflächen zwischen dem Nitratsensor NreA und dem O₂-Sensor NreB, sowie die Dimerisierungsstellen der NreA-Monomere essentiell.

Hierzu wurden die konservierten, oberflächenexponierten Aminosäurereste von NreA mittels gerichteter Mutagenese substituiert und sowohl Funktions- als auch verschiedene Interaktionsstudien durchgeführt.

3 Material und Methode

3.1 Bioinformatische Methoden

Die bioinformatischen Analysen, welche die Identifizierung homologer Proteine, die Gruppierung in die Proteinfamilien sowie die Erstellung und Rekonstruktion der phylogenetischen Stammbäume und Matrizen beinhaltet, wurden von Madeleine Weiß aus der Arbeitsgruppe von Prof. Martin vom Institut für Molekulare Evolution der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Bereitstellung der Referenzsequenzen, die manuelle Identifizierung der Cysteinreste innerhalb aller Sequenzen sowie die Auswertungen und Analysen der Stammbäume wurden eigenständig durchgeführt.

3.1.1 Sequenzen

Die Proteinsequenzen der zu untersuchenden [4Fe-4S]-haltigen Sauerstoffsensoren basieren auf den Datenbanken UniProt (Consortium, 2017) und GenBank (Benson *et al.*, 2005) mit den jeweiligen *Accession numbers* (Zugangsnummern): FNR_{Ec} (UniProt: P0A9E5); FNR_{Bs} (GenBank: KIX83509); NreB_{Sa} (GenBank: EFW34334); WhiB3_{Mt} (GenBank: KPU49338) und CRP_{Ec} (UniProt: P0ACJ8).

Außerdem wurden von M. Weiß alle Proteinsequenzen der 1.981 komplett sequenzierten, prokaryotischen Genomen von der NCBI RefSeq Datenbank (Version Juni 2012) heruntergeladen und wie vorher beschrieben in Proteinfamilien eingeklustert (Nelson-Sathi *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2016).

3.1.2 Identifizierung der homologen Proteinfamilien

Mit Hilfe von Sequenzvergleichen der fünf zu untersuchenden Proteine mit allen 6,1 Millionen Proteinen konnten homologe Sequenzen identifiziert werden. Hierzu wurde BLASTp (Altschul *et al.*, 1997) mit einem E-Schwellenwert von $\leq 10^{-10}$ und lokaler Identität von $\geq 25\%$ verwendet. *BLAST*-Treffer, die eine globale Aminosäureidentität nicht kleiner als 25 % aufwiesen, wurden anschließend mit den vorher definierten Proteinfamilien verglichen. Die globale Aminosäureidentität wurde mit dem Algorithmus Needle von EMBOSS 6.6.0 (Rice *et al.*, 2000) ermittelt.

Als homologe Proteinfamilie wurde die Proteinfamilie mit der höchsten Anzahl von *BLAST*- Treffern für die entsprechende Referenzsequenz identifiziert. Die Verteilung der entsprechenden *BLAST*-Treffer für jedes Referenzprotein wurde in einer Anwesenheitsmatrix visuell dargestellt.

3.1.3 Identifizierung der Cysteinanzahl

Das Vorhandensein und die Anzahl der Cluster-koordinierenden Cysteinreste ist ein Indiz dafür, ob ein zu den Referenzen homologes Protein als direkter Sauerstoffsensor mit einem [Fe-S]-Cluster agieren kann. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen der Referenzproteine mit allen *BLAST*- Treffern der

homologen Proteine mit Clustal Omega v1.2.4 (Sievers *et al.*, 2011) verglichen und die konservierten Cysteinreste manuell gesucht, gezählt und farblich in den Stammbäumen markiert. Es wurden neben der klassischen Anzahl von vier Cysteinresten auch Varianten mit drei (grün markiert), zwei (blau), einem (rot) oder keinem (grau) Cysteinrest/en identifiziert. Homologe Proteine, die keine konservierten Cysteinreste aufwiesen, wurden genauer mit der Referenzsequenz verglichen. Für FNR_{BS} und NreB wurden die Proteinsequenzen der OCys-Varianten aus den Alignments entfernt und neue phylogenetische Stammbäume konstruiert.

3.1.4 Multiple Sequenzalignments und Stammbaumrekonstruktion

Die identifizierte homologe Proteinfamilie für FNR aus *E. coli* enthielt sehr viele ähnliche Proteinsequenzen derselben Art. Aus diesem Grund wurden bei Sequenzen mit einer globalen Identität von $\geq 80\%$ auf Artenlevel nur die längste Sequenz in der Proteinfamilie belassen. Von der Entfernung der übrigen Sequenzen waren keine vorher identifizierten Cys-Varianten betroffen.

Die in der homologen Proteinfamilie identifizierten Proteinsequenzen wurden mit der entsprechenden Referenzsequenz mittels MAFFT v7.299b (Kato & Standley, 2013) mit den gewählten Optionen: `--localpair`, `--maxiterate=1000` und `--anysymbol` verglichen. Maximum Likelihood Stammbäume wurden mit Hilfe von RaxML v8.2.8 (Stamatakis, 2014) und dem PROTCATWAG Model konstruiert. Für CRP aus *E. coli* wurde kein Stammbaum konstruiert. In den konstruierten Stammbäumen von FNR_{BS} und NreB wurden mittels Figtree v1.3.1 die Gruppen an einem Ast auf Gattungsebene zusammengefasst, um übersichtlichere, schematische Stammbäume zu erhalten. Voraussetzung hierfür war die gleiche Anzahl an konservierten Cysteinresten.

3.1.5 Verwendete Programme und Server

Tabelle 1: Verwendete Programme und Server

Programm/Server	Beschreibung	Referenz
NCBI, Pubmed	Datenbank mit Literatur, Genom- und Proteindaten, funktionellen Informationen, etc.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
RCSB PDB	Datenbank mit Proteinstrukturen	http://www.pdb.org
UniProt	Datenbank mit Proteinsequenzen und funktionellen Informationen	http://www.uniprot.org
BioCyc	Genomdatenbank mit funktionellen Annotationen	https://biocyc.org
BLAST	Vergleich von Nukleotid- und Proteinsequenzen	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Clustal Omega	Vergleich von Proteinsequenzen	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Chimera	Visualisierung von Proteinstrukturen	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/

OligoCalc	Primerdesign, Berechnungen von Schmelztemperaturen etc.	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
Clone Manager	Visuelles Klonieren	Version 5.0; Sci-Ed Software

3.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Alle konstruierten Stämme und Plasmide wurden zur Aufbewahrung in die Stammhaltung der Arbeitsgruppe aufgenommen und in 1,5 ml frischem Medium sowie gleichem Volumen Glycerin (50 % v/v) bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Stämme aus *S. carnosus* und *E. coli*

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>S. carnosus</i> m1	<i>nreABC::ermBR</i> , Ery ^r	(Fedtke <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>lac</i> , [<i>F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIqZΔM15</i> , <i>Tn10</i> (<i>Tet^r</i>)]	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , Hte [<i>F' proAB lac^qZΔM15 Tn10</i> (<i>Tet^r</i>) Amy Cam ^r]	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>F'</i> [<i>traD36 proAB⁺</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i>]	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> BTH101	<i>F-</i> <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galk16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Strr</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. coli</i> M15	[pREP4], <i>NaI^S</i> , <i>Str^S</i> , <i>Rif^S</i> , <i>Thi⁻</i> , <i>Lac⁻</i> , <i>Ara⁺</i> , <i>Gal⁺</i> , <i>MtI⁻</i> , <i>F⁻</i> , <i>RecA⁺</i> , <i>Uvr⁺</i> , <i>Lon⁺</i> , <i>Kan^r</i>	Qiagen

Alle verwendeten Plasmide sind tabellarisch im Anhang (Tab. A 1-5) aufgelistet.

3.3 Anzucht der Bakterien

Zur sterilen Verwendung der Medien und Zuchtzusätze wurden diese autoklaviert. Hitzelabile Stoffe wie Antibiotika wurden steril filtriert (0,45 µm-Filter). Falls nicht anders beschrieben, wurde zur Herstellung H₂O_{dest.} verwendet.

Generell erfolgte die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001), während *S. carnosus* in BM-Medium (Götz & Schumacher, 1987) kultiviert wurde. BM-Medium besteht aus LB-Medium mit 1 g/L Glucose sowie 1 g/L Na₂HPO₄. Für Zuchten der Reporterstudien (Lipasetest) wurde BML-Medium (LB-Medium + 1 g/L Glucose) verwendet. In Agarplatten wurde entsprechend 15 g/L Agar-Agar, Kobe I zugesetzt. Zur Regeneration der *E. coli* Zellen nach Transformation diente SOC-Medium (Sambrook & Russell, 2001), welches aus SOB-Fertigmedium (Roth) und 3,6 g/L Glucose hergestellt wurde.

Den Medien wurde das entsprechende Antibiotika in folgender Endkonzentration zugesetzt: Ampicilin (Amp) und Streptomycin (Strep): 100 µg/ml; Kanamycin (Kan): 50 µg/ml; Erythromycin (Ery): 25 µg/ml; Chloramphenicol (Cam): 20 µg/ml, sowie Tetracyclin (Tet): 15 µg/ml. Bei Verwendung von zwei verschiedenen Antibiotika wurde die angegebene Endkonzentration jeweils halbiert.

Aerobe Vorkulturen (VK) wurden in 5 ml Medium mit entsprechendem Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 180 UpM gezüchtet. Anaerobe VK (10 ml) wurden stehend bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Das Beimpfen der Übernachtkultur erfolgte von der Platte mit einer Einzelkolonie. Die Hauptkulturen (HK) enthielten, wenn nicht anders beschrieben, die gleichen Zusätze wie die VK.

Für die **Herstellung von hitze- oder elektrokompetenter Zellen** wurden die HK zweiprozentig mit der entsprechenden VK inokuliert und aerob in Schikanenkolben bei 37 °C ohne Antibiotikum bis zu einer Optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) von 0,5-0,7 gezüchtet.

Die Anzucht der BTH101-Stämme für die **BACTH-Interaktionsstudien** erfolgten in *deep well*-Platten (VWR, 96er) mit einem Kulturvolumen von 500 µl. Neben Amp und Kan wurden den Kulturen als Elektronenakzeptor DMSO (20 mM), als Induktionsmittel IPTG (0,5 µM) und optional $NaNO_3$ (10 mM) zugesetzt. Zum Beimpfen der semianaeroben VK wurden Einzelkolonien mit Porzellankügelchen von den KAI-Platten gepickt. Nach 5-6 h Wachstum bei 30 °C, wurden die HK ein- bis zweiprozentig mit der VK inokuliert. Die anaerobe HK wurde im Anaerobentopf etwa 15 Minuten unter Vakuum anaerobisiert und anschließend mit Stickstoff begast. Zuchten der exponentiellen Phase (OD_{578} 0,5-0,8) wurden für 8 h, Zuchten der stationären Phase (OD_{578} 1,0-1,4) für 16 h bei 30 °C inkubiert.

Die Kultivierung von *S. carnosus* für die ***narG-lip*-Reporterstudien** erfolgte aerob in Schikanenkolben (300 ml) oder anaerob in Müller-Krempel-Flaschen (125 ml) in 40 ml BML-Medium. Die entsprechenden VK wurden in frischem Medium gewaschen und in 5 bzw. 1 ml Medium resuspendiert. Mit Hilfe der resuspendierten VK wurden die HK mit entsprechenden Zusätzen auf eine OD_{578} von $0,1 \pm 0,01$ eingestellt. Aerobe HK wurden bei 37 °C und 180 UpM inkubiert, während anaerobe HK nach 45minütiger Anaerobisierung unter Vakuum und mehrmaligem Begasen mit Stickstoff bei 37 °C im Wasserbad gezüchtet wurden. Bei einer OD_{578} von $0,5 \pm 0,01$ wurde das Wachstum auf Eis gestoppt und 1 ml der Kultur entnommen. Durch Zentrifugation wurde der Kulturüberstand von den Zellen abgetrennt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für das aerobe **oxidative *in vivo* Cystein-Crosslinking** wurde der Stamm M15 mit pQE31*nreA** in 500 µl LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum (48-Well-Platte) über Nacht bei 37 °C und 1300 UpM (Titramax 1000; Heidolph, Schwabach) gezüchtet. Die HK wurde zweiprozentig inokuliert und nach zwei Stunden Wachstum mit 1 mM IPTG für vier weitere Stunden induziert. Die Anzucht der semianaeroben VK erfolgte in *deep-well*-Platten bei 37 °C für etwa 20 Stunden. Nach zweiprozentiger

Inokulation der HK sowie direkter Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Platte ins Anaerobenzelt (95 % N, 5 % H) eingeschleust und anaerob bei ca. 30 °C für weitere 24 h inkubiert.

Die Anzucht der Zellen für das **modifizierte Cystein-Crosslinking** erfolgte analog zum aeroben, oxidativen *in vivo* Cystein-Crosslinking, jedoch wurden 5 ml Kulturvolumen in Reagenzgläsern gezüchtet. Um den Effekt von Nitrat zu verifizieren wurden optional 10 mM NaNO₃ in die VK sowie HK gegeben. Nach der Induktionsdauer wurden pro Ansatz je zweimal 2 ml Kultur mittels Zentrifugation geerntet und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Zur Vermeidung der Oxidation durch Luftsauerstoff erfolgte die Anzucht der Zellen für die **Zugänglichkeitsstudien** unter anaeroben Bedingungen. 500 µl VK wurde in *deep-well*-Platten mit entsprechendem Antibiotikum sowie optional 10 mM NaNO₃ versetzt. Im Anaerobentopf fand nach Anaerobisierung unter Vakuum und Begasung mit Stickstoff das Einschleusen der VK ins Anaerobenzelt statt. Dort wurden die VK bei etwa 30 °C für etwa 20 Stunden kultiviert. Die ebenfalls sterile, anaerobisierte HK (500 µl LB inklusive Antibiotika und 1 mM IPTG, *deep-well*-Platte) wurde im Anaerobenzelt zweiprozentig inokuliert und für 24 h inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen geerntet. Im Kontrollversuch mit PEG-Mal wurden die Zellen analog angezüchtet, allerdings erfolgte die Inokulation der HK bereits nach 8 h Wachstum der VK.

Zur Bestimmung des Dimerisierungszustands von NreA mittels **Gelfiltration** wurde NreA und NreA-Varianten in M15 Zellen (pQE31*nreA*) überproduziert. Die aerobe HK wurde zweiprozentig inokuliert und ohne Antibiotikum bei 37 °C gezüchtet. Die Zugabe von 1 mM IPTG bei OD₅₇₈ von 0,5 startete die fünfstündige Induktion. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung am nächsten Tag gelagert.

Für die **Expressionsstudien** zum Nachweis der Proteinstabilität erfolgte die Kultivierung der Bakterien aerob bei 30 °C in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen. Die HK (5 ml LB) wurde dreiprozentig inokuliert und bei 30 °C aerob für 3 h inkubiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-System

Die Interaktion zwischen NreA und NreB sowie zwischen NreA-Monomeren wurde *in vivo* in *E. coli* BTH101 untersucht (Karimova *et al.*, 1998; Karimova *et al.*, 2005). Die T18 und T25 Fragmente wurden an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Als Positivkontrollen wurden T18-*zip* und T25-*zip* eingesetzt. Alle verwendeten Plasmide sind im Anhang in Tab. A 1 aufgelistet. Es wurden je 10 ng jedes Plasmidpaars in BTH101 co-transformiert, auf KAI-Platten ausplattiert (20 g/L LB-Medium, 15 g/L Agar-Agar, Kobe I, 25 µg/ml Kan, 50 µg/ml Amp und 0,5 mM IPTG) und für etwa 40 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Der β -Galaktosidasenachweis mit dem Substrat *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) (Sambrook & Russell, 2001) wurde in 96-Well-Platten sowohl mit Zellen der exponentiellen (OD_{578} 0,5-0,8) als auch stationären (OD_{578} 1,0-1,4) Wachstumsphase durchgeführt. Zur Berechnung der β -Galaktosidaseaktivität in Miller-Units [MU] wurde folgende Formel verwendet: $(1000 \cdot \Delta E_{420}) / (t[\text{min}] \cdot V[\text{ml}] \cdot \Delta E_{570})$ mit $t=20$ min und $V=0,2$ ml. Jedes getestete Interaktionspaar wurde mindestens dreimal unabhängig co-transformiert, von denen jeweils vier Kulturen in Vierfachbestimmung analysiert wurden. Der Testpuffer bestand aus 100 mM KP_i pH 7,0, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 8 mM DTT (Alternativ 2,7 ml/L β -Mercaptoethanol), 0,005 % (w/v) CTAB sowie 0,0025 % (w/v) DAS. Pro Well wurden 30 μ l ONPG (4 mg/ml) als Substrat und 50 μ l Na_2CO_3 (1 M) als Reaktionsstopp eingesetzt.

3.4.2 Quantitative Bestimmung der Lipase – *narG-lip*-Reporterstudien

Für die Funktionsstudien wurde *S. carnosus* m1 verwendet, welches das Testplasmid mit der *narG-lip*-Reporterfusion trug (pMW1040 und Derivate, Tab. A 2). Die Lipase wird von den Zellen ins Medium sekretiert, sodass die Lipaseaktivität im zellfreien Überstand quantifiziert werden kann. Als Substrat diente *p*-Nitrophenylcaprylat, welches durch die Lipase in *p*-Nitrophenol und Caprylat hydrolysiert wird. Der Lipasetestpuffer bestand aus 5 mM *p*-Nitrophenylcaprylat, 10 mM $CaCl_2$, 0,1 % Triton X-100 und 20 mM Tris/HCl pH 9,0 (Rosenstein *et al.*, 1992). 225 μ l des Puffers wurden mit 25 μ l des Überstandes in 96-Well-Platten gemischt. Die Produktion von *p*-Nitrophenol wurde für 25 min mittels Kinetik photometrisch bei 415 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Produkts betrug $16,97 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Um die spezifische Lipaseaktivität (U/g Zelltrockenmasse ZTM) zu quantifizieren, wurde die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylcaprylat pro Minute sowie die Zelldichte der Kultur berücksichtigt. 1 U entspricht dabei der Umsetzung von 1 μ mol Substrat pro Minute, während 1 ml Zellkultur mit einer OD_{578} von 1 einem Trockengewicht von 0,245 mg entspricht (Nilkens *et al.*, 2014).

3.4.3 Präparation von NreA

Die Präparation von His₆-NreA oder Varianten wurde laut Herstellerangaben (Qiagen) durchgeführt. Geerntete Zellen wurden in Puffer A (50 mM NaP_i pH 7,2, 300 mM NaCl, 20 % Glycerin und 10 mM Imidazol) resuspendiert und mittels FrenchPress (2-3 Durchgänge, $13,8 \cdot 10^7 \text{ kg s}^{-2} \text{ m}^{-1}$) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer wurden die Proteine aus dem Überstand mittels His-Tag über eine Ni-NTA-Säule mit 1,5 ml Bettvolumen isoliert. Für eine optimale Proteinausbeute wurde der Überstand zweimal auf die Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit Puffer B (50 mM NaP_i pH 7,2, 1 M NaCl, 20 % Glycerin und 20 mM Imidazol) wurden die Proteine mit Puffer C eluiert (50 mM NaP_i pH 7,2, 300 mM NaCl, 20 % Glycerin und 150 mM Imidazol).

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt (Bradford, 1976) und deren Reinheit mittels SDS-PAGE verifiziert.

3.4.4 Cystein-Crosslinking

Das oxidative *in vivo* Cystein-Crosslinking der NreA-Varianten wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Lee *et al.*, 1995; Monzel & Uden, 2015). 100 µl Zucht wurden mit 100 µl der Cu[III]-(1,10-Phenanthrolin)₃-Lösung (4 mM CuSO₄, 3,33 mM NaP_i pH 7,4 und 13 mM 1,10-Phenanthrolin) in einer 48-Well-Platte für 10 Minuten bei 25 °C unter Schütteln (1300 UpM, Titramax 1000; Heidolph, Schwabach) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl einer Kombination aus Stopplösung und SDS-Probenpuffer (20 mM Tris, 8 mM NaP_i pH 7,8, 12,5 mM EDTA, 12,5 mM NEM, 1,25 % SDS, 12,5 % Saccharose und 0,2 % Bromphenolblau) sowie Erhitzen auf 99 °C für 5 Minuten gestoppt. Für das anaerobe *in vivo* Crosslinking wurde der Versuch im anaeroben Zelt (95 % N und 5 % H, Coy) durchgeführt. Zur Analyse des Crosslinkings wurden die Proben in SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt.

Für das modifizierte Cystein-Crosslinking wurden die geernteten Zellen in 400 µl Puffer A (s. Kapitel 3.4.3) inklusive 1 mM DTT als Reduktionsmittel resuspendiert und mit sehr wenigen Glasperlen in der FastPrep-Zellmühle aufgeschlossen (2x 20 s, 5,5 m/s). Durch Zentrifugation wurden die Glasperlen sowie Zelltrümmer abgetrennt und es konnten je 100 µl des Zellextrakts in den Test eingesetzt werden.

Die Zugänglichkeitsstudien der NreA-Cysteinreste wurden nach Monzel und Uden (2015) mit einigen Anpassungen durchgeführt. Der vollständige Versuchsablauf erfolgte im anaeroben Zelt ohne Bestimmung der Zell-Proteinkonzentration. Geerntete Zellen wurden in 50 mM HEPES pH 6,8 und 250 mM NaCl resuspendiert. Die Maleimidderivate NEM (50 mM) und PEG-Mal (50 mM) wurden jeweils in HEPES-Puffer (50 mM pH 6,8 und 50 mM NaCl) gelöst und nacheinander für 1,5 h bei 25 °C mit der Kultur inkubiert. Vor Zugabe des PEG-Mals wurden die Zellen mit HEPES-Puffer inklusive 1,3 % SDS (w/v) permeabilisiert. Die Zugabe von 2x-SDS-Probenpuffer (250 mM DTT) sowie Erhitzen der Probe (99 °C, 5 min) stoppte die Reaktion. Im Kontrollversuch wurde der NEM-Schritt ausgelassen und die geernteten, gewaschenen Zellen direkt permeabilisiert sowie mit PEG-Mal inkubiert.

3.4.5 Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des Dimerisierungszustands von NreA wurden die Varianten mit dem Prinzip der Gelfiltration nach ihrer Größe über eine Superdex75-Säule 10/300 (300 mm Höhe, 24 ml Volumen, 10 mm Durchmesser, GE Healthcare Life Sciences) aufgetrennt. Als Säulenmaterial diente eine vernetzte Agarose-Dextranstruktur. Neben der stationären Phase (Säulenmaterial) wurde als mobile Phase der Laufpuffer bestehend aus 50 mM Tris/HCl pH 7,7 und 0,2 M NaCl verwendet. Zum Spülen und Reinigen der Säule wurde 20 % EtOH sowie Milli-Q-H₂O_{dest.} (Millipore) genutzt. Alle Lösungen wurden vor Verwendung filtriert und im Wasserschallbad für 15 min/L entgast. Das Probenvolumen von 1,5 ml wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben.

Zur Eichung der Säule wurden folgende Proteine verwendet: β -Amylase (Sigma; 2,5 mg; 200 kDa); Albumin Fraktion V (BSA, Roth; 3 mg; 67 kDa); C-Amylase (Sigma; 2 mg; 29 kDa) und Cytochrom C (Sigma; 4 mg; 12,4 kDa).

3.4.6 SDS-PAGE, Western Blot und Antikörperfärbung

Es wurden jeweils 20 μ l aller Proben aus den Cystein-Crosslinking- bzw. Zugänglichkeitsstudien auf die SDS-PAGE (4 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel (Sambrook & Russell, 2001)) aufgetragen. Zur Verifizierung der Reinheit nach Proteinisolation wurden 20 μ l Protein und bei der Überprüfung der Proteinstabilität (Expression von BACTH-Plasmiden) wurden 200 μ g Gesamtprotein verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Mini-PROTEAN®-System (Biorad) bei konstanter Spannung (100-150 V).

Nach Beendigung der SDS-Page wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt oder die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman™GE, Healthcare Life Sciences) übertragen. Der semidry Western Blot erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,8 mA/cm²) für 90 Minuten. Für den Antikörpernachweis wurde monoklonales Anti-NreA-Serum aus Kaninchen (1:4000; 1 h bei RT; Novoprolabs) mit dem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper Anti-igG gegen Kaninchen aus Ziege (1:10.000; 1 h bei RT; Sigma-Aldrich) kombiniert. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) und einem Röntgenfilm (LucentBlue X-Ray Film, Advansta). Die Expositionszeit variierte je nach Intensität der Chemilumineszenz zwischen 1 Sekunde und 1 Minute. Zur Entwicklung des Films wurde dieser in Entwicklerlösung inkubiert (GBX developer/replenisher) und direkt im Anschluss mit H₂O_{dest.} abgespült. Es folgte die Inkubation in Fixierlösung (GBX fixer/replenisher) sowie ein erneutes Abspülen mit H₂O_{dest.}. Als Basis der verwendeten Puffer diente 1xPBS mit jeweiligen Zusätzen (10xPBS pH 7,5: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄ sowie 20 mM KH₂PO₄). Der Blockingpuffer enthielt zusätzlich 3 % BSA, der Waschpuffer 0,1 % Tween20 und der Antikörperpuffer 0,1% Tween20 sowie 1 % BSA.

3.5 Molekulargenetische Methoden

3.5.1 PCR, Restriktion, Agarose-Gelelektrophorese, Sequenzierung

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie zur gerichteten Mutagenese von Plasmiden wurde die Phusion® DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die NreA-Substitutionen im *narG-lip*-Testplasmid wurden aufgrund der Größe (11 kb) mit der PfuUltraII Fusion HS DNA-Polymerase eingefügt. Alle Punktmutationen wurden nach dem *Site-Directed Mutagenesis* Protokoll (Thermo Fisher Scientific) gerichtet ausgetauscht. Die Durchführung der PCR erfolgte laut Herstellerangaben. Die für die PCR benötigten Primer wurden mittels CloneManager und OligoCalc designt und von der

Firma Eurofins MWG Operon hergestellt. Alle verwendeten NreA-Mutageneseprimer sind im Anhang in Tab. A 6 aufgelistet.

Die DNA-Amplifikate für Klonierungen wurden vor der Weiterverwendung mit Hilfe des *GenElute PCR Clean-Up Kit* (Sigma-Aldrich) aufgereinigt. Restriktionen der DNA-Moleküle wurden laut Herstellerangaben der entsprechenden Enzyme durchgeführt.

Zur Überprüfung der PCR sowie von Restriktionsverdauen wurden die DNA-Fragmente (versetzt mit 1x Loading Dye; Thermo Fisher Scientific) in einem 1 %igen Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt. Der Agarose wurde der fluoreszierende Farbstoff RedSafe™ (25 µl/L; iNtRON Biotechnology) beigegeben. Die Agarosegelelektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer durchgeführt (50x TAE-Puffer pH 8,0: 242 g/L Tris, 57,1 ml/L Essigsäure und 50 mM Na₂-EDTA).

Die eingefügten Mutationen oder Klonierungen wurden durch Sequenzierung von der Firma LGC Genomics (Berlin) auf Richtigkeit überprüft. Um DNA aus *S. carnosus* sequenzieren zu lassen, musste das zu sequenzierende Fragment zunächst durch PCR amplifiziert werden. Dies diente der Konzentrationserhöhung des Plasmids, da durch die Plasmidisolierung in *S. carnosus* auch genomische DNA mitisoliert wird. Anschließend folgte die Aufreinigung mit dem *GenElute PCR Clean-Up Kit* (Sigma-Aldrich). Alle verwendeten Sequenzierungsprimer sind im Anhang in Tab. A 7 aufgelistet.

3.5.2 Klonierung der pMW1040-Derivate (*narG-lip*-Testplasmid)

Aufgrund der Plasmidgröße von 11 kb kann es während der gerichteten Mutagenese zu zusätzlichen Mutationen kommen. Um dieses auszuschließen wurde das mutierte *nreA*-Gen aus pMW1040 amplifiziert, mit den vorhandenen Schnittstellen *SacI* und *XbaI* (bei W112 und V117: *XbaI* und *PmeI*) geschnitten und mit dem ebenfalls verdauten, wildtypischen Vektor pMW1040 ligiert. Nach dem Verdau des Vektors wurde dieser mit Hilfe des *GenElute Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich) gewonnen und aufgereinigt. Die Restriktion sowie Ligation der DNA-Moleküle erfolgten nach Herstellerangaben.

Tabelle 3: Verwendete Primer und Restriktionsenzyme zur Umklonierung der NreA-Varianten in pMW1040.

Amplifikationsprimer	Amplifikatlänge	Restriktionsenzyme	NreA-Varianten
F_seq_SD_nreA NreA_Y95A_rev	689 bp	<i>SacI/XbaI</i>	R21A – G75A
pMW1040_nreAB_XbaI_F pMW1040_nreB_PmeI-R	1171 bp	<i>XbaI/PmeI</i>	W112A, V117A

3.5.3 Plasmidisolierung aus *E. coli* und *S. carnosus*

Zur Isolation von Plasmiden wurde das *GeneElute HP Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) verwendet. Aufgrund der dicken Mureinschicht des grampositiven *S. carnosus*, mussten die Zellen zusätzlich mit

einer mechanischen Lyse aufgeschlossen werden. Nach Zugabe des Resuspensionspuffer wurde dem Ansatz Glasperlen (\varnothing 0,1 mm) zugesetzt und in der FastPrep-Zellmühle für 20 Sekunden bei 5,5 m/sek lysiert. Die Glasperlen wurden nach dem Neutralisationsschritt mittels Zentrifugation abgetrennt und das weitere Herstellerprotokoll konnte durchgeführt werden.

Für die Konzentrationsbestimmung der DNA-Moleküle wurden 3 μ l DNA mit 70 μ l H₂O_{dest.} verdünnt und mit dem BioPhotometer (Eppendorf) gemessen.

3.5.4 Transformation durch Hitzeschock und Elektroporation

Die mittels gerichteter Mutagenese erhaltenen PCR-Produkte wurden in hitzekompetente XL1-Blue oder XL10-Gold transformiert. Zur Herstellung der Zellen wurde TSB-Medium bestehend aus 10 % (w/v) PEG 6000, 10 mM MgSO₄ und 10 mM MgCl₂ verwendet (Sambrook & Russell, 2001). Die Herstellung von elektrokompetenter *E. coli* Zellen (JM109, BTH101, M15) verlief analog zur Herstellung hitzekompetenter Zellen, jedoch wurde eisgekühlter Glycerin-MOPS-Puffer (1 mM MOPS, 15 % (v/v) Glycerin) verwendet (Sambrook & Russell, 2001). Für die Lagerung wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Für die Durchführung des Hitzeschocks wurden 50 μ l Zellen zusammen mit 1-3 μ l *DpnI*-verdautem PCR-Produkt auf Eis inkubiert, für 45 Sekunden bei 42 °C erhitzt und anschließend wieder für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Intakte Plasmide (50-100 ng; BACTH: je 10 ng) wurden in elektrokompetente Zellen transformiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V mit dem Eporator von Eppendorf. Der Zellregeneration folgte das Ausplattieren auf die entsprechendem Agarplatten.

Elektrokompetente *S. carnosus* m1 Zellen wurden durch je dreimaliges Waschen mit eisgekühltem Wasser sowie Glycerin (10 %, v/v) und anschließendem Resuspendieren in Elektroporationspuffer (Lofblom *et al.*, 2007) hergestellt. Dieser bestand aus 0,5 mM D-Saccharose und 10 % Glycerin (v/v). Für die Transformation wurden 60 μ l Zellen mit mindestens 5 μ g Plasmid-DNA gemischt und bei Raumtemperatur für einige Minuten inkubiert. Zur Regeneration (mind. 2 h) nach der Elektroporation wurde BM-Medium verwendet.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei unabhängige Teile. Zunächst werden die bioinformatischen Resultate zur phylogenetischen Verteilung der O₂-Sensoren präsentiert. Anschließend folgen die Daten zur Interaktion zwischen dem O₂-Sensor NreB und dem Nitratsensor NreA aus *S. carnosus*.

FNR aus *E. coli* und *B. subtilis*, NreB aus *S. aureus* und WhiB3 aus *M. tuberculosis* besitzen ähnliche [4Fe-4S]-Cluster und eine ähnliche Reaktion des Clusters mit O₂, erfüllen aber unterschiedliche Funktionen in den entsprechenden Bakterien. Sie agieren als direkte Sauerstoffsensoren, um sich an die äußeren Umweltbedingungen anzupassen, regulieren aber unterschiedliche Zielgene und weisen eine unterschiedliche Aktivitätsregulation sowie unterschiedliche Wirkungsmechanismen auf (Crack *et al.*, 2017; Gruner *et al.*, 2011; Nilkens *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2009).

Zur Klärung der Frage, ob die Sensoren unabhängig voneinander entstanden sind oder ob sie einen gemeinsamen Vorfahren besitzen, wurden bioinformatische Analysen mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin vom Institut für Molekulare Evolution der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Eine Anwesenheitsmatrix stellt eine visuelle Darstellung der Verteilung von Referenzproteinen und deren homologen Proteinsequenzen dar. Den konstruierten phylogenetischen Stammbäumen liegt die Maximum Likelihood-Analyse zu Grunde. Alle Stammbäume sind ungewurzelt, sodass theoretisch jeder Ast innerhalb des Baumes gedreht werden kann. Die Astlänge stellt die evolutionäre Distanz zwischen den Proteinen dar, d.h. wie viele Aminosäureaustausche es pro Stelle im Protein gegeben hat. Eine kurze Astlänge verweist auf wenige Austausche, sodass die Proteine auf Aminosäureebene ähnlicher zueinander sind. Bei großer Astlänge verhält es sich umgekehrt. Die Astlänge lässt allerdings keine Aussage über eine Zeiteinheit zu, da nicht bekannt ist, wie schnell z.B. ein Austausch geschieht oder wie viele Austausche zur selben Zeit stattfanden. Der Verwandtschaftsgrad der Proteine oder gar der Bakterien lässt sich nicht anhand der konstruierten Bäume ablesen.

4.1 Phylogenetische Verteilung von FNR, NreB, WhiB3 und CRP

Die Anwesenheitsmatrix in Abb. 10 gibt an in welchem Bakterienphylum bzw. in welcher Bakterienklasse die homologen Proteinsequenzen identifiziert wurden. Auf der vertikalen Matrixachse sind die definierten Bakterienphyla aufgelistet. Die Phyla Firmicutes und Proteobacteria sind zusätzlich in ihre Klassen untergliedert. Ein schwarzer Strich innerhalb der Matrix steht für einen homologen Treffer in der BLAST-Suche mit dem jeweiligen Referenzprotein, welches an der horizontalen Matrixachse abzulesen ist.

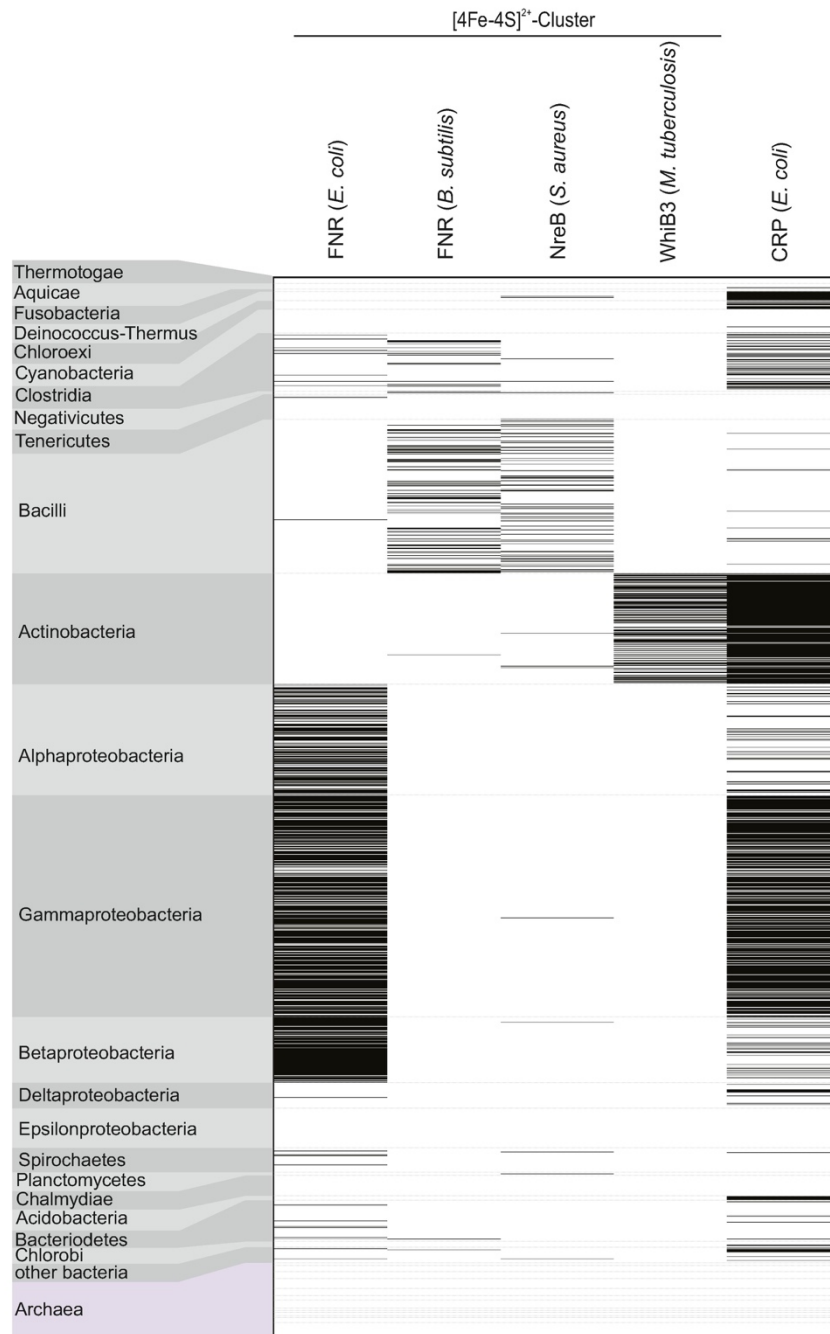


Abb. 10: Anwesenheitsmatrix der [Fe-S]-haltigen Sensoren FNR, NreB, WhiB3 und dem globalen Genaktivator CRP. Die Anwesenheitsmatrix zeigt die Verteilung der mittels *BLAST*-Suche identifizierten homologen Proteine zum jeweiligen Referenzprotein. Ein Strich steht für ein homologes Protein im entsprechenden Bakterium. Auf der vertikalen Matrixachse lassen sich die Bakterienphyla ablesen.

Die Matrix weist sehr viele zu FNR_{Ec} homologe Proteine innerhalb der α -, β - und γ -Proteobakterien auf, welche durch die vielen *Hits* (schwarze Linien) verdeutlicht werden. Zusätzlich gibt es einzelne Treffer innerhalb der Clostridia, der Spirochaetes und der Bacteroidetes. Im Gegensatz dazu finden sich vor allem innerhalb der Bacilli homologe Proteine von FNR_{Bs}. Vereinzelt, zusätzliche Treffer sind innerhalb der Clostridia, der Negativicutes, der Bacteroidetes und der Actinobacteria identifizierbar. Für NreB aus *S. aureus* können die meisten homologen Proteine in den Bacilli registriert werden, wobei auch

hier zusätzliche Treffer außerhalb der Bakterienklasse zu finden sind. Vereinzelt homologe Sequenzen zu NreB_{So} sind innerhalb der Firmicutes, der Actinobacteria, der Proteobacteria, der Spirochaetes, der Planctomycetes und innerhalb Deinococcus-Thermus vertreten. Zu *M. tuberculosis* WhiB3 homologe Proteine sind ausschließlich auf die Actinobakterien begrenzt. Der globale Regulator CRP aus *E. coli* zeigt in fast allen Bakterienphyla homologe Proteine, wobei die meisten innerhalb der Actinobakterien und der Proteobakterien zu finden sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CRP in allen Bakterienphyla vertreten ist, wohingegen die [Fe-S]-haltigen Sensoren FNR, NreB und WhiB3 in bestimmten Klassen bzw. Phyla dominant sind. Des Weiteren gibt es zusätzliche homologe Proteine außerhalb dieser Klassen.

4.2 FNR_{Ec} aus *E. coli*

Während der *BLAST*-Suche konnten für FNR aus *E. coli* 664 homologe Proteine identifiziert werden. Aufgrund der großen Anzahl wurden redundante Daten derselben Art mit einer globalen Identität von $\geq 80\%$ aus dem Alignment entfernt. Dadurch reduzierte sich die Anzahl der homologen Proteine auf 414. Von diesen verbleibenden Homologen waren 95 % innerhalb der Proteobakterien zu finden, wobei ca. 40 % in den γ -Proteobakterien vertreten sind (Abb. 11). Die restlichen 5 % der homologen *BLAST*-Treffer zählen zu den Bacteroidetes (6x), den Clostridien (6x), den Spirochaetes (3x) und anderen Bakterienklassen.

4.2.1 Cysteinvarianten von FNR_{Ec}

Um festzustellen ob die homologen Proteine, die für die Bindung des [Fe-S]-Clusters wichtigen Cysteinreste vorweisen, wurden alle Proteinsequenz mit der Referenzsequenz von FNR_{Ec} verglichen und auf das Vorhandensein dieser Reste untersucht. Es konnten Varianten identifiziert werden, die weniger als vier konservierte Cysteinreste aufwiesen. Diese Varianten wurden ihrer Cysteinanzahl entsprechend farblich im Stammbaum markiert (Abb. A 1). Da der FNR_{Ec}-Stammbaum aufgrund der vielen homologen Proteine sehr groß ist, wurden auch die Proteobakterien entsprechend ihrer Klasse farblich hinterlegt (α : hellgelb, β : blau, γ : grün). Alle Homologen der Proteobakterien stehen zusammen an einem sehr großen Hauptast den restlichen fünf Prozent der Proteine gegenüber. Die Homologen einer Klasse der Proteobakterien sind bis auf wenige Ausnahmen zusammen gruppiert, d. h. beispielsweise alle Homologen der β -Proteobakterien bilden einen Bereich des Stammbaumes, in dem keine Homologen anderer Bakterienklassen vorkommen.

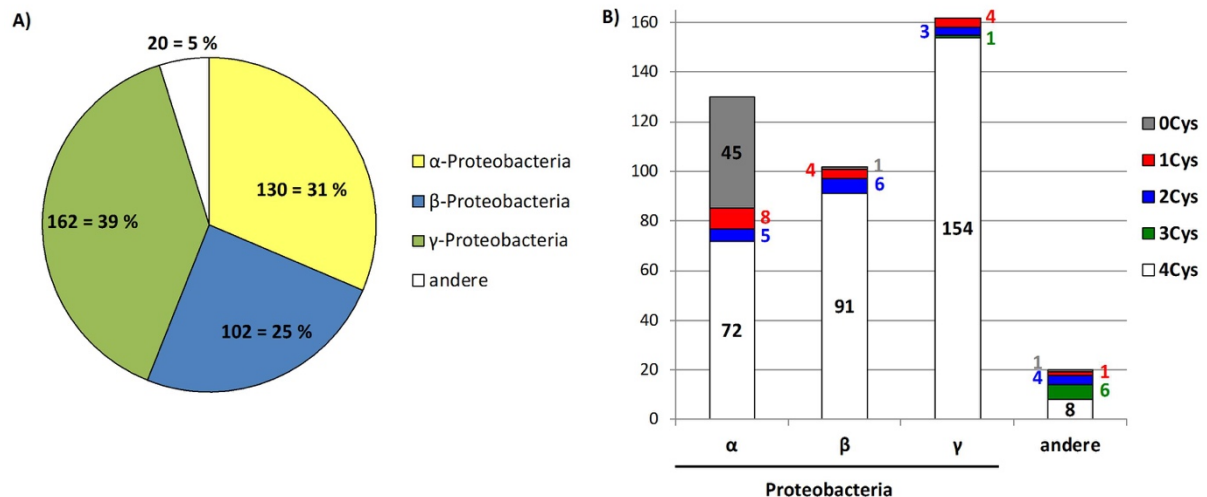


Abb. 11: Verteilung der homologen FNR_{Ec} Proteine und der Cysteinvarianten. Die dargestellten Daten basieren auf den Ergebnissen der BLAST-Suche. A) zeigt in welchen Bakterienklassen die homologen Proteine vorkommen. B) gibt die Anzahl der identifizierten Cysteinvarianten innerhalb der Bakterienklasse an. Die α-, β- und γ-Proteobacteria sind entsprechend der Farben im Stammbaum hellgelb, blau und grün hinterlegt. Die Cysteinvarianten sind entsprechend ihrer Anzahl farblich markiert: 0Cys (grau), 1Cys (rot), 2Cys (blau), 3Cys (grün) und 4Cys (weiß).

In Abb. 11 ist die Verteilung der homologen Proteine in ihrer Bakterienklasse, sowie die Anzahl der identifizierten Cysteinvarianten innerhalb dieser Klassen dargestellt. Es gehören knapp 40 % der homologen Proteine zu den γ-, 30 % zu den α- und 25 % zu den β-Proteobacteria. 79 % aller 414 BLAST-Treffer besitzen die wichtigen Cysteinreste C-x₂-C-x₅-C-x₉₂-C für die [Fe-S]-Cluster-Koordination. Sieben homologen Proteinen fehlt einer der Cysteinreste. Diese werden als 3Cys-Varianten (grün dargestellt) bezeichnet. Sie sind vor allem in den Bacteroidetes (5x) vertreten, aber auch innerhalb der Clostridia (1x) und innerhalb der γ-Proteobacteria (1x). In 18 homologen Proteinen fehlen zwei konservierte Cysteinreste. Die 2Cys-Varianten (blau dargestellt) sind sowohl innerhalb der α- (5x), β- (6x) und γ- (3x) Proteobakterien zu finden als auch in Bacteroidetes, Clostridia, Bacilli und Tenericutes (je 1x). FNR-ähnliche Proteine mit nur einem konservierten Cysteinrest existieren in Proteobakterien und *Opitutus terrae*. Etwa die Hälfte der siebzehn 1Cys-Varianten konnten in den α-Proteobakterien identifiziert werden, wohingegen je ein Viertel in β- und γ-Proteobakterien vertreten sind. Etwa elf Prozent aller BLAST-Treffer besitzen keine konservierten Cysteinreste, wobei sich 45 innerhalb der α-Proteobakterien befinden. Die übrigen zwei 0Cys-Varianten kommen innerhalb der β- und δ-Proteobakterien vor.

Generell lässt sich festhalten, dass die verschiedenen Cysteinvarianten verstreut über den gesamten Stammbaum zu finden sind und nur wenige Varianten zusammen gruppiert vorkommen. Zwei Ausnahmen sind zum einen die Varianten außerhalb der Proteobakterien, die alle zusammen an einem Ast stehen und zum anderen die 0Cys-Varianten innerhalb der α-Proteobakterien.

Da das Fehlen der konservierten Cysteinreste ebenfalls auf das Fehlen des wichtigen [Fe-S]-Clusters hindeutet, werden die Cysteinvarianten näher untersucht.

4.2.2 OCys-Varianten von FNR_{Ec}

Innerhalb der α -Proteobakterien sind viele homologe Proteine zu finden, die keine konservierten Cysteinreste besitzen. Laut Datenbankrecherche handelt es sich oftmals um Transkriptionsregulatoren der FixK-Familie, die Teil der CRP-FNR-Superfamilie sind und über den gesamten Sequenzbereich Ähnlichkeiten zu FNR_{Ec} aufweisen.

FNR_{Ec}	-MIPEK-----RIIRRIQSGGCA-IHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIER	48
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	-----MDF-MTTMAGSTLTKGLPEDELRLERIS-E	29
<i>Burkholderia xenovorans</i>	-----MKDDVSAPSRYRPSIFAVP-FQR--HGDGTAVELLSPSEQDALIAI-SR	45
<i>Parvularcula bermudensis</i>	-----MRA-LD	5
<i>Bradyrhizobium sp</i>	---MLNQSITHSVVNTNAPHAVPSPAANAPAANP--FA-----EI-----TGHAGLI-AS	44
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	MAQMLTQTLKTVINTQIGGKIAPP---HQVSDQ--FG-----AI-----TGHVGLV-AT	44
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	-----MYAAVKAKPQSIEVEHLGP--A-----PMSGP-HL	27
<i>Mesorhizobium loti</i>	-----MHAYTASRISLPSHSAQPSLP--VA-----F-----DSETQ-QP	31
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	-MQAVS-----NIHSLERPRAHGMIDF-----APLFMR-QT	29
<i>Methylobacterium nodulans</i>	-MHPLSQ----TATIRTGTSAPPVAVLGRPTL-----ASIFLG-RP	34

Abb. 12: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Ec} und OCys-Varianten. Die Proteine ohne konservierten Cysteinrest sind grau dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der Aminosäure (AS) in der Sequenz an.

Abb. 12 zeigt den Sequenzvergleich zwischen OCys-Homologen aus Proteobakterien und FNR_{Ec}. Bis auf *Desulfomicrobium* (δ -) und *Burkholderia* (β -) gehören alle zu den α -Proteobakterien. In der Cysteintragenden N-terminalen Domäne der Proteine finden sich keine Übereinstimmungen. Ähnlichkeiten treten ausschließlich im restlichen Protein auf. Neben den OCys-Varianten, die eindeutig kein Cysteinmotiv besitzen, gibt es auch Varianten, die im Bereich des N-Terminus Cysteinreste aufweisen.

FNR_{Ec}	-----MIPEKRIIRR-IQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIERKKPIQ	53
<i>Pseudovibrio sp</i>	MV----SATL-----TKLSDLDGQAPFNGCQENFRQSEVMEKHLGRKQRLS	42
<i>Sinorhizobium fredii</i>	MSVQVLRKKEGQA-----AAMGLATLAVPDLPCLF-----SRPVERVA	39
<i>Caulobacter segnis</i>	-----MLSPIRAQSFEPTVHLDANLDAVLATPC-----ACPRFA	34
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	MLNQLSRA--HTAAKAPV---D--PSCSPAVQFFATTGHAG-----LIASEFSYK	43
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	MHTQTISAPAARILDIPH---A--TAAEPVDPFSAIARCSG-----VIATEFSYK	45
<i>Methylobacterium nodulans</i>	---MAIAASHSQLPAPG---G--PVAGRRHDLPLMLTSSE-----LVSTLSTYG	42
<i>Methylobacterium extorquens</i>	-----MAPEITLLPASHVAAS--VALGCNDSTVLFAGCPE-----LIGTPFSYG	42

Abb. 13: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Ec} und OCys-Varianten mit zusätzlichen Cysteinresten. Die Proteine ohne konservierten Cysteinrest sind grau dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt, zusätzliche Cysteinreste türkis. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Abb. 13 zeigt den Sequenzvergleich der als OCys-Varianten bezeichneten Homologen, die am N-Terminus nicht konservierte Cysteinreste aufweisen. In diesen Fällen ist die Identifizierung der Varianten schwierig, da zwar Cysteinreste vorhanden sind, diese aber in den Alignments nicht zusammen gruppieren. Die fehlende Konservierung der Cysteinposition innerhalb der Sequenzen gilt als Hauptargument für die Benennung dieser Homologen als OCys-Varianten.

Alle OCys-Homologe zeigen, abgesehen von dem Cysteintragenden N-terminalen Bereich, im globalen Sequenzvergleich eine große Ähnlichkeit mit FNR_{Ec}. Somit kann angenommen werden, dass es sich wirklich um FNR_{Ec}-Homologe handelt, die eventuell eine andere Funktion außerhalb des direkten O₂-Sensings angenommen haben.

4.2.3 1Cys-Varianten von FNR_{Ec}

Homologe Proteine mit einem konservierten Cysteinrest sind innerhalb der Proteobakterien und *Opitutus terrae* zu finden. Der vierte Cysteinrest (C4) des Cluster-Bindemotivs ist am häufigsten konserviert, wobei auch C1 (*Methylobacterium*) oder C3 (*Variovorax paradoxus*) konserviert sein können (Abb. A 5). Die meisten Bakterien, die 1Cys-Homologe besitzen, weisen ebenfalls Homologe mit vollständigem Cluster-Bindemotiv auf. Ausnahmen sind *O. terrae* sowie die Proteobakterien *Va. paradoxus*, *Laribacter hongkongensis* und *Paracoccus denitrificans*.

<i>Xanthomonas oryzae</i>	-----	0
<i>Paracoccus denitrificans</i>	-----MKFYRRYEAGQVVV	14
<i>Taylorella asinigenitalis</i>	-----MPNGKLPNNLKITEDIIVKERIRIPKKEALY	31
<i>Xanthomonas albilineans</i>	-----	0
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	-----MPLGLSEEEDLIDD-MVAARRTVKRGSLLF	30
<i>Laribacter hongkongensis</i>	-----MSQLDA-VIRQSRRLKRGYLF	21
<i>Alteromonas sp</i>	-----MPVALNKTEIESLDD-IIERKKPLHKSDLLV	30
FNR_{Ec}	MIEPKRIIRRIQSGGCAIH QDC SISQL C IPFTLNEHELDQLDN-IIERKKPIQKGQTLF	59
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-----	0
<hr/>		
<i>Xanthomonas oryzae</i>	RVC R TPMA---QMRERYPQLKRKLLQRAGMELAAQDTCPLARLQPSERRRISCCGLQP	93
<i>Paracoccus denitrificans</i>	VLCCFRRKPFKLLIDNPRIASRLLEMTLDELDAARDWLLLLGRKSAREKIASLLVILAR	132
<i>Taylorella asinigenitalis</i>	EVCLLAVKDIEHMLEEFTEIREVMVGLVGTEISRSHNMILTLGSLNADQKLAFLQDTAQ	151
<i>Xanthomonas albilineans</i>	SICELPYTQLQKVMTEVPSLQHQLRIRAIISRELVAEQHHLVMMGRPQAQERLAIIFLRSLS	93
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	EVCVMPFDRIEELSRVNSLQRHVHKIMSREIVREHGVMMLLGSMAEERLATFLNLVQ	150
<i>Laribacter hongkongensis</i>	EVCELPFVRMESLGREIPSLQHHFFRLMSREIVRDQSVMLLLGNMKAERLAAFLNLSQ	141
<i>Alteromonas sp</i>	MVCELPEYETLDEMSVQFPKLRHQIMSFMSAEIKQDHDLMMLLNKRSAEERLFLYFLSLSQ	150
FNR_{Ec}	MVCEIPFETLDDLSGKMPNLRQMMRLMSGEIKGDQDMILLSSKNAEERLAAFIYNLSR	179
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MVCEIPFETLDDLSGKMPNLRQMMRLMSGEIKGDQDMILLSSKNAEERLAAFIYNLSR	81
	:* : : . *: : : :	

Abb. 14: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Ec} und verkürzten 1Cys-Varianten. Die Homologen mit einem konservierten Cysteinrest sind rot dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Die in Abb. 14 gezeigten Varianten besitzen alle den vierten FNR_{Ec}-Rest (Cys122), jedoch fehlen die drei N-terminalen Cysteinreste. Der Grund für die fehlenden drei Cysteinreste dieser Proteine ist eine Verkürzung der Sequenz. Dies gilt sowohl für die Varianten aus den γ -Proteobakterien als auch für die 1Cys-Homologen aus den α - (*Paracoccus*) und β -Proteobakterien (*Taylorella*, *Rhodoferax* und *Laribacter*). Insgesamt sind die Sequenzen der Homologen zwischen 25 (*Alteromonas sp*) und 150 (*Xanthomonas oryzae*) Aminosäuren (AS) kürzer als die FNR_{Ec}-Referenz.

Mit Ausnahme der N-terminalen Cysteindomäne weisen die 1Cys-Varianten große Ähnlichkeit über die komplette Sequenz mit FNR_{Ec} auf.

4.2.4 2Cys-Varianten von FNR_{Ec}

Der Großteil der 18 homologen 2Cys-Varianten besitzen die zwei konservierten Cysteinreste an dritter und vierter Stelle (FNR_{Ec} Cys29 + Cys122), die einem Abstand von 92 AS entsprechen. Jedoch kann auch, entsprechend der FNR_{Ec} Reste C2 und C4, ein *Spacing* von 98 AS beobachtet werden. In einigen Methylobakterien sind FNR_{Ec}-Homologe zu finden, in denen die Reste C2 und C3 des Cluster-Bindemotivs mit einem Abstand von 5 AS konserviert sind.

<i>Azospirillum</i>	-----MRSLTVCAALEPEELRRLADIL-QNVRMDAGHTLFA	35
FNR_{Ec}	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIE--RKKPIQKGQT	60
<i>Burkholderia</i>	-----MRHLCMPQGVAAANEMPQLEALIC SARAVRRGESLYR	36
<i>Pusillimonas</i>	-----MLNEICLPLGMQRGDINKLDELIKERIRVPGSALFQ	37
	: : : : : * : : : * : :	
FNR_{Ec}	-MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIE--RKKPIQKGQT	57
<i>Glaciecola</i>	MSLDINKVVIKTSLA----SCFGSH-----FKEVEGANAFIDELAQAEEISFEQGEY	49
	: : : : : . . * . . * . * : : : : : . : : : : *	
FNR_{Ec}	TSMVCEIPFETLDDLSGKMPNLRQMMRLMSGEIKGDQDMILLLSKKNAAERLAAFIYNL	177
<i>Glaciecola</i>	NCVVIRISRKLMQDIFDKYPSVAKRYHDVTGHILSLILDQLFIMGQKSAHQRLAHFLDLM	167
	..* . * : : : * . * * . : : : . : . * : : : : * . * . * : : : *	

Abb. 15: Ausschnitt der Sequenzvergleiche von FNR_{Ec} und 2Cys-Varianten mit dem Spacing C-x₉₂-C. Die Homologen mit zwei konservierten Cysteinen sind blau dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Die 2 Cys-Varianten der β - (*Burkholderia* spp, *Pusillimonas* sp) und α - (*Azospirillum lipoferum*) Proteobakterien weisen eine N-terminale Verkürzung der Sequenz um 25 bis 30 AS auf, welche zum Fehlen der beiden ersten Cysteinreste führt (Abb. 15). Der Abstand der beiden konservierten Cysteinresten beträgt 92 AS und entspricht dem Cluster-Bindemotiv von FNR_{Ec}. Des Weiteren weisen die Sequenzen eine hohe Identität von 40 % auf. In den 2Cys-Varianten der γ -Proteobakterien wie *Glaciecola* sp liegen ebenfalls 92 AS zwischen den beiden konservierten Cysteinresten. Auch wenn im Sequenzvergleich die Cysteinreste nicht zusammen gruppieren, handelt es sich um die Reste C3 und C4 des Cluster-Bindemotivs. Bis auf *Pusillimonas* sp enthalten alle Proteobakterien neben der 2Cys-Variante auch ein FNR_{Ec}-ähnliches Protein mit vollständigem Cluster-Bindemotiv.

<i>Acholeplasma</i>	-----MSHTHKDHDHTCLVTVPIFNHLEDELTKITE-L	33
<i>Streptococcus</i>	----MPKKDSIQDKRKNCGNTSSHTHRRDSDSQTSCISVVPIFNHLEEEQMDEIMK-V	55
<i>Clostridium</i>	-----MYHRGNRYR-----SDHTHESHEACISLVPIFNHLESQDMDEIMK-A	40
FNR_{Ec}	---MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQD-----CSISQLCIPFT-LNEHELDQLDNIIE	46
<i>Odoribacter</i>	MKNELNKHSNIVLPDLGSCYKK-----LKQTFTNLSDEELKGLL-RP	41
	* . * . . : : : :	

Abb. 16: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Ec} und 2Cys-Varianten mit dem Spacing C-x₉₇₋₉₈-C. Die Homologen mit zwei konservierten Cysteinen sind blau dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Abb. 16 zeigt den Sequenzvergleich zwischen FNR_{Ec} und den 2Cys-Varianten, die in Bakterien außerhalb der Proteobakterien identifiziert wurden. Der Abstand der konservierten Cysteinreste von *Odoribacter splanchnicus* (Bacteroidetes) beträgt 98 AS, während die FNR_{Ec}-Varianten der Firmicutes (Tenericutes,

Bacilli und Clostridia) ein Cystein-*Spacing* von 97 AS aufweisen. Die Sequenzen weisen eine Identität von ca. 28 % auf.

```

FNR_Ec          -----MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIERK 49
Mb. chloromethanicum  MGTKPTPRSIPVAPGSRTPRR-----SIHECGLFADCP-----DLVGTP 39
Mb. extorquens      MGTKPTPRSIPVAPGSRTPRR-----SIHECGLFADCP-----DLVGTP 39
                   : * . * **           : * . : *           : : :
-----
FNR_Ec          PSFAQALETSMVCEIPFETLDDLSGKMPNLROQMMRLMSGEIKGDQDMILLSSKKNAEER 169
Mb. chloromethanicum  TAE--ALSDTRVLIFQRRQIERAATRSAEVACQLWGMATTSLRDAQDLMLLLGRRSAQER 157
Mb. extorquens      TAE--ALSDTRVLIFQRRQIERAATRSAEVACQLWGMATTSLRDAQNLMLLLGRRSAQER 157
                   : ** . : * : . : : : : : * : : : . : . * : : * : : * : : *

```

Abb. 17: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Ec} und 2Cys-Varianten aus Methylobakterien mit dem Spacing C-x5-C. Die Homologen mit zwei konservierten Cysteinen sind blau dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt, zusätzliche Cysteine türkis. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

In einigen Methylobakterien sind die Reste C2 und C3 des Cluster-Bindemotivs konserviert, was Abb. 17 verdeutlicht. Zwischen den beiden Cysteinresten befinden sich fünf variable AS, allerdings gibt es zusätzlich einen dritten Cysteinrest, der 98 AS entfernt ist. Dieser Rest korrespondiert nicht mit dem FNR_{Ec} Cluster-Bindemotiv, dennoch ist es möglich, dass dieser als potentieller Clusterligand fungiert. In *Mb. extorquens* und *Mb. chloromethanicum* wurden neben den 2Cys-Varianten auch FNR_{Ec}-Homologe mit vollständigem Cluster-Bindemotiv identifiziert, während in anderen Arten der Methylobakterien auch 1Cys- oder auch 0Cys-Varianten detektiert werden konnten.

Grundsätzlich besitzen die 2Cys-Varianten große Ähnlichkeiten mit der Referenz FNR_{Ec}. Die beiden konservierten Cysteinreste in den Homologen sind entweder 92 oder 97/98 AS voneinander entfernt, welche dem dritten bzw. zweiten und vierten Cysteinrest innerhalb des [Fe-S]-Cluster-Bindemotivs entsprechen. Einige wenige Varianten besitzen den zweiten und dritten Rest des [Fe-S]-Cluster-koordinierenden Motivs mit einem Abstand von 5 AS. Trotz der ungenauen Gruppierung der Cysteinreste kann davon ausgegangen werden, dass es sich um die zu FNR_{Ec}-homologen konservierten Cysteinreste handelt.

4.2.5 3Cys-Varianten von FNR_{Ec}

FNR_{Ec}-homologe Proteine mit drei konservierten Cysteinresten (7x) sind bis auf *Alkaliphilus oremlandii* (Clostridia) und *Acidithiobacillus caldus* (γ -Proteobacteria) hauptsächlich innerhalb der Bacteroidetes zu finden. Diesen Homologen fehlt der dritte Cysteinrest des Motivs und sie weisen das Cysteinmotiv C-x₂-C-x₉₇₋₉₈-C auf.

Wie in Abb. 18 verdeutlicht, sind die beiden N-terminalen Cysteinreste konserviert, wohingegen der dritte Rest fehlt. Alle Homologen besitzen zusätzlich den vierten Cysteinrest. Das *Spacing* der Reste beträgt C-x₂-C-x₉₇₋₉₈-C, welche sich mit der Konsensus-Sequenz von FNR_{Ec} ohne C3 deckt. Der dritte Cysteinrest ist in den Varianten durch andere AS wie Serin, Asparagin oder Prolin ausgetauscht. Außer bei *Muricauda ruestringensis* und *Maribacter sp* (Bacteroidetes) befinden sich im Bereich des

konservierten Cysteinpaars zusätzliche Cysteinreste, die potentiell zur [Fe-S]-Cluster-Bindung genutzt werden könnten. Dies entspricht hingegen nicht dem für FNR_{Ec} typischen Cluster-Bindemotiv.

FNR_Ec	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIERKKPIQKGQTLFK	60
<i>Acidithiobacillus</i>	-----MVAEEGAKKSNCLRCAMRARSIFAGLSGEELCALGMDV-IDLEFAGGTTIYR	51
<i>Alkaliphilus</i>	-----MKGCHHQKRCNGC-IESVPIFASMNHDEMLEIAHIA-SSRTFEKGETIYG	48
<i>Muricauda</i>	-----MESRCENCIIRQFNLSRAMSKEELKQVSDTK-TTKI IKKGESLFE	44
<i>Maribacter</i>	-----MEQGEQSRCENCIIRQFNLSRAMSKTELKKVSDSK-ITKKVKKGEALFE	48
<i>Fluviicola</i>	-----MVEKSHKHVSC EACAVRTNSLFGQFTADEVHDLNHHK-SCQFYKKNQTFV	50
<i>Marivirga</i>	-----MSKKVKNI PCDLCLSRKSMFNGLPNDALCALSEHK-STLAHNKGQVFL	49
<i>Chitinophaga</i>	-----MCTPYHNASCAN CQDRFGSILFKAEKCNLEEIESAK-VCTTYKKGQIVFQ	49
	* * : : . ::	

Abb. 18: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Ec} und 3Cys-Varianten mit dem Spacing C-x₂-C-x₉₇₋₉₈-C. Die Homologen mit drei konservierten Cysteinresten sind grün dargestellt. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt, zusätzliche Cysteine türkis. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Alle 3Cys-Varianten zeigen über die gesamte Sequenz große Ähnlichkeit mit der FNR_{Ec}-Referenz, allerdings fehlt allen der dritte Cysteinrest des konservierten [Fe-S]-Cluster-Bindemotivs von FNR_{Ec}.

4.2.6 FNR_{Ec}-Homologe mit vollständigem Cluster-Bindemotiv

79 % aller identifizierten FNR_{Ec}-Homologen besitzen die für die Bindung des [Fe-S]-Clusters wichtigen Cysteinreste, wovon lediglich zwei Prozent der Bakterien außerhalb der Proteobakterien detektiert werden konnten. Viele FNR_{Ec}-Homologe sind bereits in verschiedenen Arten der Proteobakterien funktionell untersucht (Fischer, 1994; Korner *et al.*, 2003) und konnten in der BLAST-Suche ebenfalls identifiziert werden.

<i>Bordetella_Btr</i>	-----MQRRVPLSPDAAHCSSCMLGHVCPVVGMPA	30	
<i>Neisseria_Fnr</i>	-----MASHNTHQMKTLCSLRELCLPVGLLP	30	
<hr/>			
<i>Azotobacter_CydR</i>	----MSDK----SKVRPVHHRQECSLAALCLPISLNF	31	β-/γ-Proteobacteria:
<i>Pseudomonas_AnR</i>	----MAET----IKVRALPQAHCKDCSLAPLCLPLSLTV	31	
<i>Pseudomonas_FnrA</i>	----MSES----IKVRAQRQAHCKDCSLSGLCLPLSLNM	31	C-x ₂ -C-x ₅ -C-x ₉₂ -C
<i>Actinobacillus_HlyX</i>	----MKIVSDAKHTGRTACTIHCNCSISQLCLPFTLSE	35	
<i>Shewanella_EtrA</i>	MRTDMTIEQKNRRSAASGCAIHCDCSMGTLCPFTLNA	40	
FNR_Ec	----MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNE	36	
<i>Shigella_Fnr</i>	----MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNE	36	
<i>Klebsiella_Fnr</i>	----MIPEKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNE	36	
<hr/>			
<i>Oligotropha_AadR</i>	----MSQS--LLSRLSDDFLGRCLNCQARPLNVCAAFDP	33	α-Proteobacteria:
<i>Bradyrhizobium_FixK1</i>	----MKPSV--VMIE---PNGHFCSDCAIRTSAVCSSLDA	31	
<i>Rhodopseudomonas_AadR</i>	----MPHL--AFPNSSEEFRCVTHCSVRPLAICGELEP	33	C-x ₂₋₃ -C-x ₇ -C-x ₈₇ -C
<i>Rhizobium_FnrN</i>	----MDVA--RSEFFETGTPVACTSCQARHGVCGALSK	33	
<i>Rhodobacter_FnrL</i>	-----MSHDDAHPVSLQCGDCPIRHRAVCARCES	29	
	* :		

Abb. 19: Ausschnitt der Sequenzvergleiche zwischen FNR_{Ec} und FNR_{Ec}-Homologen mit vollständigem Cluster-Bindemotiv aus Proteobakterien. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an. Die Sequenzen der als Homologe identifizierten Proteine entsprechen den bereits funktionell untersuchten FNR_{Ec}-ähnlichen Regulatoren und wurden als solche bezeichnet. Das Cystein-Spacing der Proteine ist abgebildet.

Der Sequenzvergleich der identifizierten und bereits beschriebenen FNR_{Ec}-Homologe in Abb. 19 zeigt das Vorhandensein der N-terminalen Cystein-domäne in allen Proteinen. In der Referenz FNR_{Ec} und den homologen Proteinen aus anderen γ- (Fnr, FnrA, Anr, CydR, HlyX und EtrA) sowie aus β-Proteobakterien (Fnr und Btr) wird das [Fe-S]-Cluster von Cysteinresten mit dem Spacing C-x₂-C-x₅-C-

x_{92} -C koordiniert. Die FNR_{Ec} -ähnlichen Regulatoren der α -Proteobakterien (FnrN, FnrL, FixK1 und Aadr) hingegen unterscheiden sich in ihrem Cysteincluster C- x_{2-3} -C- x_7 -C- x_{87} -C von den anderen Proteobakterien. FNR_{Ec} -Homologe der Gattungen *Xanthomonas* und *Pseudoxanthomonas* (γ -Proteobakterien) tragen jedoch ebenfalls das *Spacing* des Cluster-Bindemotivs der α -Proteobakterien und nicht wie erwartet von *E. coli*.

FNR_{Ec}	MIPEKRIIRRIQSGGCA-IHCQDC----SISQLCIPFTLN	35	C- x_2 -C- x_5 -C- x_{92} -C
<i>Nitrospira defluvii</i>	-----MKRKPCLIENC DTC-----GLREKVVLCDIS	26	C- x_2 -C- x_8 -C- x_{88} -C
<i>Leptospira interrogans</i>	-----MEIK-NEIPDCYLC PNR-----HKFKCIS	23	C- x_2 -C- x_7 -C- x_{88} -C
<i>Spirochaeta sp</i>	-----MEASIQCSQSCVNDHCIRSVPLFASLQ	26	C- x_2 -C- x_4 -C- x_{97} -C
<i>C. perfringens</i>	-----MEKTCTCGSCKEPCAKNISIFSTLS	25	
<i>C. sticklandii</i>	-----MIGHCSIGNTPCEVCKGKACIKKTPLLSSLN	31	C- x_2 -C- x_{3-4} -C- x_{97-98} -C
<i>C. beijerinckii</i>	-----MNNNCGNCCNCRGNLCASKVPMFENLN	28	
<i>D. hafniense</i>	-----MKSCTACHSCGCHSEGQFCAAKAPIFAMLA	30	C-X-C- x_6 -C- x_{97} -C

Abb. 20: Ausschnitt der Sequenzvergleiche zwischen FNR_{Ec} und FNR_{Ec} -Homologen mit vollständigem Cluster-Bindemotiv außerhalb der Proteobakterien. Konservierte Cysteine des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Abb. 20 zeigt den Sequenzvergleich zwischen der Referenz FNR_{Ec} und Homologen außerhalb der Proteobakterien. Alle homologen Proteine besitzen in der N-terminalen Domäne drei Cysteinreste, die allerdings teilweise ein von FNR_{Ec} abweichendes *Spacing* aufweisen. Das Cluster-Bindemotiv C- x_2 -C- x_{8-8} -C der Proteine aus *Nitrospira* und *Leptospira* (*Spirochaetes*) ähnelt dem der α -Proteobakterien. In den anderen Homologen innerhalb der Clostridien und *Spirochaeta sp* korrespondiert das *Spacing* der drei N-terminalen Cysteinreste C- x_{1-2} -C- x_{3-6} -C in etwa mit dem von FNR_{Ec} , jedoch beträgt der Abstand des vierten Cysteinrestes 97-98 AS statt 92.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es sehr viele homologe Proteine zu FNR_{Ec} gibt, die vor allem in den γ -, α - und β -Proteobakterien zu finden sind. Einige wenige Homologe sind innerhalb anderer Bakterienphyla vertreten. Es konnten zudem verschiedene Varianten mit unterschiedlicher Anzahl an konservierten Cysteinresten innerhalb der Homologen identifiziert werden. Tabelle 4 gibt eine Übersicht der verschiedenen Varianten mit dem entsprechenden *Spacing* der konservierten Cysteinreste sowie deren Vorkommen.

Der Großteil der Homologen besitzt das vollständige Cluster-Bindemotiv bestehend aus vier konservierten Cysteinresten. Diese sind entsprechend ihres *Spacings* in drei verschiedenen Gruppen vertreten: γ - und β -Proteobakterien, α -Proteobakterien sowie andere Nicht-Proteobakterien. Den 3Cys-Varianten fehlt jeweils der dritte Cysteinrest und sie kommen hauptsächlich innerhalb der Bacteroidetes vor. Die in Proteobakterien und vereinzelt in anderen Bakterienphyla vorkommenden 2Cys-Varianten verfügen entweder über den dritten und vierten (C- x_{92} -C), den zweiten und vierten (C- x_{98} -C) oder den zweiten und dritten (C- x_5 -C) Cysteinrest des Cluster-Bindemotivs. Ebenfalls in Proteobakterien identifiziert sind die 1Cys-Varianten, die entweder den ersten oder vierten Cysteinrest

des Cluster-Bindemotivs besitzen. Homologe Proteine ohne konservierte Cysteinreste sind hauptsächlich innerhalb der α -Proteobakterien auffindbar.

Tabelle 4: Übersicht der identifizierten Varianten der FNR_{Ec}-Homologen mit dem entsprechenden Cluster-Bindemotiv und deren Vorkommen.

	Spacing	Vorkommen
4Cys	C-X ₂ -C-X ₅ -C-X ₉₂ -C	<i>E. coli</i> , γ - und β -Proteobakterien
	C-X ₂₋₃ -C-X ₇ -C-X ₈₇ -C	α -Proteobakterien, <i>Xanthomonas</i> -Arten
	C-X ₁₋₂ -C-X ₃₋₈ -C-X ₈₈₋₉₈ -C	Clostridia, Spirochaetes und <i>Nitrospira</i>
3Cys	C-X ₂ -C-X ₉₇₋₉₈ -C	Bacteroidetes; (Clostridia und γ -Proteobakterien)
2Cys	C-X ₉₂ -C	γ -, β - und α -Proteobakterien
	C-X ₉₇₋₉₈ -C	Clostridia, Bacteroidetes, Tenericutes und Bacilli
	C-X ₅ -C	α -Proteobakterien (<i>Methylobacterium</i>)
1Cys	C4	γ -, β -Proteobakterien
	C1	α -Proteobakterien (<i>Methylobacterium</i>)
0Cys	-	α -Proteobakterien; (β - und δ -Proteobakterien)

4.3 FNR_{Bs} aus *B. subtilis*

Für FNR aus *B. subtilis* konnten in der BLAST-Suche 96 homologe Proteine identifiziert werden. 79 der insgesamt 97 homologen Proteinsequenzen (82 %) sind innerhalb der Bacilli zu finden. Von diesen gehören 61 zur Gattung *Bacillus*. Die restlichen homologen Proteine befinden sich innerhalb der Clostridia (13x), Negativicutes (2x), Bacteroidetes, Actinobacteria und in der Gattung *Thermodesulfovibrio*.

4.3.1 Cysteinvarianten von FNR_{Bs}

Anders als FNR_{Ec} koordiniert FNR_{Bs} sein für das O₂-Sensing wichtige [Fe-S]-Cluster über einen Aspartatrest und drei Cysteinreste mit dem Cluster-Bindemotiv D-X₈₅-C-X₂-C-X₄-C (Gruner *et al.*, 2011). Zur Verifizierung einer Funktion als Sauerstoffsensoren, wurden die Proteinsequenzen der Homologen mit der Referenzsequenz von FNR_{Bs} verglichen und auf das Vorhandensein des konservierten Aspartat-Cysteinmotivs untersucht. Varianten dieses Motivs wurden im Stammbaum markiert (Abb. A 2). Der Großteil der identifizierten Proteine steht zusammen in einem Hauptast, während einige wenige Proteine von diesem distanziert an einem weiteren Ast zu finden sind.

80 der 97 (= 82 %) homologen Proteine besitzen das konservierte Bindemotiv, wobei der Abstand zwischen dem Aspartatrest und den drei C-terminalen Cysteinresten auch 84 oder 86 AS betragen kann. Bis auf *Clostridium botulinum* (Clostridia) und *Selenomonas ruminantium* (Negativicutes) gehören alle Bakterien mit diesen Varianten zu den Bacilli. Den übrigen 17 Proteinen fehlen die drei C-terminalen Cysteinreste. Da ein Fehlen der Cluster-koordinierenden Cysteine ein fehlendes [Fe-S]-

Cluster bedeuten kann, werden diese Varianten genauer betrachtet und mit der Referenzsequenz von FNR_{Bs} verglichen.

4.3.2 OCys-Varianten von FNR_{Bs}

Der Großteil dieser OCys-Varianten gehört zu den Clostridien (12 Proteine). Jeweils eine Variante ist in den folgenden Bakterienphyla (bzw. Gattung) zu finden: Actinobacteria, Bacteroidetes, Negativicutes, Bacilli und *Thermodesulfovibrio*. Bis auf die Proteine von *Veillonella* (Negativicutes) und *B. amyloliquefaciens* befinden sich diese in einem Ast (Abb. A 2, grau markiert).

FNR_{Bs}	AKVLEDGEVLVINKNKLEKELIQNGALTFEFMKWMSTHLRKIQSKIRDLLLHGKKGALYS	153
<i>B. amyloliquefaciens</i>	AKVLEGGEVLVINKNKLEKELIQNGDLTFEFMKWMSTHLRKIQSKIRDLLLHGKKGALYS	153
<i>Veillonella</i>	AIAREDCSVYCIRYDVLEGAIAKDHSLAIAMMKIYTLHMRRQAKYRDL LLYGKKGAFYS	142
<i>Desulfitobacterium</i>	ALTAEASDVFLDRKALVQYFKENPSALLPFYQNMALDLRRAYRQIKNIALGDARSRLGA	156
<i>Rubrobacter</i>	AEAVTECRVTKVPKVFVERGIRRDQVAFKLATLLELRLVQYEELVRCLLPRETEVRLAN	158
<i>Niastella</i>	ATCLEDEVKVCYIPYSFLQATLQTNPVFTYRLLQEYAVELQTAEKMRDLALMEVKSRIAQ	155
<i>Desulfosporosinus</i>	AEVLQDSTLLVLNNEMLPQLLQSNPALSVALIRSLSRQLRLAQEFQILTNRSKAGILAA	154
<i>Clostridium</i>	AYAITDAKLCILKKENLEKILIKNPEISLKI IQEMADRINSAENLAQTLATRDVEARLAT	163
<i>Thermodesulfovibrio</i>	AIAIDDCDIGNIPSKTFLQIVNKYPQLQSEILHHVTMRKSGIESLKNIALVDVLSRIVY	149
<i>Halothermothrix</i>	AEVIKDSRLIVLPVKDLENIIMKNPKVAIKIIEALAKKTRLLTGQIRDLVFYDAEGRLAS	156
<i>Halanaerobium</i>	ALMTAAAEVIVFAQSELENLILKHPSIGLKLREMSGRLRRAQQNVRLALKNSSARVAG	151
<i>Natranaerobius</i>	AEVMEDTVVGVITKERLENLHEHPTIAIKIMKLMGKRLRKAQSKVADLALRDYQRTIN	169
<i>Desulfotomaculum</i>	AEVQEDAVVGVLRNQDIERLISHNPSMAVGMLRIMSRRLRTAQEKVMNLALHDTARRLAF	155
<i>Alkaliphilus</i>	AEVLEDACIGTIRNEDLEELIRKNAEIALHIIKEFSKKLYNSQQVKELALGDTYARTAQ	157
<i>Thermoanaerobacter</i>	AEAIEDSEILELRNKDIEDLILKDTQIALSIIKILAKRLKYIAVVIENLALRDSVGRAS	154
<i>Thermoanaerobacterium</i>	AEAIEDSIVIVLKNKDIEDLILKNEIALGIIKLMAKRLQNVAVIENLALKDSLGRVTS	154
	* : . . . :	
FNR_{Bs}	KIILHKRDYLR-CEIECENCPL EICNID	238
<i>B. amyloliquefaciens</i>	-----	207
<i>Veillonella</i>	LVICDFDALIGLLDLEVDSIDPNISNIE	228
<i>Desulfitobacterium</i>	ITISDLEQLRSWIHERQNSL-----	234
<i>Rubrobacter</i>	ITLKDARALVEIGQV-----	232
<i>Niastella</i>	IKINNTIALQKLVNEPNT-----	230
<i>Desulfosporosinus</i>	LEI IKPHELADWP-----	224
<i>Clostridium</i>	GLIIKDKKLYLV-----	233
<i>Thermodesulfovibrio</i>	II IKDIEMLLNLKLD-----	222
<i>Halothermothrix</i>	IVIMKPEQLHDKMQNMI-----	231
<i>Halanaerobium</i>	II IKDLAKIKTYT-----	222
<i>Natranaerobius</i>	I AVTDPVKLKD K VIE-----	243
<i>Desulfotomaculum</i>	IYLLDKGKLENLLR-----	227
<i>Alkaliphilus</i>	II IKDLNKLSEWAK-----	229
<i>Thermoanaerobacter</i>	II IKDLEELRKML-----	225
<i>Thermoanaerobacterium</i>	II IKDVNALKNLS-----	225

Abb. 21: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Bs} und verkürzten OCys-Varianten. Die Proteine ohne konservierte Cysteinreste sind grau dargestellt. Konservierte Cystein- und Aspartatreste des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Im Sequenzvergleich in Abb. 21 ist erkennbar, dass es sehr wenige identische Bereiche zwischen den OCys-Varianten und FNR_{Bs} gibt. Die OCys-Homologen sind verkürzt, sodass ihnen die für FNR_{Bs} typische C-terminale cysteintragende Domäne fehlt. Die Sequenzidentität dieser Varianten mit der Referenzsequenz liegt zwischen 20 und 40 %, mit Ausnahme des OCys-Proteins aus *B. amyloliquefaciens* (80 % Identität). Obwohl diesen Varianten das vollständige Cysteinmotiv fehlt, besitzen einige den konservierten Aspartatrest oder eine andere zur Ligandbindung befähigte AS (Cystein) an dieser Stelle.

Die OCys-Varianten aus *Niastella koreensis* (Bacteroidetes) und *Clostridium perfringens* weisen am N-Terminus einen Bereich mit jeweils vier Cysteinresten auf, der an FNR_{Ec} erinnert.

FNR_{Bs}	MNFL----S-VRPSD-----SDLISSDLYELLESISTKRKMEKHTYLFREGMDAEELYL	49
<i>Niastella koreensis</i>	MPYN----S-----CDLTS ^C FL ^C TH ^C CLSDWKELIAIKKKTLLHLKKGTLIFKEGPNVEGIYF	52
<i>Clostridium perfringens</i>	MEKT ^C TC ^C GS ^C KEP ^C AKNISIFSTLSTEELLK-IVNMTEHKSFKENDVLCREGEKSDKFL	59
	* * . . .: : : . : : : : * : : :	
FNR_{Ec}	MIPEKRIIRRIQSGGCAIHC ^C QD ^C CSISQL ^C IPFTLNEHELDQLDNIERKKPIQKGQTLFK	60
<i>Niastella koreensis</i>	-----MPYNS ^C DLTSC ^F -L ^C TH ^C CLS-----DWK-----ELIAIK---KKTLHLKKGTLIFK	42
<i>Clostridium perfringens</i>	-----MEKT ^C TC ^C GS ^C KEP ^C AKNIS-----IFSTLSTEELLKIVN-MTEHKSFKENDVLCR	49
	. . * * . ** : . : : : : :	

Abb. 22: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von FNR_{Bs} und FNR_{Ec} mit den OCys-Varianten aus *Niastella* und *Clostridium*. Die Proteine ohne konservierte C-terminale Cysteinreste sind grau dargestellt. Konservierte Cysteinreste des [Fe-S]-Clusterbindenden Motivs im jeweiligen FNR-Typ sind gelb unterlegt. Zusätzliche Cysteinreste sind türkis hervorgehoben. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Abb. 22 zeigt die Sequenz des N-terminalen Bereichs dieser beiden Proteine im Vergleich mit FNR_{Bs} und FNR_{Ec}. Zwischen FNR_{Bs} und den Homologen sind die ersten 20 AS unähnlich, wohingegen eine bessere Übereinstimmung für FNR_{Ec} gegeben ist. An der Bindung des [Fe-S]-Clusters in FNR_{Ec} ist der erste Cysteinrest Cys16 nicht beteiligt (Green *et al.*, 1993). Beide Proteine enthalten die Cysteinreste, die an erster bzw. zweiter Stelle (Cys16, Cys20) in FNR_{Ec} sitzen, wohingegen *Niastella* zusätzlich noch den dritten Rest Cys23 aufweist. Cys122 ist ebenfalls in beiden Proteinen konserviert. Für die Cysteinreste von *N. koreensis* ergibt sich das *Spacing* C-x₂-C-x₈₇-C und für *C. perfringens* beträgt der Abstand der beiden Cysteinreste 96 AS. Des Weiteren besitzen die beiden Proteine vor dem FNR_{Ec} Cysteinmotiv noch einen weiteren Cysteinrest, der ebenfalls als Ligand dienen könnte. Anhand der Sequenzanalysen wird deutlich, dass die beiden Proteine aus *Niastella* und *Clostridium* sowohl typische Merkmale von FNR_{Ec} als auch von FNR_{Bs} besitzen. Die Sequenzidentität der beiden Proteine beträgt 25 bzw. 28 % zu FNR_{Bs} und 24 bzw. 26 % zu FNR_{Ec}. Die höhere Sequenzidentität hat dazu geführt, dass die Proteine als homologe Sequenzen zu FNR_{Bs} eingestuft worden sind und nicht als Homologe zu FNR_{Ec}. Aufgrund des Fehlens des C-terminalen Cysteinmotivs muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den OCys-Varianten um falsch-positive Treffer in der BLAST-Suche nach homologen FNR_{Bs}-Sauerstoffsensoren handelt. Deshalb wurden diese OCys-Varianten aus dem Alignment entfernt und ein neuer Stammbaum rekonstruiert.

4.3.3 Schematischer Baum von FNR_{Bs}

Der Baum in Abb. 23 für FNR_{Bs} dient der übersichtlicheren Darstellung, stellt aber keinen phylogenetischen Stammbaum mehr dar. Durch Zusammenfassen und Zusammenrücken von Ästen, an denen Proteine der gleichen Gattung stehen, gehen die evolutionären Distanzen verloren, aber die Verteilung der homologen Proteine innerhalb der Bakterien wird ersichtlich. Nach Entfernung der OCys-Varianten enthält der neue schematische Baum noch 80 FNR_{Bs}-ähnliche Proteine, wovon bis auf zwei Varianten aus Clostridia und Negativicutes alle zu den Bacilli gehören.

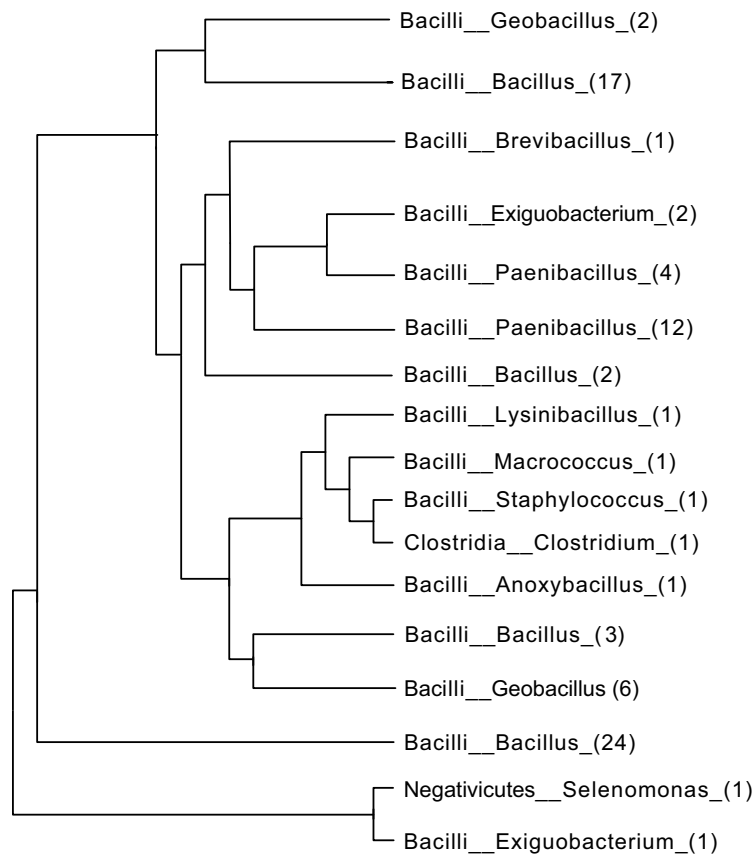


Abb. 23: Schematischer Baum von FNR_{B5}. Alle homologen Proteine des schematischen Baums besitzen das Aspartat-Cysteinmotiv, welches essentiell für die Bindung des [Fe-S]-Clusters ist. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der homologen Proteine innerhalb der jeweiligen Gattung an.

Von den 78 Bacilli-Homologen verteilen sich 46 Proteine auf die Gattung *Bacillus*, 16 auf die Gattung *Paenibacillus*, acht auf die Gattung *Geobacillus* und drei auf die Gattung *Exiguobacterium*. Die restlichen Proteine sind in *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Macrococcus* und *Staphylococcus* zu finden. Im Vergleich zum ursprünglichen Stammbaum unterscheidet sich die Verzweigung der Äste des rekonstruierten Baums nur gering. Am großen Hauptast stehen sich 24 homologe Proteine der Gattung *Bacillus* den übrigen Proteinen gegenüber. Wie auch schon im phylogenetischen Stammbaum gibt es Proteine in *Selenomonas* und *Exiguobacterium*, die vollständig separiert an einem Ast zu finden sind. Die Proteine aus *Lysinibacillus*, *Macrococcus*, *Staphylococcus* und *Clostridium* finden sich zusammen an einem Ast in der Mitte des schematischen Baumes wieder und stehen homologen Proteinen aus *Bacillus* und *Geobacillus* gegenüber. Das Referenzprotein FNR_{B5} befindet sich in einer Gruppe mit 16 anderen homologen Proteinen aus *Bacillus* zusammen mit zwei *Geobacillus*-Homologen. Sie stehen den vorher genannten Ästen gegenüber.

Alles in allem lassen sich FNR_{B5}-Homologe vorwiegend innerhalb der Bacilli identifizieren, wobei sie dort besonders in der Gattung *Bacillus* dominant sind. Lediglich zwei homologe Proteine können innerhalb der Gattungen *Clostridium* und *Selenomonas* festgestellt werden, welche zusammen mit den

Bacilli zum Phylum der Firmicutes zählen. Die Homologen zeigen alle das für die [Fe-S]-Cluster-Bindung nötige Aspartat-Cysteinmotiv und es existieren keine Varianten davon.

4.4 NreB aus *S. aureus*

Die Suche nach homologen Proteinen der Sensorkinase NreB aus *S. aureus* ergab insgesamt 73 BLAST-Treffer. Von diesen 74 Proteinen sind 40 innerhalb der Staphylokokken zu finden (54 %). Lediglich zwölf der 74 Proteine (16 %) sind in Bakterien außerhalb der Bacilli zu finden.

4.4.1 Cysteinvarianten von NreB_{sa}

Die NreB-Homologen wurden auf das Vorliegen des C-x₂-C-x₁₁-C-x₂-C-Motivs untersucht. Hierbei wurden verschiedene Cysteinvarianten identifiziert und farblich im Stammbaum markiert (Abb. A 3). Proteine mit vier Cysteinresten werden alle zusammen an Ästen in direkter Nachbarschaft gruppiert. Die Proteine, die weniger konservierte Cysteinreste enthielten (grün, blau, rot, grau markiert), sind an den äußeren Ästen des Stammbaums lokalisiert und besitzen eine größere Distanz zu dem Referenzprotein NreB_{sa}.

47 der 74 Proteine inkl. NreB_{sa} zeigen das typische Cysteinmotiv. Lediglich zwei bzw. vier Proteine sind 3Cys- bzw. 2Cys- Varianten. In zwölf Proteinen existiert nur ein konservierter Cysteinrest. Neun homologe Sequenzen weisen keinen konservierten Cysteinrest auf.

4.4.2 0Cys-Varianten von NreB_{sa}

Die 0Cys-Varianten machen 12 % der homologen Proteine von NreB_{sa} aus. Diese sind den Actinobakterien (3 Treffer), den Clostridia, den Negativicutes, der Spirochaetes, der β - und γ -Proteobacteria sowie *Opitutus terrae* (jeweils 1 Treffer) zugeordnet.

Abb. 24 zeigt den Sequenzvergleich zwischen den 0Cys-Varianten, NreB aus *S. carnosus* und der Referenz NreB_{sa}. Es wird deutlich, dass die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen im Bereich der Kinasedomäne liegt und dass keine Ähnlichkeiten im Bereich der PAS-Domäne bestehen. Die sensorische PAS-Domäne trägt das [Fe-S]-Cluster und ist verantwortlich für die Funktion von NreB als Sauerstoffsensoren (Mullner *et al.*, 2008). Die Proteine besitzen das konservierte DxxxQ-Motiv der HisKA_3-Sensorinasen (Huynh *et al.*, 2010) und sind demnach der Kinasedomäne von NreB ähnlich. Aufgrund der mangelnden Ähnlichkeit in der PAS-Domäne muss bei den 0Cys-Varianten davon ausgegangen werden, dass nur die Kinasedomäne aber nicht die PAS-Domäne für die positive Einordnung in der BLAST-Suche verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen dieser Varianten aus dem Alignment entfernt.

PAS-Domäne	
NreB_{Sa}	-----MINE-----DSIQDLTLLKK 15
S. carnosus	-----MKSIS-----NRDKLQDLLTQ 16
<i>Eggerthella lenta</i>	IGA-----PLKWIY----SAGAT--GERHRRIVLAPGHI-----GG 72
<i>Eggerthella sp</i>	IGA-----PLKWVY----SAGAT--GERHRRIVLAPGHI-----GG 72
<i>Cryptobacterium curtum</i>	VGA-----PLRWVY----ASGAS--GNRYCRIVLSPGHV-----GG 62
<i>Desulfitobacterium</i>	RNR-----SLIYLR----SEGGL-----LLRNQGRGVITLYWKQCKEAGSNELLNQ 46
<i>Selenomonas ruminantium</i>	DTL-----KLKEIY----RTTLQTVKKNKTQMFISI SEARKEVDF--QRKQLADIKGK 59
<i>Treponema azotonutricium</i>	-----MLTAHGTTGQ----- 9
<i>Shewanella piezotolerans</i>	MPFAKVQRMSLVRI TKDNVHEGAYSVAAPGYTPTKMVGKGFKSPYL-----DRISAG 91
<i>Rhodoferax ferrireducen</i>	RLA-----G-----QLR----- 52
<i>Opiritutus terrae</i>	DLA-----R-----MHE----- 53
NreB_{Sa}	-YYEHS-IEKIVFADDNGKII---AMNDAAKDILSEEDNYSAVANAIC--HRCCEGYTNAV 68
S. carnosus	-YYLNT-NEKMVFLNSTGEVI---ALNEAAEEVFADDNDYSQMTNAV C--RRCEGYSNEY 69
<i>Eggerthella lenta</i>	-ITIKA-GKPMFTNIDEID---PREYSSYPVFAEDLHSFCALPLTR-D---GRV-- 120
<i>Eggerthella sp</i>	-ITIKS-GKPMFKDIDQEID---PREYSSYPVFAEDLRSFCALPLKS-K---GRV-- 120
<i>Cryptobacterium curtum</i>	-IVLKA-GRPMLFTNIDAQLD---PRKYSSYPVFAEDLRSFCALPLVK-ASIEGESV-- 114
<i>Desulfitobacterium</i>	-ITEQI-PNPVLSNEAGWVI---GAN-----GAV--MRLTGWSFQE 81
<i>Selenomonas ruminantium</i>	-LIEVI-ANVDYLENKTQLGKQSLAAASKAFSTEDMQDLYGEVAFMLDK-----LQY 109
<i>Treponema azotonutricium</i>	-----GPESEALDSFTS-----ALDKFSASPAGNLYLINRPAITKSVTSIGKTAER 55
<i>Shewanella piezotolerans</i>	EAI IHTGPIEEVFTQEEI-----ELVGMAGIVAHVVIPIKVRDRIWGGIA-- 136
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	----PD-LVLMIDIQL---AS---VMDG---VAAA-QAIRTQFALPVVFLT-----AFDA 91
<i>Opiritutus terrae</i>	----AS---LMALAAATHDFGD---SRNG---LMKRAGNFADALLPIMDQHRGTGASFQR 100
NreB_{Sa}	DVQ-----SCKDCFLFSMQVQA---TNFQVFMKTKDQK---VMPFTATYQL---- 108
S. carnosus	DIM-----SCENCFLALEIIGK---GSFQVFI RTKDNK---IQPYTASYEL---- 109
<i>Eggerthella lenta</i>	-VAVLLCAFRTVSDRHEAAYRQVIDDL---GTLCDLDVVSDD---FMDFERIAVE---- 169
<i>Eggerthella sp</i>	-VAVLLAAFRRSVSSHHTVYAQLIEDLA---GEFAGLEV VATD---FMNFERIAAE---- 169
<i>Cryptobacterium curtum</i>	-HGVLVCAFRSTDASHKDI FARLFKELE---DGFCNFSVRCSE---FINLNGAHTV--- 163
<i>Desulfitobacterium</i>	LTTGRMTVFRHN--SPIDDWYNLGGDEG---HGLEVCLERQDGMRLKLP IESVFTY---- 132
<i>Selenomonas ruminantium</i>	-----ARQK-EEHLRQQRDELELSLRRLEGLLEQSEN---TLAIGSVATY---- 151
<i>Treponema azotonutricium</i>	LK-----AAAE TSDENGVRSIMLEIDTAVDQLQIIDTGLSDTI-QLRYFQLFFFSLL 107
<i>Shewanella piezotolerans</i>	-----CSRY---KDHNGWSPVLIERI---KTLGQVLA-----A--SY---- 165
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	-----D-QILARA-KLT---EPFGYILKPF SER-ELRNVLAMALY---- 125
<i>Opiritutus terrae</i>	-----LQQR AETRLRHAA-ALA---EGNRQLNREVKRR--KAGE-AAVEKA---- 139
Kinasedomäne	
NreB_{Sa}	IDQDRGIHAFTLQNVSSQIEEQEKLHQQRMMRKTISAQENERKRISRELHDSVIGEMLN 168
S. carnosus	IDHEKGIYAFTLHNVSPOIQRQERMYQRKMMQKTISAQENERKRISRELHDGIVQELINV 169
<i>Eggerthella lenta</i>	KRADDQ-----KNPI--FIRSELARVIAAQEDERKRISRELHDGIAQELLTTL 214
<i>Eggerthella sp</i>	KRNDAQ-----HAPI--VVRSELSRVIAAQEDERKRISRELHDGIAQELLTV 214
<i>Cryptobacterium curtum</i>	GPDEQA-----TTDQKNRPASGEVAIQQAQESERRRISRELHDGLAQELLSV 210
<i>Desulfitobacterium</i>	RPPGQAVV-AILREFS---PQQEYVQNLLTKYIIRAQEDERKRVSRELHDELGQNIYSV 188
<i>Selenomonas ruminantium</i>	LSSQ-----FNKITQOQE--FTQKQSIGEHVIMAHEEERKRISRNLHDTVAQGLAAA 202
<i>Treponema azotonutricium</i>	VLLTVLVWLLDRLEKAI S---MGQQSLIFSRETVLAQEQERSRIARELHDTIAQDLWRL 165
<i>Shewanella piezotolerans</i>	---ERYHFWMS---LQNQNKELSLSRHLMENQETERRLLSRELHDNFQORLALL 214
<i>Rhodoferax ferrireducens</i>	KHQAEA-----KL-----LTT-TRQLQALSRRVLEAQEFERRRVAIELHDELGQSLTAI 173
<i>Opiritutus terrae</i>	KEHYRCLF--LES-----EVM-QKKLQRLTRQILSAQEDERREISRELHGEVVQTLVGI 190
	:* ** :: :*. . * :

Abb. 24: Ausschnitt des Sequenzvergleichs von NreB_{Sa} und OCys-Varianten. Die Proteine ohne konservierte Cysteinreste sind grau dargestellt. Konservierte Cysteine des Cysteinmotivs sind gelb unterlegt. Der Phosphorylierungsrest der Sensorkinasen ist grau markiert, wohingegen das DxxxQ-Motiv dunkelgelb hervorgehoben ist. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an. Der Beginn der PAS- und Kinasedomäne von NreB_{Sa} sind angedeutet.

4.4.3 Schematischer Baum von NreB_{Sa}

Der Baum ohne die OCys-NreB-Proteine dient der übersichtlicheren Darstellung, stellt aber aufgrund des Fehlens der evolutionären Distanzen keinen phylogenetischen Stammbaum mehr dar. Nach Entfernung der OCys-Varianten enthält der neue Baum noch 65 NreB-ähnliche Proteine.

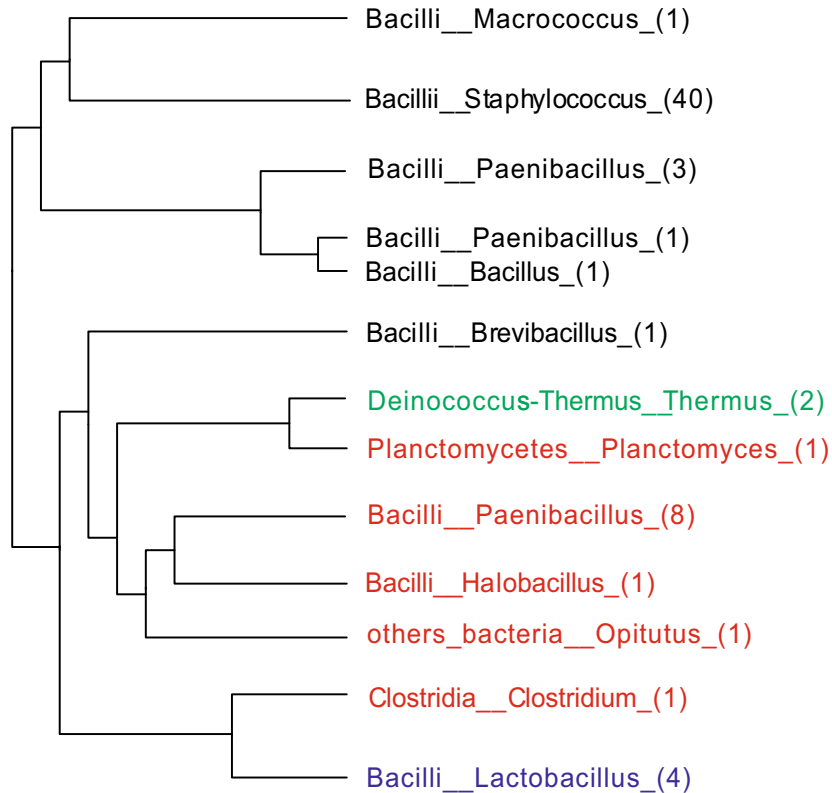


Abb. 25: Schematischer Baum von NreB_{Sa}. Homologe Proteine mit drei konservierten Cysteinresten sind grün dargestellt, während das Vorhandensein von zwei bzw. einem konservierten Cysteinrest blau bzw. rot gekennzeichnet ist. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der homologen Proteine innerhalb der jeweiligen Gattung an.

Der Baum wird aus zwei Hauptästen gebildet (Abb. 25). Proteine, die das konservierte Cysteinmotiv aufweisen, stehen an einem Hauptast den Proteinen mit reduzierter Cysteinanzahl gegenüber. Die Ausnahme ist das homologe Protein aus *Brevibacillus brevis*, welches trotz seiner vier Cysteinreste am zweiten Hauptast zu finden ist. Unter den 47 homologen Proteinen, die das vollständige Cysteinmotiv besitzen, befinden sich 40 aus Staphylokokken. Zusätzlich gibt es NreB_{Sa}-Homologe in anderen Bacilli-Arten wie *Macrococcus caseolyticus*, *Bacillus clausii* und acht Paenibazillen.

4.4.4 3Cys-Varianten von NreB_{Sa}

Die grün dargestellten homologen Proteine der Gattung *Thermus* besitzen drei C-terminalen Cysteinreste, wohingegen das erste Cystein fehlt und durch Isoleucin bzw. Valin ersetzt ist (Abb. 26). Das Cystein-*Spacing* dieser Varianten (C-x₁₇-C-x₃-C) unterscheidet sich leicht von dem von NreB. Direkt am N-Terminus der beiden Proteine befindet sich ein zusätzlicher Cysteinrest (türkis dargestellt), welches ein von NreB abweichendes Cysteinmotiv zur Folge hätte. Die höchste Ähnlichkeit zwischen den Homologen und NreB sind im Bereich der Kinasedomäne zu finden. Im Gegensatz zu NreB_{Sa} zeigen die *Thermus*-Homologen allerdings kein DxxxQ-Motiv der Kinase.

sich bei diesen Treffern um Sensorkinasen. Die Paenibazillen enthalten neben den 1Cys-Homologen auch 4Cys-Homologe (Vgl. Abb. 25). Im Sequenzvergleich der 1Cys- und 4Cys-Varianten der Paenibazillen entspricht der einzelne Cysteinrest dem ersten Cysteinrest des Cluster-Bindemotivs. Die Sequenzen der homologen Proteine von *Planctomyces* und *Clostridium* besitzen wenig Ähnlichkeit innerhalb der PAS-Domäne. Der enthaltene Cysteinrest entspricht jeweils dem zweiten und vierten NreB_{Sa}-Cystein im Alignment (Abb. A 6).

NreB_Sa	SIEKIVFADDNGKIIAMNDAAKDILSEEDNYSAVANAI	CHRCE	-----GYTNA-Y-DV	70			
<i>H. halophilus</i>	ELVDIKYALDESSIVAVTDQRGRIR		-----YVNNKFC	EISKFGVEELIGNDRHLLNSG 173			
	.: .*	.*	*: .*	*: .*			
NreB_Sa	QSC	KD	C	FLESMQVQATNFQV----	FMK-----TKDQKVMPTTATYQLIDQDRGIHAFT 119		
<i>H. halophilus</i>	HHSKDFFKDLWRTIGTGYVWKGELKNKAKDGSFYWVDTTIVPFLN		-----DKGK-PYQ	225			
	: .**	*	:	: .*			
NreB_Sa	LQNVSSQIEQQ--EKLHQORMMRKTISAQENERKRISRELH	DSV	IQEMLNVDVQLRLLKY	177			
<i>H. halophilus</i>	YLAIRNEITERKRVRQQLQHMMTRLIHVQEEERKQVSRELH	DG	IGQELYSLISMHRIOQ	285			
	: .**	:	: .*	***:***:*****: **:			
NreB_Sa	DAAKDILSEEDNYSAVANAI	CHRCE	EGYTNA-YDVQSC	KD	C	FLESMQVQATNFQVFM----	92
<i>P. sp</i>	DHAGKILYVNDKFC	EISQYDRSELLGQDHRI	INSGTHPKAFMKELWTT	ISSGQVWYGD	DIK 118		
<i>P. mucilaginosus</i>	DREGRIQYVNDKFC	EISKYPREELIGRDHRI	INSGYHDKAFMKNLWAT	IGSGRVWRGD	VK 119		
<i>P. polymyxa</i>	DHRGIIQYVNDKFC	EISQYSREELIGQDHRL	INSGYHTRAFMKNLWTT	IRSGEVWQGE	IR 120		
<i>P. terrae</i>	DHRGIIQYVNDKFC	EISQYSREELIGRDHRL	INSGYHTPAFMKNLWTT	IRSGEVWQGE	IR 120		
	*	*	:	***: .	: .*		
NreB_Sa	AQENERKRISRELH	DSV	IQEMLNVDVQLRLLKYQED	TTKLEDAENIEYIVAKLIDDIRN	204		
<i>P. sp</i>	IQEEERRKFSRELH	DG	IGQSLFSLLIQLDRVISAP--	AYGEEQLPFIRNQVAGIIEE	VRS 230		
<i>P. mucilaginosus</i>	IQEEERRRFSRELH	DG	IGQSLFSLLIQMDRVISER---	GDAELEHLRHTVSDIIQD	VRG 229		
<i>P. polymyxa</i>	IQEEERKRFSRELH	DG	IGQSLFSLIIQLDSQLAEQ---	PSATLENLRTOVTDIIK	DVRG 230		
<i>P. terrae</i>	IQEEERKRFSRELH	DG	IGQSLFALIIQLDSQLAES---	PSPTLEKLRSQVTDIIK	DVRG 230		
	:	*:***:*****: *	:	: **:	***:		

Abb. 28: Ausschnitte der Sequenzvergleiche zwischen NreB_{Sa} und 1Cys-Varianten aus *Halobacillus* und *Paenibacillus* spp.

Die Homologen mit einem konservierten Cysteinrest sind rot dargestellt. Konservierte Cysteinreste des [Fe-S]-Clusterbindenden Motivs sind gelb unterlegt, mögliche konservierte Cysteinreste türkis. Der Phosphorylierungsrest der Kinasen ist grau markiert, wohingegen das DxxxQ-Motiv dunkelgelb hervorgehoben ist. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NreB_{Sa}-Homologe hauptsächlich in den Bacilli vorkommen und darunter vor allem bei den Staphylokokken. Neben den Homologen mit vollständigem Cysteinmotiv gibt es auch Homologe mit unvollständigem Cysteinmotiv. Zur letzteren Gruppe zählen die 3Cys-Homologen aus der Gattung *Thermus*, die 2Cys-Homologen der Laktobazillen und die 1Cys-Homologen, die sowohl in Bazillen also auch in Planctomyceten und Clostridien zu finden sind.

4.5 WhiB3 aus *M. tuberculosis*

Die BLAST-Suche zu WhiB3 aus *M. tuberculosis* ergab 124 weitere homologe Proteine, die alle ausschließlich in den Actinobakterien zu finden sind, davon 34 bei den Mycobakterien (27 %). Auf die Gattungen *Streptomyces* und *Corynebacterium* entfallen jeweils neun Prozent der homologen Proteine. Die restlichen 55 % der WhiB3_{Mt}-Homologen finden sich in den unterschiedlichsten

Gattungen innerhalb der Actinobacteria wieder. Zu den Gattungen mit acht bis vier homologen Proteinen gehören *Rhodococcus*, *Frankia*, *Nocardia*, *Amycolatopsis* und *Nakamurella*.

4.5.1 Cysteinvarianten von WhiB3_{Mt}

Um Sicherzustellen, dass es sich bei den homologen Proteinen um potentielle [Fe-S]-haltige O₂- bzw. Redoxsensoren handelt, wurden die Proteinsequenzen mit dem Referenzprotein WhiB3_{Mt} verglichen und auf das Vorhandensein des konservierten Cysteinmotivs C-x₂₉-C-x₂-C-x₅-C untersucht. Die identifizierten Cysteinvarianten wurden farblich im Stammbaum markiert (Abb. A 4).

Der Stammbaum von WhiB3 ist sehr verzweigt und es lassen sich keine großen Hauptäste identifizieren. Die Ausnahme stellt der Hauptast mit den Homologen der Mycobakterien dar.

Fünf Prozent der WhiB3_{Mt}-Homologen fehlt jeweils der erste konservierte Cysteinrest, diese Varianten kommen verstreut im Stammbaum vor. Die grün markierten 3Cys-Varianten sind in *M. intracellulare*, *M. sp.*, *Sm. hygroscopicus* und je einer Art der Gattungen *Amycolicococcus* und *Thermomonospora* zu finden.

<i>Thermomonospora curvata</i>	-----MLFFGPDGERQPEREIRERKAKQI	CMGCPVRT	32
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	-----MDSSLFFHPEGERGAARSARENSAKEV	CMRCPVRA	35
<i>Amycolicococcus subflavus</i>	-----MDSSVFFHPDGERGRARLERERRAKAL	CRECPVLA	35
WhiB3_{Mt}	MPQPEQLPGPNADIWNWQLQGL	CRGMDSSMFFHPDGERGRARTQREQRAKEM	CRRCPVIE 60
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	MPQPEQLPGPNADIWNWQLQGL	CRGMDSSMFFHPDGERGRARTQREQRAKEM	CRRCPVIE 60
<i>M. intracellulare</i>	-----MFFHPDGERGRARMQREQRAKEM	CRQCPVIQ	31
<i>M. sp.</i>	-----MFFPPDGERGRARAQREQNAKRWC	CRSCPVLE	31
		:** *:*** * ** * **	
<i>Thermomonospora curvata</i>	ECLDYAVSRPEKYGTWGGGLNEDERASERRRRMRRANAA	-----	70
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	ECAAHALAVREPYGVWGGLTEDEREELMGRARNRLVAASTTSGDTASEH	-----	84
<i>Amycolicococcus subflavus</i>	QCREHALTVGEPYGIWGGMSESERMHVMKVSRSQRIA	-----	72
WhiB3_{Mt}	ACRSHALEVGEFPGVWGGGLSESERDLLLKGTMGRTRGIRRTA	-----	102
<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	ACRSHALEVGEFPGVWGGGLSESERDLLLKGTMGRTRGIRRTA	-----	102
<i>M. intracellulare</i>	ECRSHALEVGEFPGVWGGGLSESERDLLLKGDIGR	--GIRRSA	71
<i>M. sp.</i>	QCRahalavgepygiwggmseSerhaalrclRPSG	-----	66
	* :* : * ** ***: .*. **		

Abb. 29: Sequenzvergleich von WhiB3_{Mt} und verkürzten 3Cys-Varianten mit dem Spacing C-x₂-C-x₅-C. Die Varianten mit drei konservierten Cysteinresten sind grün dargestellt. [Fe-S]-Cluster- bindende konservierte Cysteinreste sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an.

Diese Proteine besitzen eine um 20-30 AS verkürzte Sequenz am N-Terminus. Dadurch entfällt der erste Cysteinrest des Cys-Motivs. Trotzdem sind die Homologen aus *M. intracellulare* zu 90 % identisch mit WhiB3_{Mt}, während die anderen Homologen eine Sequenzidentität zwischen 42 und 70 % aufweisen.

Die restlichen 95 % der homologen WhiB3-Proteine besitzen das vollständige Cysteinmotiv mit identischem Spacing. Die Proteindatenbankrecherche zeigt zusätzlich, dass in allen Bakterien mit WhiB3-Homolog multiple Kopien an WhiB-ähnlichen Proteinen kodiert werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass WhiB3_{Mt}-Homologe mit dem Cluster-koordinierenden konservierten Cysteinmotiv in vielen verschiedenen Gattungen der Actinobakterien zu finden sind. Einigen wenigen WhiB3-ähnlichen Proteinen fehlt der N-terminale Cysteinrest aufgrund einer

verkürzten Aminosäuresequenz. Diese 3Cys-Varianten kommen sowohl innerhalb der Mycobakterien als auch in anderen Gattungen vor.

4.6 Zusammenfassung der Daten zur phylogenetischen Verteilung der O₂-Sensoren

Für die [Fe-S]-haltigen Sensoren FNR aus *E. coli* und *B. subtilis*, NreB aus *S. aureus* und WhiB3 aus *M. tuberculosis* sowie den Genregulator CRP aus *E. coli* konnten in der BLAST-Suche zahlreiche homologe Proteine identifiziert werden. Für die Koordination des [Fe-S]-Clusters besitzt jeder Sensor ein spezifisches konserviertes Cystein- bzw. bei FNR_{Bs} Aspartat-Cysteinmotiv. Da das Vorhandensein dieser Motive ein Indiz für die Funktion als Sauerstoffsensor ist, wurden alle homologen Proteinsequenzen auf die Existenz dieser AS untersucht. Vor allem für FNR_{Ec} und NreB_{St} konnten verschiedene Cysteinvarianten mit unterschiedlicher Anzahl an Cysteinresten bestimmt werden. Für beide FNR Proteine und NreB wurden außerdem Varianten gefunden, denen das konservierte Cluster-Bindemotiv fehlt. In FNR_{Ec} waren diese 0Cys-Varianten über die ganze Sequenz ähnlich zur Referenz, wohingegen dies für FNR_{Bs} und NreB nicht der Fall war. Die 0Cys-Varianten aus FNR_{Bs} zeichnen sich durch das Fehlen der C-terminalen cysteintragenden Domäne aus, während die 0Cys-Varianten aus NreB lediglich Ähnlichkeiten zur Kinasedomäne und nicht zur cysteintragenden PAS-Domäne zeigen. Aus diesem Grund wurden die homologen Proteine ohne Cluster-Bindemotiv für FNR_{Bs} und NreB_{St} aus den Alignments entfernt und neue Stammbäume konstruiert, da es sich bei diesen Treffern wohlmöglich um falsch-positive Treffer handelt.

Die in Abb. 30 dargestellte Anwesenheitsmatrix zeigt die Verteilung bzw. das Vorkommen der homologen Proteine der jeweiligen Referenzproteine nach der Analyse der identifizierten Cysteinvarianten. Jeder Sensor ist dominant in seiner Bakterienklasse bzw. Bakterienphylum. Die zusätzlichen BLAST-Treffer außerhalb der dominanten Bakterienklasse für FNR_{Bs} und NreB_{St} sind aufgrund des Entfernens der falsch-positiven 0Cys-Varianten reduziert.

FNR_{Ec} ist hauptsächlich innerhalb der Proteobakterien zu finden, wobei auch homologe Proteine außerhalb dieser Bakterienklassen existieren. Zwei zusätzliche homologe Treffer für FNR_{Bs} sind neben der dominanten Bakterienklasse der Bacilli in Negativcutes und Clostridia identifiziert worden, die alle zu den Firmicutes gehören. Homologe zu NreB_{St} sind vorwiegend innerhalb der Bacilli vertreten, wobei es auch ähnliche Proteine in den Planctomyceten, in Clostridia sowie in den Gattungen *Thermus* und *Opitutus* gibt. Alle NreB_{St}-ähnlichen Proteine außerhalb der Bacilli weisen jedoch nicht das vollständige Cys-Cluster auf, sondern lediglich einzelne Cysteinreste. WhiB3_{Mt} ist nur innerhalb der Actinobakterien zu finden und zeigt eine hohe Konservierung, da nur sehr wenige homologe Proteine existieren, denen einer der Cysteinreste fehlt.

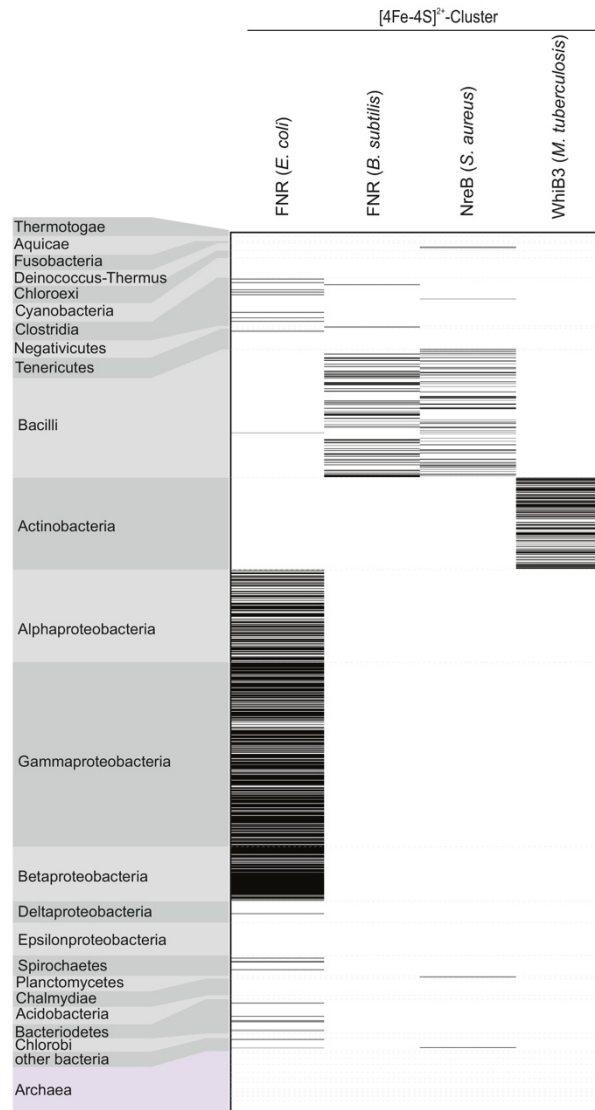


Abb. 30: Anwesenheitsmatrix von homologen Proteinen der [Fe-S]-haltigen Sensoren FNR, NreB und WhiB3. Die Anwesenheitsmatrix zeigt die Verteilung der homologen Proteine zum jeweiligen Referenzprotein, wobei die falsch-positiven OCys-Varianten ohne Cluster-Bindemotiv für FNR_{BS} und NreB_{SA} entfernt wurden. Ein Strich steht für ein homologes Protein im entsprechenden Bakterium. Auf der vertikalen Matrixachse lassen sich die Bakterienphyla ablesen.

4.7 Interaktionsstudien mit dem BACTH-System zur Untersuchung der NreA/NreB-Heterodimerisierung und der NreA/NreA-Homodimerisierung

Die Interaktionsstudien des Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-Systems wurden *in vivo* in *E. coli* durchgeführt. Hierfür wurden die folgenden Fusionsproteine verwendet: NreA_{T25}, T₂₅NreA, NreA_{T18}, T₁₈NreA sowie NreB_{T18} und T₁₈NreB. Von den möglichen Kombinationen wurde exemplarisch eine Kombination zur Demonstration der Ergebnisse ausgewählt. Als Positivkontrolle (K+) dienten die interagierenden Leucinzipper (Zip), als Negativkontrolle (K-) zwei nicht interagierende Proteine (NreA und Zip). Die gemessene β -Galaktosidaseaktivität der Negativkontrolle gibt die Höhe des experimentellen Hintergrunds an.

4.7.1 BACTH-Interaktionsstudien zum NreA Cluster I „Nitratbindetasche“

Der konservierte Bereich des Cluster I „Nitratbindetasche“ wird aus dreizehn konservierten Aminosäureresten um den Deckel der Nitratbindetasche Y95 gebildet. NreA-Varianten, die in den Homodimerisierungsstudien eine veränderte Interaktion gegenüber der Wildtyp-Situation zeigten, in den Heterodimerisierungsstudien jedoch dem Wildtyp entsprachen, sind in Abb. 31 dargestellt.

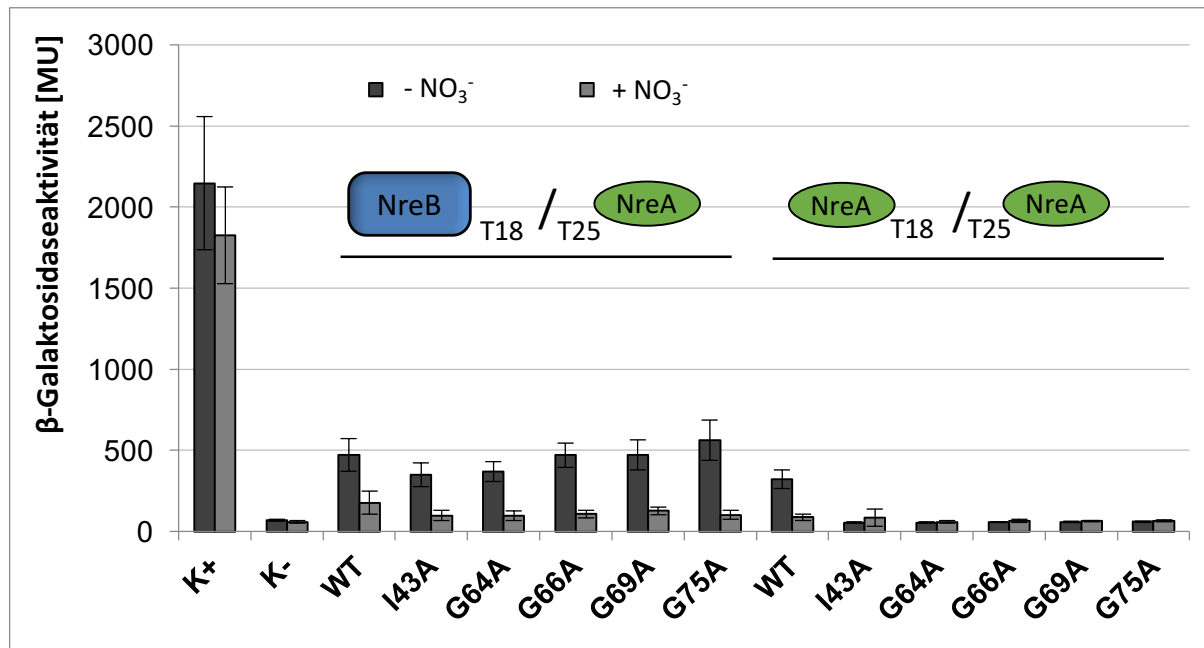


Abb. 31: BACTH-Interaktionsstudien zu NreA-Varianten aus Cluster I in *E. coli*. Die Kulturen wurden anaerob bei 30 °C gezüchtet. Dunkelgraue Balken geben nitratfreie Zuchten an, hellgraue Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten. Die Hetero- und Homodimerisierung der Proteinfusionen von NreB und NreA bzw. NreA und NreA wurde durch die Aktivität der refunctionalisierten Adenylatzyklase aus *Bo. pertussis* bestimmt. Das Maß der Interaktion ist durch die β -Galaktosidaseaktivität dargestellt und in Miller-Units [MU] angegeben. Als Positivkontrolle K+ dienen die interagierenden Leucizipper (_{T25}Zip/_{T18}Zip), als Negativkontrolle K- wurde das nicht interagierende Paar _{T25}NreA/_{T18}Zip verwendet.

Die Positivkontrolle zeigte eine β -Galaktosidaseaktivität von etwa 2100 MU und lag damit etwa um den Faktor 30 höher als die Negativkontrolle. Durch die Zugabe von Nitrat kam es zu einer leichten Reduktion der Enzymexpression, verursacht möglicherweise durch einen Salzeffekt. Das wildtypische NreA/NreB-Heterodimer erreichte eine Enzymaktivität von etwa 500 MU und lag damit deutlich über dem Niveau der Negativkontrolle. In Anwesenheit von Nitrat reduzierte sich die Aktivität um etwa 60 %, was wahrscheinlich auf den spezifischen Nitrategieffekt zurückzuführen ist. Die NreA-Varianten I43A, G64A, G66A, G69A und G75A aus Cluster I zeigten eine dem Wildtyp entsprechende Heterodimerisierung mit NreB und eine entsprechende Abnahme nach Zugabe von Nitrat. Für das wildtypische NreA/NreA-Homodimer wurde eine β -Galaktosidaseaktivität von etwa 330 MU detektiert, welche sich durch die Zugabe von Nitrat um etwa 70 % reduzierte. Im Gegensatz zur Heterodimerisierung zeigten die NreA-Varianten I43A, G64A, G66A, G69A sowie G75A in der BACTH-Homodimerisierung eine dem Hintergrundniveau entsprechende Aktivität.

4.7.2 BACTH-Interaktionsstudien zum NreA Cluster II „N-Terminus“

Auf der gegenüberliegenden Seite der Nitratbindetasche um den Bereich des N-Terminus befindet sich der zweite konservierte Bereich auf der NreA-Oberfläche. Cluster II besteht aus elf konservierten Aminosäureresten, von denen drei Varianten (R21A, D27A, N51D) eine unterschiedliche Auswirkung in den Homo- und Heterodimerisierungsstudien zeigten (Abb. 32).

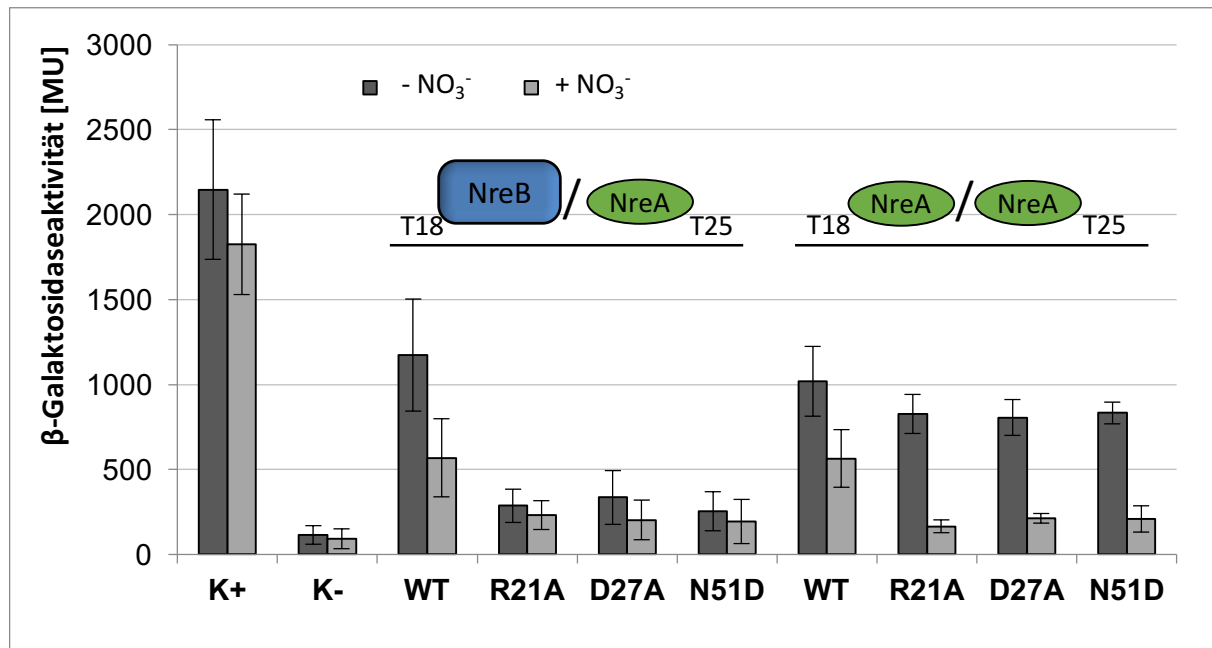


Abb. 32: BACTH-Interaktionsstudien zu NreA-Varianten aus Cluster II in *E. coli*. Die Kulturen wurden anaerob bei 30 °C gezüchtet. Dunkelgraue Balken geben nitratfreie Zuchten an, hellgraue Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten. Die Hetero- und Homodimerisierung der Proteinfusionen von NreB und NreA bzw. NreA und NreA wurde durch die Aktivität der refunctionalisierten Adenylatzyklase aus *Bo. pertussis* bestimmt. Das Maß der Interaktion ist durch die β -Galaktosidaseaktivität dargestellt und in Miller-Units [MU] angegeben. Als Positivkontrolle K+ dienen die interagierenden Leucinzipper (_{T25}Zip/_{T18}Zip), als Negativkontrolle K- wurde das nicht interagierende Paar _{T25}NreA/_{T18}Zip verwendet.

Das wildtypische NreA/NreB-Heterodimer zeigt in Abwesenheit von Nitrat eine Aktivität von etwa 1100 MU, welche sich durch die Zugabe von Nitrat in etwa halbierte. Die NreA-Varianten R21A, D27A sowie N51D erreichten eine Enzymaktivität von etwa 300 MU und lagen damit leicht über dem Niveau der Negativkontrolle. Durch die Zugabe von Nitrat reduzierte sich die Aktivität erneut um etwa 20-30 %. Die gemessene β -Galaktosidaseaktivität des wildtypischen Homodimers lag bei 1000 MU und halbierte sich fast in Anwesenheit von Nitrat. Für die NreA-Varianten R21A, D27A und N51D wurden Enzymaktivitäten von rund 800 MU ermittelt und entsprachen so im Gegensatz zur Heterodimerisierung etwa dem wildtypischen Niveau. Allerdings reduzierten sich die Werte durch die Zugabe von Nitrat um 75-80 %.

4.7.3 Interaktionsmodell zwischen dem NreA-Dimer und NreB

Basierend auf den Ergebnissen der BACTH-Studien wurde ein Interaktionsmodell für die NreA-Homodimerisierung sowie die NreA/NreB-Heterodimerisierung erstellt. Die BACTH-Daten zeigten,

dass die NreA-Varianten des Cluster I („Nitratbindetasche“) zwar keine Auswirkung auf die Interaktion zwischen NreA und NreB hatten, die Dimerisierung von NreA aber nicht mehr möglich war. Die NreA-Varianten des zweiten Clusters hingegen dimerisierten ähnlich wie der Wildtyp, jedoch war eine Interaktion mit NreB stark reduziert.

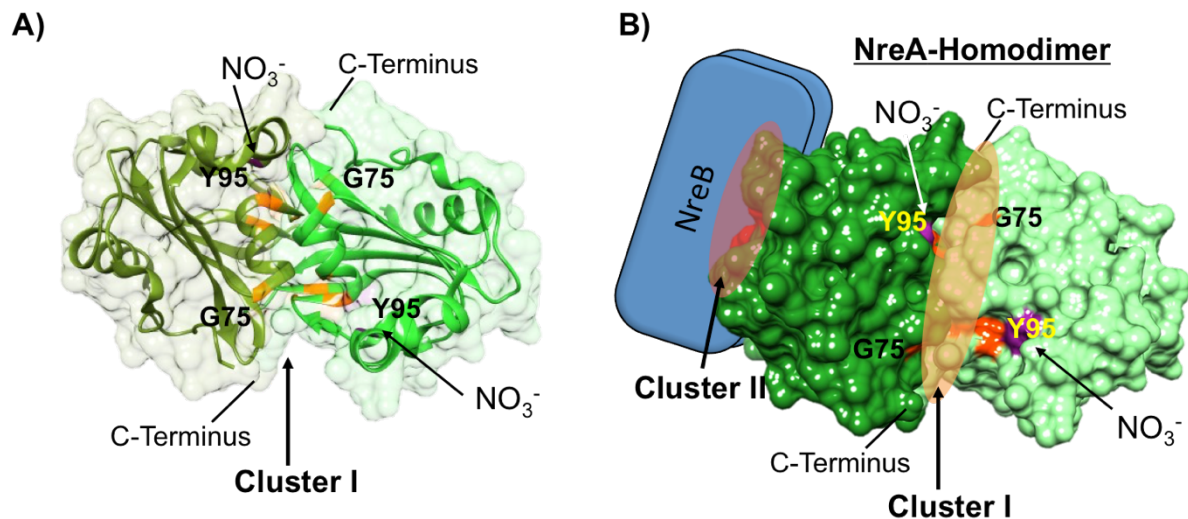


Abb. 33: Modelliertes Interaktionsmodell des NreA-Homodimers sowie zwischen NreA-Dimer und NreB. A) zeigt die Kristallstruktur des modellierten NreA-Dimers. B) umfasst das vollständige Interaktionsmodell zwischen der Oberflächendarstellung des NreA-Homodimers und NreB. Die potentiellen Interaktionsflächen sind farblich angedeutet. Markiert sind die Nitratbindetasche durch Y95 und NO₃⁻, sowie der konservierte Glycinrest G75.

Abb. 33 zeigt das Interaktionsmodell von NreA und NreB basierend auf den BACTH-Ergebnissen. Die Dimerisierungsfläche des NreA-Dimers bildet Cluster I um die Nitratbindetasche. In diesem Bereich befindet sich die Helix α_3 (Abb. 33A). Die NreA-Monomere sind im Modell um 180° zueinander gedreht. Auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins befindet sich Cluster II, welches die potentielle Interaktionsfläche mit NreB darstellt (Abb. 33B).

4.7.4 Einfluss der Fusionskombination auf die NreA/NreB-Heterodimerisierung

Das Prinzip des BACTH-Systems beruht auf der Refunktionalisierung der genetisch getrennten Fragmente T18 und T25 der katalytischen Domäne der Adenylatzyklase aus *Bordetella pertussis*. Diese Fragmente können dabei sowohl N- als auch C-terminal an die zu untersuchenden Proteine fusioniert werden, sodass bei zwei beteiligten Proteinen acht Fusionskombinationen möglich sind. Bei den BACTH-Untersuchungen zur Heterodimerisierung von NreA und NreB zeigten lediglich drei Kombination im Wildtyp eine Interaktion (Koch-Singenstreu, 2013), sodass alle Varianten in weiteren Versuche ebenfalls in diesen Kombinationen getestet wurden. Allerdings kam es in Abhängigkeit der Fusionskombination zu Unterschieden zwischen denselben untersuchten NreA-Varianten (Abb. 34).

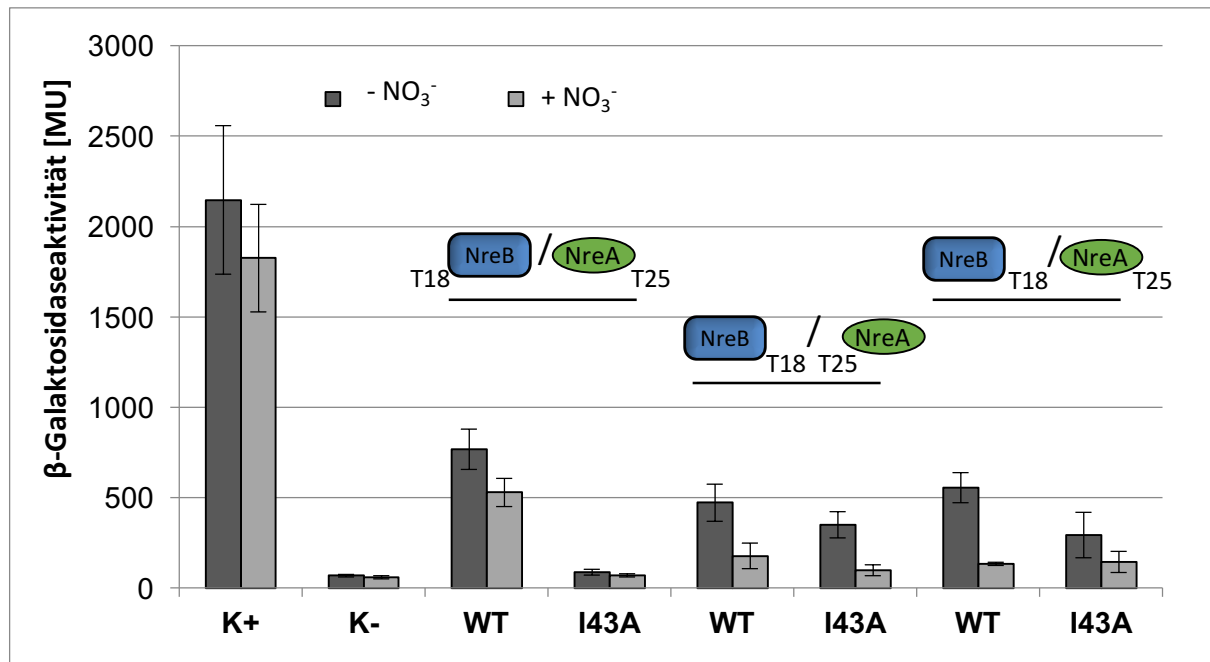


Abb. 34: BACTH-Interaktionsstudien zur Heterodimerisierung zwischen NreB und NreA sowie NreA(I43A) (Cluster I) in Abhängigkeit der Fusionskombination. Die Kulturen wurden anaerob bei 30 °C gezüchtet. Dunkelgraue Balken geben nitratfreie Zuchten an, hellgraue Balken nitrathaltige (10 mM) Zuchten. Die Hetero- und Homodimerisierung der Proteinfusionen von NreB und NreA bzw. NreA und NreA wurde durch die Aktivität der refunctionalisierten Adenylatzyklase aus *Bo. pertussis* bestimmt. Das Maß der Interaktion ist durch die β -Galaktosidaseaktivität dargestellt und in Miller-Units [MU] angegeben. Als Positivkontrolle K+ dienen die interagierenden Leucinzipper (T_{25} Zip/ T_{18} Zip), als Negativkontrolle K- wurde das nicht interagierende Paar T_{25} NreA/ T_{18} Zip verwendet.

Abb. 34 demonstriert beispielhaft die unterschiedliche Ausprägung der β -Galaktosidaseaktivitäten in Abhängigkeit von der studierten Fusionskombination. In der Kombination T_{18} NreB/NreA T_{25} zeigte die Variante NreA(I43A) eine dem Hintergrundniveau entsprechende Enzymaktivität. War das T18-Fragment C-terminal an NreB fusioniert, reduzierte sich die Enzymaktivität der NreA-Variante im Vergleich zum Wildtyp lediglich um 25 (T_{25} NreA) bzw. 50 % (NreA T_{25}). Diese Diskrepanzen konnten für viele weitere Varianten beobachtet werden, ebenso wie eine unterschiedliche Ausprägung innerhalb einer Fusionskombination in Abhängigkeit der Testreihe bzw. des Testtages. Eine Instabilität der untersuchten Fusionsproteine wurde durch Expressionsnachweise mittels Western Blot ausgeschlossen.

4.7.5 Einfluss von NreC auf die NreA/NreB-Heterodimerisierung

Mit Hilfe des etablierten BACTH-Systems lässt sich die Interaktion zweier Proteine untersuchen, jedoch wird dabei der Einfluss anderer Proteine, die für das System physiologisch wichtig sind, außer Acht gelassen. So bedarf die Ausbildung des Septums während der Zellteilung in *E. coli* einer Reihe von essentiellen Proteinen, die über multiple Interaktionen miteinander verbunden sind. Die Interaktion zweier Proteine konnte durch die Anwesenheit eines dritten Proteins dieses Netzwerks moduliert werden (Karimova *et al.*, 2005).

Die Komplettierung des NreABC-Systems durch NreC könnte demnach ebenfalls einen stabilisierenden Einfluss auf NreA und NreB sowie deren Interaktion nehmen und Diskrepanzen zwischen den einzelnen Testreihen reduzieren. Alle Studien zur BACTH-Heterodimerisierung zwischen NreB und NreA sowie den NreA-Varianten wurden deswegen in Anwesenheit von NreC wiederholt. Expressionsnachweise bestätigten, dass alle drei Proteine des Systems stabil gebildet werden (Klein, 2018).

Die Anwesenheit von NreC führte bei der NreA/NreB-Heterodimerisierung zu reproduzierbaren BACTH-Daten. Innerhalb einer Fusionskombination wurden so die Schwankungen bei Messungen an unterschiedlichen Testtagen beseitigt, allerdings gab es vereinzelt noch Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Fusionskombinationen (Abb. 35B). Zusätzlich zeigte sich eine Abhängigkeit der Aktivität von der Wachstumsphase. Wurde der Enzymtest mit Zellen der Exponentialphase durchgeführt, wiesen die getesteten Heterodimerpaare bei Zugabe von Nitrat keine β -Galaktosidaseaktivität auf. Für die in der stationären Phase untersuchten Heterodimerpaare hingegen wurde in Anwesenheit von Nitrat eine deutliche β -Galaktosidaseaktivität gemessen, die etwa der Hälfte der nitratfreien Zucht entsprach. NreA-Varianten, die in der Interaktion mit NreB und Anwesenheit von NreC in der Exponentialphase eine stark reduzierte β -Galaktosidaseaktivität besaßen, zeigten jedoch in der stationären Phase eine dem Wildtyp entsprechende Aktivität. Für die Interpretation der Ergebnisse war demnach die Durchführung des Enzymtests in der exakten Wachstumsphase essentiell (Klein, 2018).

Im Vergleich der Studien zur Heterodimerisierung in Ab- und Anwesenheit von NreC ergab sich zudem ein abweichendes Bild.

In Abb. 35 sind die NreA-Oberflächen sowie die getesteten NreA-Varianten in der Heterodimerisierung mit NreB in Ab- und Anwesenheit von NreC dargestellt. Varianten mit einer reduzierten β -Galaktosidaseaktivität und damit einhergehend reduzierten Interaktion zwischen NreA und NreB sind orange markiert. Wildtypische Interaktion zwischen NreA-Varianten und NreB ist durch eine graue Färbung verdeutlicht. Während in Abwesenheit von NreC ausschließlich Varianten des Cluster II auf der NreA-Oberfläche eine reduzierte NreA/NreB-Interaktion zeigten, wurde in Anwesenheit von NreC vorwiegend reduzierte Heterodimerisierung zwischen NreB und NreA-Varianten des Clusters I gemessen. Allerdings gab es hier leichte Unterschiede in Abhängigkeit der Fusionskombination. In Anwesenheit von NreC zeigten vier der möglichen acht wildtypischen NreA/NreB-Heterodimere eine β -Galaktosidaseaktivität, sodass auch alle NreA-Varianten in diesen Fusionskombinationen untersucht wurden. Für die Varianten NreA(K65A), NreA(I72A) sowie NreA(R73A) wurden in drei von vier Kombinationen eine reduzierte Interaktion mit NreB gemessen. Die in Anwesenheit von NreC ermittelten Ergebnissen zur Heterodimerisierung von NreA und NreB widersprechen somit denen ohne NreC und sind nicht mit dem Interaktionsmodell aus Abb. 33 in Einklang zu bringen.

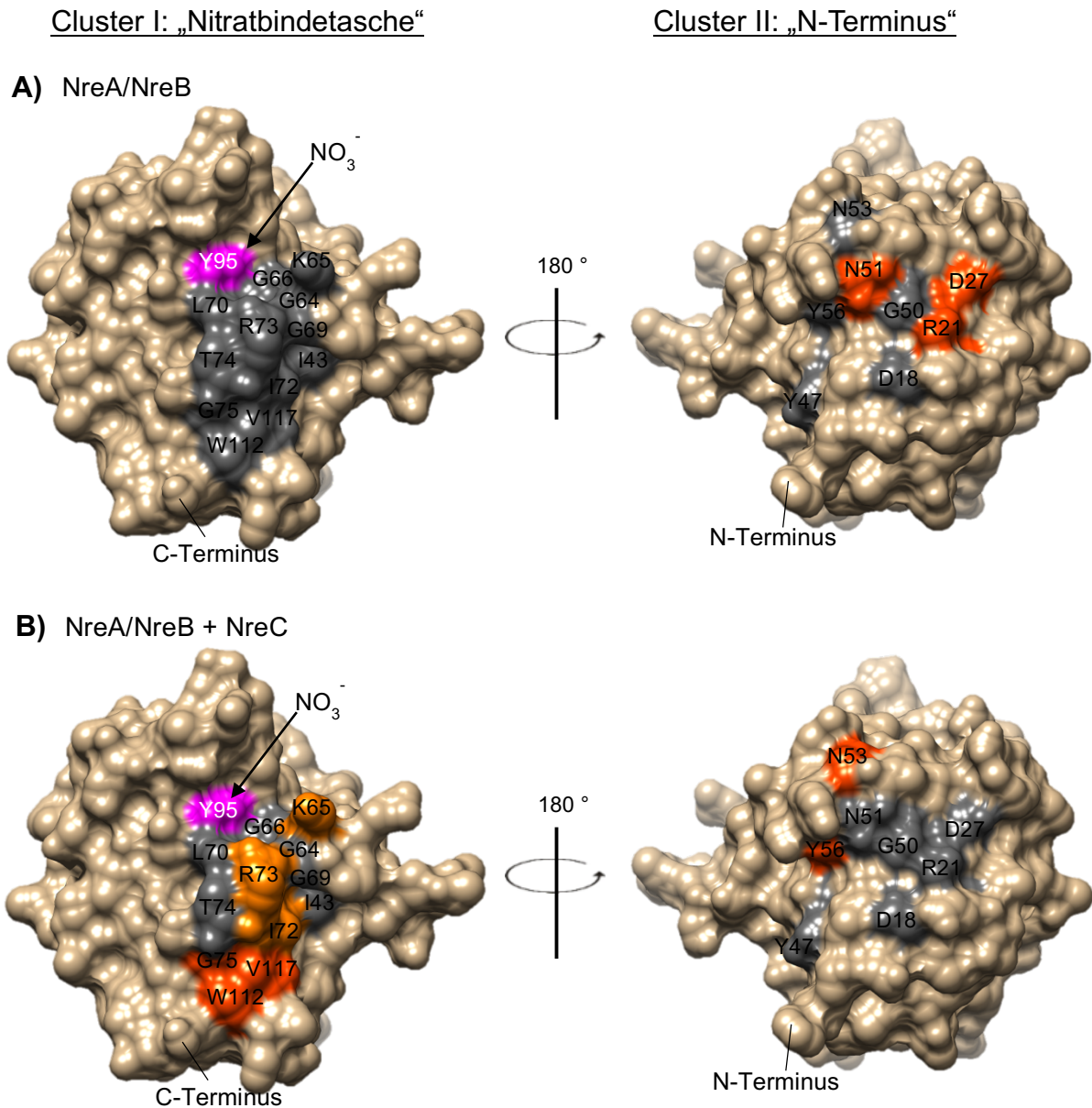


Abb. 35: Oberflächendarstellung der potentiellen Interaktionsstelle in NreA für die Heterodimerisierung mit NreB in Abhängigkeit von NreC. Die Darstellung beruht auf den Ergebnissen der BACTH-Interaktionsstudien. A) repräsentiert die Ergebnisse in Abwesenheit von NreC, B) zeigt die Ergebnisse in Anwesenheit von NreC. Wildtypische Interaktion ist grau dargestellt. Reduzierte Interaktion in allen getesteten Fusionskombinationen zwischen NreB und NreA-Varianten ist orange-rot markiert, wohingegen reduzierte Interaktion in drei von vier getesteten Fusionskombinationen orange dargestellt ist.

4.8 Funktionsstudien der NreA-Varianten

NreA-Varianten, die einen Effekt auf die BACTH-Hetero- und Homodimerisierung gezeigt haben, wurden mit Hilfe der Reporterfusion *narG-lip* funktionell in *S. carnosus* charakterisiert. Das Reporterplasmid pMW1040, welches die Gene *nreA*, *nreB*, *nreC* sowie die Fusion *narG-lip* trägt wurde in den *nreABC*-negativen Stamm *S. carnosus* m1 transformiert. Somit konnten die Auswirkungen von Veränderungen im NreABC-System auf das Expressionsverhalten von *narG-lip* in Abhängigkeit von O₂ und Nitrat *in vivo* in *S. carnosus* untersucht werden. Die Lipaseaktivität ist ein Maß

für die Expression der Zielgene des NreABC-Systems und wird in Units pro Gramm Zelltrockengewicht [U/g ZTM] angegeben.

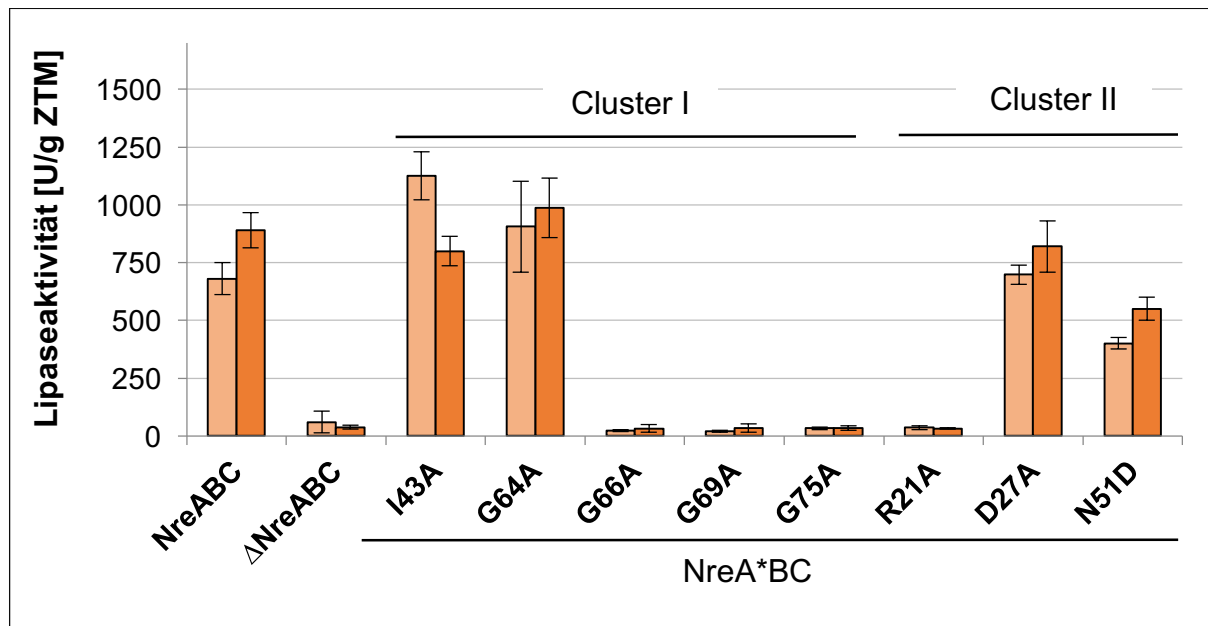


Abb. 36: Lipaseaktivität (*narG-lip* Expression in *S. carnosus*) von NreA-Varianten aus Cluster I und II mit reduzierter Interaktion in BACTH-Hetero- und Homodimerisierung unter anaeroben Bedingungen in Abhängigkeit von Nitrat. Die Messung der Lipaseaktivität wurde nach anaerober Anzucht der Bakterien bis zu einer OD_{578} von 0,5 in Ab- und Anwesenheit von Nitrat (10 mM) durchgeführt. Nitratfreie Zuchten sind hellorange dargestellt, nitrathaltige Zuchten dunkelorange. Als Positivkontrolle der *narG-lip* Expression diente ein *nreABC*-positiver Stamm (WT) (*S. carnosus* m1 pMW1040) und als Negativkontrolle (OFF-Phänotyp) ein *nreABC*-deletierter Stamm (*S. carnosus* m1 pMW1001).

Unter anaeroben Bedingungen zeigte der Wildtyp mit plasmidkodiertem NreABC eine deutliche Lipaseaktivität, welche durch die Zugabe von Nitrat um den Faktor 1,3 gesteigert wurde (Abb. 36). Dieser Nitrategieffekt beruht auf der verminderten bzw. veränderten Interaktion zwischen NreA und NreB (Nilkens *et al.*, 2014). Für die Δ NreABC-Variante konnte lediglich eine sehr geringe Lipaseaktivität, unabhängig von der Anwesenheit von Nitrat, gemessen werden (OFF-Phänotyp). Der OFF-Phänotyp ist durch die fehlende Induktion der Zielgene charakterisiert (Nilkens *et al.*, 2014). Die Varianten NreA(I43A) und NreA(G64A) aus Cluster I wiesen eine dem Wildtyp entsprechende Lipaseaktivität in Abwesenheit von Nitrat auf, allerdings wurde diese durch die Zugabe von Nitrat im Gegensatz zum Wildtyp nicht weiter stimuliert. Die übrigen NreA-Varianten G66A, G69A sowie G75A des Cluster I zeichneten sich durch eine dem OFF-Phänotyp entsprechende fehlende *narG-lip* Expression aus. Für die Variante NreA(R21A) aus Cluster II konnte ebenfalls lediglich eine minimale Enzymaktivität detektiert werden, wohingegen die NreA-Varianten D27A und N51D eine dem Wildtyp-ähnliche Lipaseaktivität aufwiesen. Durch die Zugabe von Nitrat kam es zu einer um den Faktor 1,2 (D27A) bzw. 1,4 (N51D) höheren *narG-lip* Expression.

4.8.1 Unterschiede in den Funktionsstudien in Abhängigkeit der Methode zur Variantenerstellung

Das *narG-lip*-Reporterplasmid pMW1040 ist ein *E. coli/S. carnosus*-Shuttle-Vektor mit einer Größe von etwa elf Kilobasen. Aufgrund der Größe konnte es durch die Mutagenese zu zusätzlichen Mutationen kommen, die eine Auswirkung auf die Funktionsstudien haben könnten. Aus diesem Grund wurden die NreA-Varianten in das Testplasmid sowohl per Mutagenese als auch per Klonierung (nach Erstellung) eingefügt und die *narG-lip* Expression verglichen. Bei der Umklonierung des Testplasmids wurde lediglich das mutierte *nreA*-Gen über die Schnittstellen *SacI* und *XbaI* (oder *XbaI* und *PmeI*) in den wildtypischen pMW1040-Vektor eingefügt.

Für einige NreA-Varianten aus Cluster I wurden in den Funktionsstudien erhebliche Unterschiede für beide Methoden der Mutantenerstellung festgestellt. NreA(I43A) und NreA(G64A) aus Cluster I beispielsweise zeigten in den Funktionsstudien mit mutiertem Testplasmid keine *narG-lip* Expression, während in den Studien des umklonierten Testplasmids eine deutliche Lipaseaktivität detektiert werden konnte. Die Ergebnisse der Varianten aus Cluster I aus Abb. 36 beruhen deshalb auf den Messungen mit den umklonierten Testplasmiden. Sequenzierungen der entsprechenden Plasmide zeigten jedoch keine zusätzlichen oder kompensatorischen Mutationen in den Genen des NreABC-Systems, sodass die Gründe für die unterschiedlichen *narG-lip* Expressionen unklar sind.

4.9 Zusammenfassung der BACTH-Interaktions- sowie der *narG-lip*-Funktionsstudien

Die BACTH-Interaktionsstudien sowie die dazugehörigen Funktionsstudien der NreA-Varianten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die BACTH-Studien in Abwesenheit von NreC deuten auf Cluster I als NreA-Dimerisierungsstelle hin, sowie auf Cluster II als Interaktionsfläche für die Heterodimerisierung mit NreB (Abb. 31 und 32). Die Anwesenheit von NreC hatte jedoch auf die Heterodimerisierung von NreA und NreB bei Verwendung von NreA-Varianten aus Cluster II keinen Effekt. Dies widerspricht dem vermuteten Interaktionsmodell aus Abb. 33.

In den *narG-lip*-Reporterstudien zeigten die NreA-Varianten aus Cluster I den größten Effekt. Waren die NreA-Mutationen mittels Mutagenese eingefügt worden, zeigten diese Varianten keine *narG-lip* Expression (Tabelle 5). Nach Umklonierung der NreA-Substitution konnte für NreA(I43A) und NreA(G64A) eine *narG-lip* Expression detektiert werden, jedoch konnte diese, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht durch Nitratzugabe zusätzlich stimuliert werden. NreA-Varianten des Cluster II zeigten bis auf NreA(R21A) eine dem Wildtyp entsprechende *narG-lip* Expression.

Tabelle 5: Übersicht der BACTH-Interaktionsstudien und *narG-lip*-Funktionsstudien der NreA-Varianten in Abhängigkeit der Testbedingungen. Dem Wildtyp entsprechende Interaktion und *narG-lip* Expression ist mit WT gekennzeichnet. Fehlende

narG-lip Expression ist durch OFF verdeutlicht. NreA-Varianten aus Cluster I (I) sowie Cluster II (II) sind angegeben. N.b.: nicht bestimmt

NreA-Variante	BACTH-Interaktionsstudien			<i>narG-lip</i> -Funktionsstudien	
	NreA/NreB	NreA/NreB + NreC	NreA/NreA	Mutagenese	Klonierung
I43A (I)	WT	WT	reduziert	OFF	Keine NO ₃ ⁻ -Stimulation
G64A	WT	WT	reduziert	OFF	Keine NO ₃ ⁻ -Stimulation
G66A	WT	WT	reduziert	OFF	OFF
G69A	WT	WT	reduziert	OFF	OFF
G75A	WT	reduziert	reduziert	OFF	OFF
R21A (II)	reduziert	WT	WT	OFF	n.b.
D27A	reduziert	WT	WT	WT	n.b.
N51D	reduziert	WT	WT	WT	n.b.

4.10 Interaktionsstudien mit Cystein-Crosslinking für die NreA/NreA-Homodimerisierung

Mit Hilfe von oxidativem *in vivo* Cystein-Crosslinking sollte das durch die NreC-freien BACTH-Studien erstellte NreA-Interaktionsmodell mit einer unabhängigen Methode überprüft werden. Cystein-Crosslinking eignet sich zur Identifizierung von potentiellen Dimerisierungsflächen. In den zu untersuchenden Positionen wurden einzelne Cysteinreste genetisch eingefügt. Aufgrund der chemischen Reaktivität der Sulfhydrylgruppe der Cysteinreste können diese, wenn sie benachbart liegen, zum Disulfid oxidiert werden, was in einem permanenten Dimer resultiert. Dieses kann nach der Auftrennung mittels SDS-Page und anschließendem Western Blot vom Monomer unterschieden werden.

Wildtypisches NreA ist cysteinfrei, sodass die zu untersuchenden Stellen im Protein durch Cystein substituiert werden können. In Abb. 37 sind die Aminosäurereste in NreA dargestellt, die für das oxidative *in vivo* Cystein-Crosslinking zur Untersuchung der NreA-Dimerisierung ausgewählt wurden.

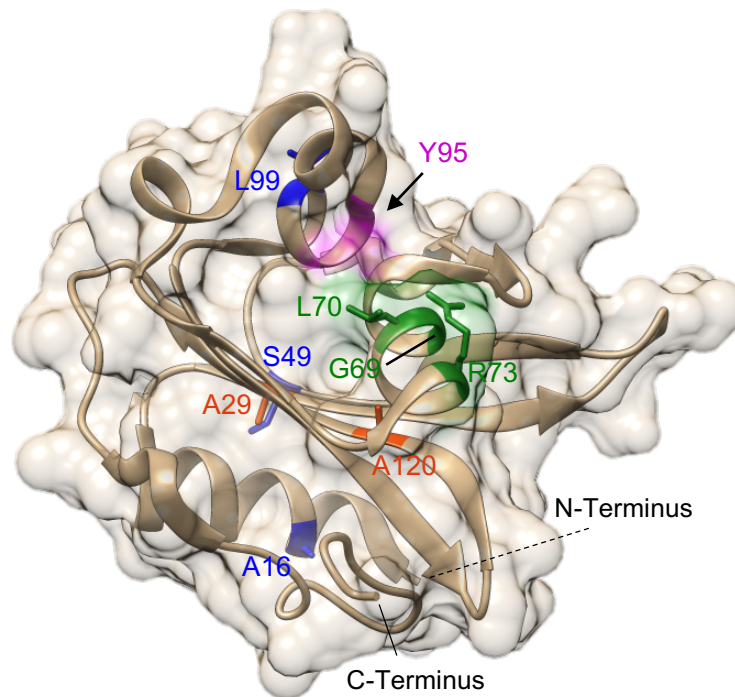


Abb. 37: Lokalisation der für das Cystein-Crosslinking ausgewählten Aminosäurereste im NreA-Kristall. Reste, die in der potentiellen NreA-Homodimerisierungsfläche liegen sind grün markiert (G69, L70, R73). Oberflächenexponierte Reste außerhalb der potentiellen Interaktionsfläche sind blau dargestellt (A16, S49, L99), während nicht oberflächenexponierte, nach innen gerichtete Reste orange gefärbt sind (A29, A120).

Die Reste G69, L70 sowie R73 (grün markiert) bilden einen großen Teil der potentiellen Interaktionsfläche für das NreA-Homodimer und wurden deswegen für das Cystein-Crosslinking ausgewählt. Die blau dargestellten Reste A16, S49 und L99 sind alle oberflächenexponiert, allerdings außerhalb der vermuteten Interaktionsfläche zu finden. Neben dem Wildtyp wurden zusätzlich als Negativkontrollen die Reste A29 sowie A120 gewählt (orange), die in das Proteininnere gerichtete Seitenketten besitzen und demnach keinen Oberflächenkontakt aufweisen.

4.10.1 Oxidatives *in vivo* Cystein-Crosslinking

Das oxidative *in vivo* Cystein-Crosslinking wurde nach bestehendem Protokoll in *E. coli* mit Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)₃ als Oxidationsmittel durchgeführt (Monzel & Unden, 2015). Aufgrund der Reaktivität der Cysteinreste war der während der Zucht und beim Experimentieren vorhandene Luftsauerstoff bereits ausreichend, um ohne zusätzliches Oxidationsmittel NreA*-Dimere zu bilden (Abb. A 7). Neben den dominanten Monomerbanden bei etwa 18 kDa, waren zusätzlich schwache Dimerbanden zwischen 35 und 40 kDa sichtbar. Lediglich im wildtypischen NreA-Ansatz konnte nur monomeres NreA aufgrund fehlender Cysteinreste nachgewiesen werden. Durch Zugabe des Oxidationsmittels Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)₃ wurden die detektierten Dimerbanden aller NreA-Varianten dominanter, jedoch konnten kaum Unterschiede zwischen den einzelnen NreA-Varianten festgestellt werden. Um die Oxidation durch Luftsauerstoff auszuschließen, wurden die Zellen im Weiteren anaerob gezüchtet und

das *in vivo* Crosslinking mit $\text{Cu[II]}-(1,10\text{-Phenanthrolin})_3$ unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dieser Ansatz war aufgrund von schlechtem Wachstum der Zellen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen erfolglos.

4.10.2 Modifiziertes Cystein-Crosslinking

Um spontane (Luft-) Oxidation der Cysteinreste auszuschließen, mussten während der Durchführung des Cystein-Crosslinkings reduzierende Bedingungen herrschen. Hierfür wurde eine modifizierte Cystein-Crosslinking Methode durchgeführt. Anstatt der Durchführung des Crosslinkings *in vivo*, wurden die Zellen nach der Überproduktion der NreA-Varianten in Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT aufgeschlossen und erst der Zellextrakt mit $\text{Cu[II]}-(1,10\text{-Phenanthrolin})_3$ oxidiert.

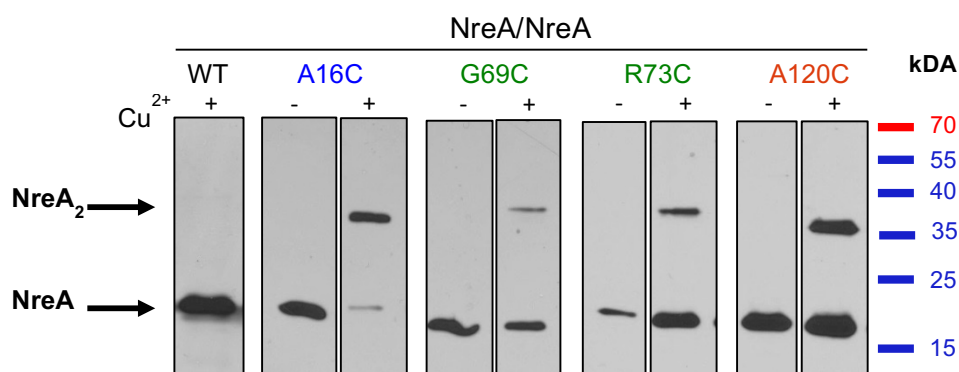


Abb. 38: Western Blots des modifizierten oxidativen Cystein-Crosslinkings mit $\text{Cu[II]}-(1,10\text{-Phenanthrolin})_3$ von NreA-Varianten. Die Zellen des *E. coli* Stammes M15 wurden mit den Plasmiden der NreA-Cysteinvarianten transformiert und aerob ohne Nitrat gezüchtet. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit Glasperlen und 1 mM DTT mit der FastPrep-Zellmühle. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer wurden die Proteine des Zellextrakts mit 4 mM $\text{Cu[II]}-(1,10\text{-Phenanthrolin})_3$ behandelt. Durch Zugabe der Stopp-Lsg (inkl. SDS-Ladepuffer ohne DTT) wurde die Reaktion gestoppt und die Proteine direkt mittels SDS-Page aufgetrennt. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit dem spezifischen Antikörper gegen NreA. Die Pfeile markieren das NreA-Monomer, sowie das Crosslinking-Produkt NreA₂. Die Variante A120C enthält einen nicht-oberflächenexponierten Rest (nach Abb. 37, orange), während G69C und R73C innerhalb der potentiellen Homodimerisierungsfläche (nach Abb. 37, grün) lokalisiert sind und A16C sich auf der gegenüberliegenden Oberfläche (nach Abb. 37, blau) befindet.

Cysteinfreies, wildtypisches NreA zeigte nach der Oxidation lediglich eine Bande bei etwa 18 kDa, welche monomerem NreA entspricht (Abb. 38). Die dargestellten NreA-Varianten wiesen ebenfalls die Monomerbande sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von $\text{Cu[II]}-(1,10\text{-Phenanthrolin})_3$ auf. Durch das Crosslinking mit $\text{Cu[II]}-(1,10\text{-Phenanthrolin})_3$ konnte für alle NreA-Varianten eine Bande zwischen 35 und 40 kDa detektiert werden. Diese entspricht der Größe des NreA-Dimers. Die Dimerbanden der NreA-Varianten A16C und A120C waren am stärksten ausgeprägt, wohingegen die Dimerbande der Variante NreA(G69C) am schwächsten ausgebildet war. Identische Ergebnisse konnten bei der Zucht in Anwesenheit von Nitrat beobachtet werden.

4.10.3 Zugänglichkeit der ausgewählten Cysteinvarianten in NreA

Da alle NreA-Varianten sowohl unabhängig ihrer Lokalisation im NreA-Kristall als auch unabhängig vom Vorhandensein von Nitrat ein Crosslinking-Produkt aufwiesen, wurden die Zugänglichkeiten der Aminosäurereste nach Substitution durch Cystein untersucht. Das Prinzip der Cysteinzugänglichkeitsstudien beruht auf der Reaktion von Maleimidderivaten mit der Sulfhydryl-Gruppe der Cysteinreste. Durch den nukleophilen Angriff des Sulfhydrylanions auf ein Kohlenstoffatom der Doppelbindung des Maleimidrings entsteht eine stabile Thioetherbindung, welche eine weitere Reaktion des Cysteinrests verhindert (Falke *et al.*, 1988). Voraussetzung für diese Reaktion ist das Vorhandensein von Wasser, sodass lediglich wasserexponierte, zugängliche Cysteinreste reagieren. Um zwischen zugänglichen und unzugänglichen Cysteinresten unterscheiden zu können, wurden zwei verschiedene Maleimidderivate in einem zweistufigen Experiment verwendet. Zunächst wurde N-Ethylmaleimid (NEM) für die Markierung der wasserzugänglichen Cysteinreste zu den Zellen *in vivo* gegeben, sodass alle oberflächenexponierten Cysteinreste reagieren konnten. Anschließend wurden die Zellen mit SDS permeabilisiert und die Proteine denaturiert. Vorher unzugängliche Reste wurden dadurch zugänglich und konnten mit dem zweiten Derivat Methoxy-Polyethylenglycolmaleimid (PEG-Mal) markiert werden. Da PEG-Mal ein Molekulargewicht von etwa 10 kDa aufweist, können PEG-Mal-markierte Proteine im SDS-Gel leicht von NEM-markierten Proteinen (Protein + 125 Da) unterschieden werden. Eine zusätzliche höhermolekulare Bande entsprach daher einem *in vivo* unzugänglichen Cysteinrest im Inneren des Proteins.

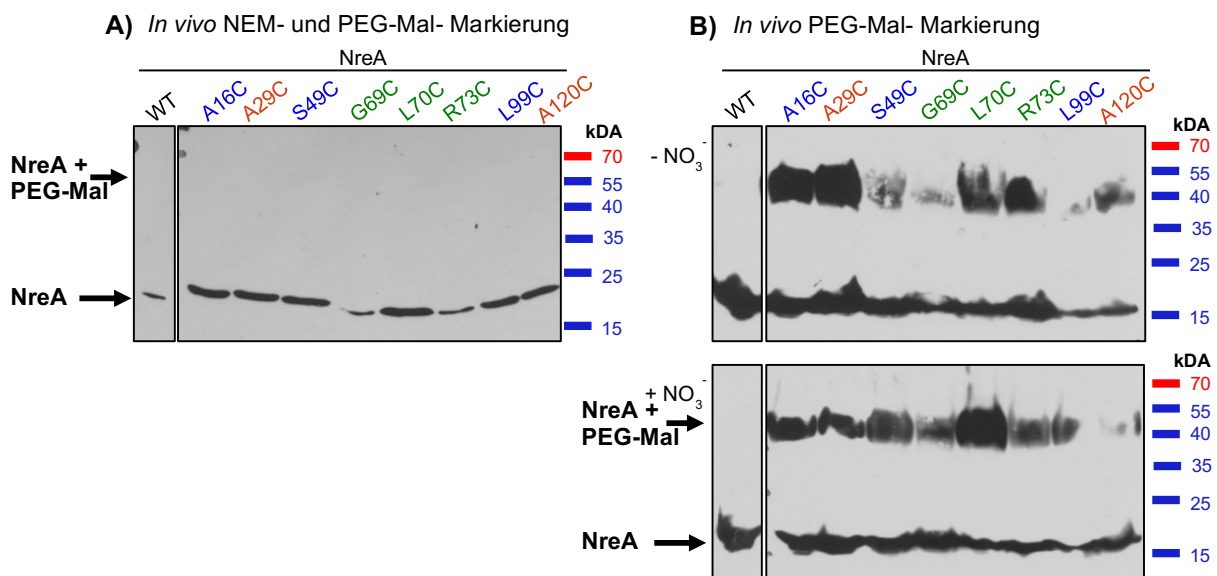


Abb. 39: Western Blots der *in vivo* Zugänglichkeitsstudien von NreA-Cysteinvarianten. A) zeigt die Ergebnisse der Zugänglichkeitsstudie mit NEM und anschließender PEG-Mal-Markierung, B) demonstriert die Ergebnisse des Kontrollversuchs ohne NEM-Markierung. Die Zellen des *E. coli* Stammes M15 wurden mit den Plasmiden der NreA-Cysteinvarianten transformiert und anaerob ohne Nitrat (oder mit 10 mM) gezüchtet. Anschließend erfolgte bei A) die Zugabe von 2 mM NEM für 1,5 h bei 25 °C. Nach dem Zellaufschluss sowie der Proteindenaturierung durch SDS wurde 5,5 mM PEG-Mal für ebenfalls 1,5 h bei 25 °C hinzugegeben. Durch Zugabe von SDS-Ladepuffer inkl. DTT wurde die Reaktion gestoppt und die Proteine direkt mittels SDS-Page aufgetrennt. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit dem spezifischen Antikörper

gegen NreA. Die Pfeile markieren das NreA-Monomer, sowie PEG-Mal markiertes NreA. Die Varianten A29C und A120C sind nicht-oberflächenexponierte Reste (nach Abb. 37, orange), während G69C, L70C sowie R73C innerhalb (nach Abb. 37, grün) und A16C, S49C und L99C außerhalb (nach Abb. 37, blau) der potentiellen Homodimerisierungsfläche lokalisiert sind.

Abb. 39A demonstriert die Ergebnisse der *in vivo* durchgeführten Zugänglichkeitsstudien mit NEM- und PEG-Mal-Markierung. Wildtypisches NreA zeigte die erwartete Monomerbande bei etwa 18 kDa aufgrund fehlender Cysteinreste. Alle getesteten Cysteinvarianten von NreA wiesen ebenfalls eine Monomerbande zwischen 15 und 25 kDa auf, unabhängig ihrer Lokalisation im Protein. Das Kontrollexperiment in Abb. 39B bestätigte, dass die eingefügten Cysteinreste mit PEG-Mal reagieren können. Neben dem Wildtyp wiesen alle NreA-Varianten eine Monomerbande auf. Zusätzlich zeigten die Cysteinvarianten eine Bande bei etwa 40 kDa. Die erwartete Größe von NreA und PEG-Mal betrug etwa 28 kDa, allerdings veränderte vermutlich die langkettige Struktur des PEG-Mals das Laufverhalten von markiertem NreA. In Abwesenheit von Nitrat konnten für die Varianten NreA(S49C), NreA(G69C), NreA(L99C) sowie NreA(A120C) nur eine schwache zusätzliche PEG-Mal-NreA-Bande detektiert werden. Die deutlichsten Banden waren bei NreA(A16C) und NreA(A29C) zu beobachten. Durch die Zugabe von Nitrat während der Zucht veränderte sich das Bandenmuster leicht. Die deutlichste zusätzliche Bande wurde für NreA(L70C) detektiert, wobei für NreA(L99C) sowie NreA(A120C) nur sehr schwache Banden zusehen waren. In Anwesenheit von Nitrat verstärkten sich die zusätzlichen Banden der NreA-Varianten S49C sowie G69C.

Abschließend lässt sich festhalten, dass alle NreA-Cysteinvarianten in den *in vivo* Zugänglichkeitsstudien mit NEM und PEG-Mal zugänglich waren. Allerdings lassen sich in den PEG-Mal-Studien in Abhängigkeit von Nitrat Unterschiede in der Zugänglichkeit der Varianten feststellen.

4.11 Bestimmung des Dimerisierungszustands von NreA-Varianten durch *in vitro* Gelfiltration

In den BACTH-Studien zur Homodimerisierung von NreA konnten Varianten in Cluster I identifiziert werden, die eine reduzierte Interaktion zeigten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Interaktionsmodell nach Abb. 33 modelliert. Die Homodimerisierung von NreA sollte mit einer weiteren unabhängigen Methode überprüft werden. Bei der Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) werden Moleküle aufgrund ihrer Größe über eine Trennsäule mit einem quervernetzten Polymerharz aufgetrennt. Große Moleküle sind nicht in der Lage in die Poren der stationären Phase einzudringen und eluieren deswegen schneller als kleine Moleküle. Die stationäre Phase der verwendeten Superdex75-Säule besteht aus einer vernetzten Agarose-Dextranstruktur.

Für die Gelfiltrationsstudien wurden die NreA-Varianten R21A, G69A, R73A sowie Y95A ausgewählt und mit dem Laufverhalten des Wildtyps verglichen. NreA(G69A) zeigte in den BACTH-Studien eine reduzierte Homodimerisierung. In direkter Umgebung sind NreA(R73A) sowie NreA(Y95A) lokalisiert, wobei beide eine wildtypische Interaktion in der NreA/NreA-Dimerisierung im BACTH-Test aufwiesen.

NreA(R21A) ist im Gegensatz dazu auf der gegenüberliegenden Seite der NreA-Oberfläche in Cluster II zu finden und war in der NreA/NreB-BACTH-Interaktion reduziert.

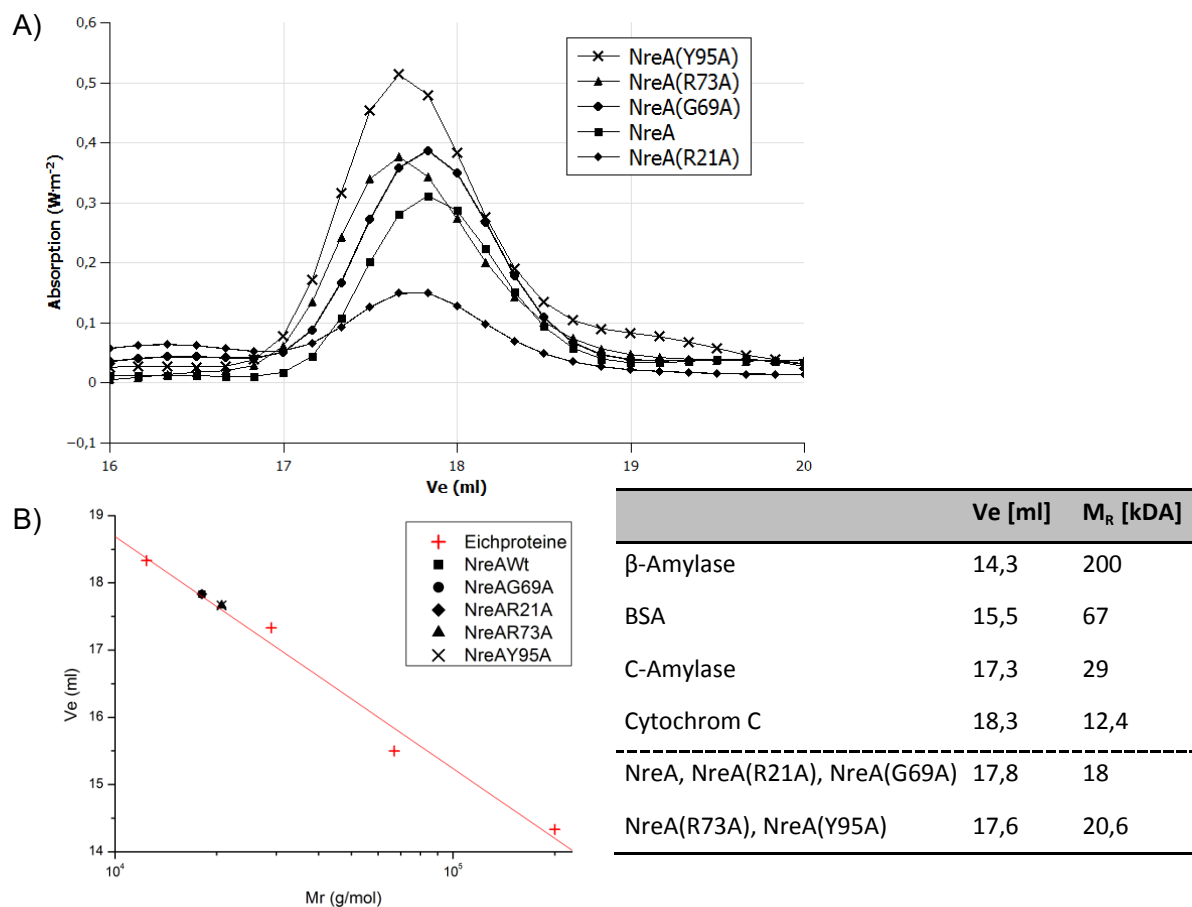


Abb. 40: Gelfiltration von NreA und NreA-Varianten. A) zeigt das Elutionsprofil von NreA und NreA-Varianten, B) bildet die aus den Retentionszeiten und Molekulargewichten der Eichproteine ermittelte Eichgerade $y = 32,4849 + (-3,44947) \cdot 10^x$ ($R = -0,99$) ab sowie die Retentionszeiten der NreA-Varianten und die aus der Eichgerade errechneten Molekulargewichte. Als Eichproteine dienten β-Amylase, BSA, C-Amylase und Cytochrom C. Die Retentionszeit ist äquivalent zum Elutionsvolumen V_e . Die Superdex75-Säule weist ein Bettvolumen von 24 ml mit einer Höhe von 300 mm und einem Durchmesser von 10 mm auf, die Auftrennung erfolgte mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Abb. 40A verdeutlicht, dass sowohl wildtypisches NreA als auch die getesteten NreA-Varianten ein sehr ähnliches Elutionsprofil aufwiesen und bei 17,6 bzw. 17,8 ml eluierten. Anhand der Retentionszeiten der Eichproteine mit bekanntem Molekulargewicht wurde die Eichgerade erstellt (Abb. 40B). Das errechnete Molekulargewicht von NreA und Varianten betrug 18 bzw. 20,6 kDa und entspricht demnach der theoretischen Größe eines NreA-Monomers von 18 kDa. Die Mutationen der NreA-Varianten hatten keinen großen Einfluss auf das Elutionsverhalten, wobei NreA(R73A) und NreA(Y95A) 0,2 ml früher eluierten. Sowohl NreA-Wildtyp als auch die Varianten liegen im isolierten Zustand als Monomer vor.

5 Diskussion

Der Diskussionsenteil gliedert sich in zwei unabhängige Teile. Zunächst werden die Ergebnisse zur Untersuchung der phylogenetischen Verteilung der [Fe-S]-haltigen O₂-Sensoren diskutiert. Darauf folgt der Diskussionsenteil über die Interaktionsstudien des O₂-Sensors NreB und dem Nitratsensor NreA aus *S. carnosus*.

Der Transkriptionsfaktor FNR aus *E. coli* und *B. subtilis*, die Sensorkinase NreB aus *S. aureus* und der Transkriptionsfaktor WhiB3 aus *M. tuberculosis* agieren mit einem [4Fe-4S]-Cluster als direkte Sauerstoff- bzw. Redoxsensoren und zeigen eine ähnliche Clusterdegradation bei Exposition mit Sauerstoff oder anderen redox-aktiven Molekülen. Allerdings regulieren die Sensoren unterschiedliche Zielgene und zeigen unterschiedliche Wirkungsmechanismen. Mit Hilfe der vorliegenden bioinformatischen Studien sollte geklärt werden, ob die [Fe-S]-haltigen Sensoren unabhängig voneinander entstanden sind oder ob sie einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Des Weiteren sollte deren phylogenetische Verteilung analysiert werden. Es wurde bereits postuliert, dass FNR_{Ec} und FNR_{Bs} aufgrund der Ähnlichkeiten im strukturellen Aufbau der Proteine vom globalen Genregulator CRP abstammen könnten (Shaw *et al.*, 1983; Cruz Ramos *et al.*, 1995). Mittels Sequenzvergleichen konnten für jeden Sensor homologe Proteine identifiziert werden, die anschließend auf das Vorhandensein der konservierten Cluster-Bindemotive hin untersucht wurden.

5.1 FNR aus *E. coli* – Sauerstoffsensoren der Proteobakterien

FNR fungiert in *E. coli* als Hauptregulator in der Umstellung von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel. Neben der Aktivierung von anaeroben Genen für z.B. die Nitrat- und Fumaratatmung werden auch einige aerobe Gene durch FNR_{Ec} reprimiert. Über vier konservierte Cysteinreste koordiniert FNR_{Ec} N-terminal ein [4Fe-4S]²⁺-Cluster, welches FNR_{Ec} als direkten Sauerstoffsensoren befähigt (Melville & Gunsalus, 1990; Green *et al.*, 1993; Khoroshilova *et al.*, 1995; Kiley & Beinert, 1998; Crack *et al.*, 2008; Salmon *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der BLAST-Suche verdeutlichen die Dominanz von FNR_{Ec} in α -, β - und γ -Proteobakterien und deuten auf einen einzigen Ursprung hin. Des Weiteren wird die Wichtigkeit von FNR_{Ec} durch die hohe Anzahl von Homologen innerhalb der Proteobakterien untermauert. Allerdings sind keine FNR_{Ec}-Homologen in δ - und ϵ -Proteobakterien identifiziert worden. δ -Proteobakterien unterteilen sich in die strikt aeroben Myxobakterien sowie die strikt anaeroben Sulfatreduzierer, die demnach keinen FNR-ähnlichen O₂-Sensor benötigen. Spezies der ϵ -Proteobakterien hingegen weisen einen vielseitigen Energiestoffwechsel auf, der auch die anaerobe Nitratatmung einschließt (Campbell *et al.*, 2006). Die Regulation des Nitrat- bzw. NO-Stress in *Wolinella* und *Campylobacter* wird durch einen CRP-FNR-ähnlichen Transkriptionsfaktor NssR (NO stressing)

regulator) kontrolliert, während FNR als Regulator vollständig fehlt (Elders *et al.*, 2005; Kern & Simon, 2016).

Der Großteil der in der *BLAST*-Suche identifizierten Homologen besitzt das essentielle Bindemotiv für die [Fe-S]-Cluster-Koordination, bestehend aus vier konservierten Cysteinresten. Einigen Varianten fehlen ein oder mehrere Cysteinreste des Motivs, sie werden entsprechend als 3Cys-, 2Cys-, 1Cys- und 0Cys-Varianten von FNR_{Ec} bezeichnet. Diese Varianten sind verstreut über den gesamten Stammbaum zu finden, was auf einen unabhängigen Verlust der Cysteinreste hindeutet. Funktionelle Studien existieren allerdings nur zu FNR_{Ec}-Homologen mit vollständigem Cluster-Bindemotiv sowie zu Homologen ohne [Fe-S]-Cluster (0Cys).

5.1.1 4Cys- und 0Cys-Homologe von FNR_{Ec}

FNR_{Ec} gehört zur Superfamilie der CRP-FNR-Transkriptionsfaktoren, die sich basierend auf ihren Sequenzähnlichkeiten und funktioneller Unterschiede in drei Klassen untergliedern lässt. Klasse I beinhaltet FNR_{Ec} und ähnliche Proteine aus Proteobakterien, die alle eine funktionelle Rolle in der O₂-Kontrolle diverser zellulärer Prozesse einnehmen. In Klasse II sind CRP aus *E. coli* und CRP-ähnliche Proteine aus anderen Bakterien zu finden, während Klasse III Proteine aus Cyanobakterien enthält, die in der Regulation des Stickstoff- und Schwefelstoffwechsels involviert sind (Shaw *et al.*, 1983; Fischer, 1994; Korner *et al.*, 2003). Die FNR-Proteine aus Klasse I lassen sich anhand des Cysteincluster-Bindemotivs weiter unterteilen. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht von FNR_{Ec}-ähnlichen Regulatoren der Klasse I, die in der *BLAST*-Suche ebenfalls identifiziert werden konnten.

FNR_{Ec} und Homologe aus anderen γ - oder β -Proteobakterien besitzen das konservierte Cluster-Bindemotiv C-X₂-C-X₅-C-X₉₂-C, welches essentiell für die Koordination des [Fe-S]-Clusters ist und repräsentieren 57 % aller identifizierten Homologen. Sie bilden Klasse IA der FNR-Regulatoren und spielen vor allem in der Regulation des anaeroben Stoffwechsels eine Rolle. In einigen pathogenen Arten regulieren FNR-ähnliche Proteine der Klasse IA auch verschiedene Virulenzgene (Tabelle 6).

Klasse IB beinhaltet FNR_{Ec}-Homologe aus α -Proteobakterien, die allerdings ein leicht verändertes *Spacing* des Cluster-Bindemotivs aufweisen (C-X₂₋₃-C-X₇-C-X₈₇-C). Trotz fehlender Studien zur Biochemie der O₂-Wahrnehmung, ist es dennoch wahrscheinlich, dass diese Proteine ebenfalls ein [4Fe-4S]-Cluster binden und ebenso eine Rolle als direkter O₂-Sensor in der Regulation des anaeroben Stoffwechsels (N₂-Atmung, N-Fixierung und Photosynthese) einnehmen können (Tabelle 6). FNR_{Ec}-Proteine der Gattung *Xanthomonas* besitzen trotz ihrer Zugehörigkeit zu γ -Proteobakterien ebenfalls das Cystein-*Spacing* der Klasse IB, jedoch fehlen funktionelle Studien zu diesen Proteinen. Der Anteil der Klasse IB-Homologen beträgt insgesamt 17 %.

Tabelle 6: FNR_{Ec}-Homologe der FNR-CRP-Familie und deren Funktion oder regulierte Gene. Die Homologen sind basierend auf ihrem Cysteinmotiv in drei Klassen unterteilt. β= β-Proteobakterien.

Klasse IA C-X ₂ -C-X ₅ -C-X ₉₂ -C			
Protein	Spezies	Funktion oder regulierte Gene/Proteine	Referenz
FNR	<i>E. coli</i>	Anaerobe Atmung	(Guest, 1995; Kiley & Beinert, 1998; Salmon <i>et al.</i> , 2003)
EtrA	<i>Sh. oneidensis</i>	Anaerobe Atmung	(Beliaev <i>et al.</i> , 2002; Cruz-Garcia <i>et al.</i> , 2011)
Fnr	<i>Ne. meningitis</i> , (β) <i>Ne. gonorrhoeae</i>	Anaerobe Atmung, Gärung	(Bartolini <i>et al.</i> , 2006; Whitehead <i>et al.</i> , 2007; Edwards <i>et al.</i> , 2010)
Fnr	<i>Shi. flexneri</i>	Anaerobe Atmung, Virulenzgene	(Vergara-Irigaray <i>et al.</i> , 2014)
HlyX	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Anaerobe Atmung, Virulenzgene, Persistenz	(Green & Baldwin, 1997; Buettner <i>et al.</i> , 2009)
Btr	<i>Bo. pertussis</i> (β)	Anaerobes Wachstum, Virulenzgene	(Bannan <i>et al.</i> , 1993; Wood <i>et al.</i> , 1998)
Anr	<i>Bh. cenocepacia</i> (β)	Virulenzgene, Anaerobe Atmung	(Sass <i>et al.</i> , 2013)
Anr	<i>Ps. putida</i>	Terminale Oxidasen	(Ugidos <i>et al.</i> , 2008; Ibrahim <i>et al.</i> , 2015)
Anr	<i>Ps. aeruginosa</i>	Nitrifikation, DNR, Arginin-Deiminase, Cyanid-Produktion	(Galimand <i>et al.</i> , 1991; Ye <i>et al.</i> , 1995; Arai <i>et al.</i> , 1997)
FnrA	<i>Ps. stutzeri</i>	Arginin-Katabolismus, Terminale Oxidasen	(Vollack <i>et al.</i> , 1999)
Fnr	<i>K. pneumoniae</i>	N-Fixierung	(Grabbe <i>et al.</i> , 2001)
Cydr	<i>Azb. vinelandii</i>	Cytochrom d Oxidase	(Wu <i>et al.</i> , 2000)
Klasse IB C-X _{2.3} -C-X ₇ -C-X ₈₇ -C			
Protein	Spezies	Funktion oder regulierte Gene/Proteine	Referenz
FixK1	<i>Br. japonicum</i>	unbekannt	(Anthamatten <i>et al.</i> , 1992; Nellen-Anthamatten <i>et al.</i> , 1998)
AadR	<i>Rp. palustris</i>	Anaerobes Wachstum auf Hydroxybenzoat	(Dispensa <i>et al.</i> , 1992)
FnrN	<i>R. leguminosarium</i>	N-Fixierung	(Colonna-Romano <i>et al.</i> , 1990; Schluter <i>et al.</i> , 1992)
FnrL	<i>Rb. capsulatus</i> , <i>Rb. sphaeroides</i>	Photosynthese	(Kumka & Bauer, 2015; Oh <i>et al.</i> , 2000)
Klasse IC kein Cysteinmotiv			
Protein	Spezies	Funktion oder regulierte Gene/Proteine	Referenz
FixK2	<i>Br. japonicum</i>	Nitratatmung, Expression <i>fix</i> -Gene	(Nellen-Anthamatten <i>et al.</i> , 1998)
FixK	<i>Rp. palustris</i>	Mikroaerobes Wachstum, Photosynthese-Wachstum	(Rey & Harwood, 2010)
FixK	<i>R. meliloti</i>	Expression <i>fix</i> -Gene, <i>nifA</i> -Gen	(Batut <i>et al.</i> , 1989)
FixK	<i>Azr. caulinodans</i>	Expression <i>fix</i> -Gene, <i>nifA</i> -Gen	(Kaminski <i>et al.</i> , 1991)

Die FixK-Proteine der Klasse IC lassen sich durch das Fehlen des Cysteinclusters charakterisieren. Sie verkörpern elf Prozent aller FNR_{EC}-Homologen. FixK-Proteine sind direkt oder indirekt am Prozess der N-Fixierung der Rhizobien sowie der Nitratatmung unter anaeroben Bedingungen beteiligt (Tabelle 6). Aufgrund des fehlenden [Fe-S]-Clusters partizipieren sie nicht direkt an der O₂-Wahrnehmung, sondern sind Teil einer O₂-sensitiven Kaskade. In *Bradyrhizobium japonicum* aktiviert das O₂-sensitive ZKS FixL-FixJ unter anaeroben Bedingungen die Expression von FixK2 (OCys), welches wiederum die Gene der Nitratatmung und die Gene der N-Fixierung inklusive des O₂-sensitiven Proteins FixK1 (4Cys) aktiviert. Die hierarchische Organisation der verschiedenen O₂-Regulatoren deutet auf eine unterschiedliche Sensitivität hin, um eine stringente Kontrolle der zellulären Prozesse und somit eine optimale Anpassung zu gewährleisten (Anthamatten *et al.*, 1992; Nellen-Anthamatten *et al.*, 1998; Batut & Boistard, 1994). *Rhizobium meliloti* hingegen besitzt nur ein FixK Protein, welches ebenfalls durch FixL-FixJ reguliert wird und die Expression der *fix*-Gene induziert (Batut *et al.*, 1989; Fischer, 1994). Die Spezies der α -Proteobakterien in denen die OCys-Varianten identifiziert wurden, gehören alle zu den Rhizobien. Demnach handelt es sich bei diesen Varianten um FixK-Proteine, die zwar kein [Fe-S]-Cluster besitzen, dennoch eine große Ähnlichkeit zu FNR_{EC} aufweisen und eine indirekte Rolle innerhalb der O₂-Wahrnehmung einnehmen.

Das Vorhandensein von mehreren FNR_{EC}-ähnlichen Proteinen in einer Spezies ist nicht nur auf Vertreter der Rhizobien wie z.B. *Br. japonicum* limitiert, sondern kann auch in anderen Proteobakterien beobachtet werden (Korner *et al.*, 2003). In *Pseudomonas putida* gibt es drei FNR-ähnliche Proteine, die alle ein [4Fe-4S]-Cluster koordinieren. Allerdings variiert die Aminosäuresequenz um die Clusterkoordinierenden Cysteinreste, was zu einer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber O₂ führt. Das Anr Protein ist in seiner Sensitivität äquivalent zu FNR_{EC} (Ibrahim *et al.*, 2015) und ist deswegen auch als Homolog identifiziert worden. In *Ps. aeruginosa* und *Ps. stutzeri* sind zwei bzw. vier FNR_{EC}-ähnliche Proteine vorhanden, wovon aber nur Anr bzw. FnrA klassische FNR_{EC}-Homologe mit [Fe-S]-Cluster darstellen (Tabelle 6). Bei den anderen FNR_{EC}-ähnlichen Proteinen handelt es sich um die NO-Sensoren DNR (Dissimilatorischer Nitratreduktase Regulator), die kein [Fe-S]-Cluster besitzen und die Gene der Denitrifikation regulieren (Galimand *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1995; Arai *et al.*, 1997; Vollack *et al.*, 1999). Sie zählen ebenfalls zur CRP-FNR-Familie (Zumft, 2002; Korner *et al.*, 2003) und sind im Gegensatz zu den FixK-Proteinen in der BLAST-Suche dieser Arbeit nicht detektiert worden, vermutlich aufgrund niedrigerer Ähnlichkeit.

FNR_{EC}-ähnliche Proteine mit Cluster-Bindemotiv wurden auch in Nicht-Proteobakterien wie Clostridia, Spirochaetes und *Nitrospira defluvii* identifiziert. Das Spacing des Cluster-Bindemotivs dieser Proteine unterscheidet sich leicht, sowohl von dem FNR_{EC}-typischen Motiv als auch von dem Motiv der α -Proteobakterien. Während *Ns. defluvii* in der Lage ist mit Nitrat zu wachsen und je nach O₂-Gehalt entweder Nitrit oxidiert oder Nitrat reduziert (Lucker *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2015), handelt es sich

bei den anderen Bakterien um strikt anaerobe Organismen. Den teilweise jedoch O₂-toleranten Spezies der Spirochaetes und Clostridia fehlen die Gene der Nitratreduktase (Nascimento *et al.*, 2004; Ritalahti *et al.*, 2012; Shimizu *et al.*, 2002; Fonknechten *et al.*, 2010; Raedts *et al.*, 2014) und sind bis auf *Desulfitobacterium hafniense* nicht fähig auf Nitrat zu wachsen (Kim *et al.*, 2012). Funktionelle Studien zu FNR_{Ec}-ähnlichen Proteinen in diesen Nicht-Proteobakterien fehlen. Vor allem für *Ns. defluvii* ist jedoch aufgrund der fakultativ anaeroben Lebensweise eine Rolle für FNR als O₂-wahrnehmender Transkriptionsfaktor denkbar.

Neben den drei Hauptklassen der FNR-CRP-Familie (Fnr, Crp, NtcA) existieren noch weitere Transkriptionsfaktoren, die kleinere Gruppen innerhalb der Superfamilie bilden. Dazu zählen z.B. die Flp- (Fnr-like protein) Proteine, die zwei reaktive Cysteinreste besitzen (Vgl. Kapitel 5.1.3, 2Cys). In den phylogenetischen Studien von Körner und Kollegen wurden die hier identifizierten 4Cys-Varianten aus *Clostridium perfringens* und *D. hafniense* der Gruppe der Flp-Proteine zugeordnet und nicht den klassischen FNR-Regulatoren (Korner *et al.*, 2003). Die Sequenzidentität zwischen Flp aus *Lactococcus lactis* und den Varianten liegt bei 28 bzw. 26 % und zwischen FNR_{Ec} und den Varianten ist sie ebenso hoch. Allein auf Sequenzbasis ist eine Aussage zur Funktion und zum Regulationsmechanismus der Proteine nicht möglich. In den verschiedenen Clostridien-Spezies sind auch FNR_{Bs}-homologe Proteine identifiziert worden, was auf eine unabhängige Entstehung der beiden FNR-Typen hindeutet.

5.1.1.1 0Cys-Varianten außerhalb der Rhizobien

Neben den 0Cys-Varianten der α -Proteobakterien, die als FixK-Proteine identifiziert wurden, gibt es auch zwei FNR_{Ec}-ähnliche Proteine ohne Cluster-Bindemotiv innerhalb der β - und δ -Proteobakterien. Zusätzlich zur 0Cys-Variante in *Burkholderia xenovorans* (β -Proteobakterien) sind in anderen *Burkholderia*-Spezies (früher *Pseudomonas*) hauptsächlich FNR_{Ec}-Homologe mit Cluster-Bindemotiv detektiert worden. Diese Spezies besitzen wie Pseudomonaden multiple Anzahlen an FNR_{Ec}-ähnlichen Proteinen und die Nitratatmungsgene (Yabuuchi *et al.*, 1992; Romero-Silva *et al.*, 2013; Andreae *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2015). Anaerobe Gene sowie einige Virulenzgene weisen ANR- und FNR-ähnliche Bindesequenzen auf (Sass *et al.*, 2013), was für eine Funktion ähnlich der von Anr aus *Pseudomonas* spricht (Tabelle 6). Bei der 0Cys-Variante könnte es sich demnach um ein DNR-ähnliches Protein handeln. Allerdings wurden keine weiteren DNR-Proteine, aufgrund mangelnder Ähnlichkeiten, detektiert. Aufgrund der direkten Nachbarschaft im Stammbaum der 0Cys-Variante aus *Bh. xenovorans* zu den FixK-Proteinen der Rhizobien und der Fähigkeit von *Burkholderia*-Arten ebenso wie *Rp. palustris* auf Hydroxybenzoat zu wachsen, handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um ein FixK-Protein.

In δ -Proteobakterien konnten bis auf die 0Cys-Variante aus *Desulfomicrobium baculatum* keine FNR-ähnlichen Proteine identifiziert werden. *Desulfovibrio vulgaris* besitzt vier Regulatoren der CRP-FNR-

Familie, bei denen es sich allerdings um CRP-Ähnliche handelt (Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012). *De. baculatum* fehlen die Gene der Nitratatmung sowie der N-Fixierung (Copeland *et al.*, 2009) und die Sequenzidentität mit FixK aus *R. meliloti* beträgt lediglich 24 %. Demnach ist es vorstellbar, dass es sich bei der OCys-Variante ebenso um einen CRP-ähnlichen Regulator handelt. Die Lokalisation des Proteins am diversen Ast außerhalb der Proteobakterien untermauert diese Hypothese.

5.1.2 1Cys-Varianten von FNR_{Ec} – FNR-homologer Redox-Switch?

Die identifizierten 1Cys-Varianten lassen sich grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilen (Tabelle 7). Einerseits sind das Varianten mit einer N-terminal verkürzten Sequenz und großer Ähnlichkeit zu FNR_{Ec}. Andererseits gibt es die 1Cys-Varianten, die keine N-terminale Verkürzung aufweisen und entweder einen zu C1 oder C3 homologen Cysteinrest besitzen. Zu diesen FNR_{Ec}-Varianten gibt es bislang keine funktionellen Studien. Grundsätzlich sind die meisten dieser Bakterien in der Lage anaeroben bzw. mikroaeroben Stoffwechsel zu betreiben (Tabelle 7), was für eine funktionelle Rolle von FNR_{Ec}-ähnlichen Regulatoren spricht. Die Existenz eines zusätzlichen, FNR_{Ec}-ähnlichen Proteins mit vollständigem Cluster-Bindemotiv deutet auf eine unterschiedliche Funktion der beiden Proteinformen hin.

Tabelle 7: Übersicht der Spezies mit 1Cys-Varianten von FNR_{Ec} und deren Stoffwechseleigenschaften. Angegeben sind der konservierte Cysteinrest sowie das Vorhandensein von zusätzlich identifizierten Homologen in den Spezies. Die Zugehörigkeit der Spezies zur entsprechenden Proteobakterien-Klasse ist durch α , β und γ gegeben.

Spezies	1Cys-FNR	Zusätzl. Homolog	Stoffwechseleigenschaften	Referenz
<i>Klebsiella</i> (γ)	C4, verkürzt	4Cys	Fakultativ N ₂ , N-Fixierung	(Grabbe <i>et al.</i> , 2001)
<i>Xanthomonas</i> (γ)	C4, verkürzt	4Cys	O ₂ , keine Nitratatmung; Pflanzenpathogen	(Van den Mooter & Swings, 1990)
<i>Alteromonas</i> (γ)	C4, verkürzt	4Cys	O ₂ , Keine Nitratatmung	(Math <i>et al.</i> , 2012)
<i>Rhodospirillum rubrum</i> (β)	C4, verkürzt	4Cys	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung	(Finneran <i>et al.</i> , 2003)
<i>Taylorella</i> (β)	C4, verkürzt	4Cys	O ₂ , keine Nitratatmung; pathogen	(Hebert <i>et al.</i> , 2012)
<i>Laribacter</i> (β)	C4, verkürzt	-	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung; pathogen	(Yuen <i>et al.</i> , 2001; Woo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Paracoccus</i> (α)	C4, verkürzt	-	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung	(Van Spanning <i>et al.</i> , 1997; Veldman <i>et al.</i> , 2006; Crack <i>et al.</i> , 2016)
<i>Hyphomicrobium</i> (α)	C4	4Cys	O ₂ , Nitratatmung	(Urakami <i>et al.</i> , 1995)
<i>Methylobacterium</i> (α)	C1	4Cys, 0Cys	O ₂ , Spezies mit u. ohne Nitratatmungsgene	(Jourand <i>et al.</i> , 2004)
<i>Opitutus</i>	C3	-	Strikt N ₂ , Gärung	(Chin <i>et al.</i> , 2001)

Im Allgemeinen weist die Konservierung eines einzelnen Cysteinrestes auf eine regulatorische Rolle beispielsweise als thiolbasierter Redox-Switch hin (Antelmann & Helmann, 2011; Hillion & Antelmann, 2015). Das Vorhandensein eines einzelnen redox-sensitiven Cysteinrestes im Peroxidsensor OhrR aus *B. subtilis* ist verantwortlich für die Inhibierung und Aktivierung des Ohr-Repressors. In Anwesenheit von Peroxidstress in Form von z.B. H_2O_2 wird der konservierte Rest Cys15 reversibel zu Cys-Sulfensäure oxidiert. In dieser Form ist OhrR inaktiv und die Expression von *ohrA* (Peroxid Resistenzgen) findet statt (Fuangthong & Helmann, 2002; Antelmann & Helmann, 2011; Green & Paget, 2004). Die Oxidation von OhrR durch Peroxidstress führt in *B. subtilis* nicht zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Monomeren, wie beispielsweise im OhrR-Homolog von *Xanthomonas campestris* (Panmanee *et al.*, 2006). Es ist demnach vorstellbar, dass die 1Cys-Homologen eine von [Fe-S]-haltigem FNR_{Ec} verschiedene Redoxregulation innerhalb der Bakterien einnehmen.

5.1.3 2Cys-Varianten von FNR_{Ec} – FNR-homologer Disulfid-Switch?

Basierend auf der Position und dem Abstand der beiden konservierten Cysteinreste unterteilen sich die 2Cys-Varianten in drei Gruppen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Spezies mit 2Cys-Varianten von FNR_{Ec} und deren Stoffwechseleigenschaften. Angegeben sind die konservierten Cysteinreste und deren *Spacing* sowie das Vorhandensein von zusätzlich identifizierten Homologen in den Spezies. Die Zugehörigkeit der Spezies zur entsprechenden Proteobakterien-Klasse ist durch α , β und γ gegeben.

Spezies	2Cys-FNR Spacing	Zusätzl. Homolog	Stoffwechseleigenschaften	Referenz
<i>Burkholderia</i> (β)	C3-x ₉₂ -C4, verkürzt	4Cys	O ₂ , Nitratatmung, pathogen	(Romero-Silva <i>et al.</i> , 2013; Sass <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pusillimonas</i> (β)	C3-x ₉₂ -C4, verkürzt	-	O ₂ , Nitratatmung	(Cao <i>et al.</i> , 2011)
<i>Azospirillum</i> (α)	C3-x ₉₂ -C4, verkürzt	4Cys	Mikro-O ₂ , N-Fixierung	(Tsagou <i>et al.</i> , 2003)
<i>Chromohalobacter</i> (γ)	C3-x ₉₂ -C4	4Cys	O ₂ , Nitratatmung	(Copeland <i>et al.</i> , 2011)
<i>Glaciecola</i> (γ)	C3-x ₉₂ -C4	4Cys	O ₂ , keine Nitratatmung	(Klippel <i>et al.</i> , 2011)
<i>Clostridium</i>	C2-x ₉₇ -C4	-	N ₂ , Gärung	(Petitdemange <i>et al.</i> , 1984)
<i>Odoribacter</i>	C2-x ₉₈ -C4	-	N ₂ , keine Nitratatmung	(Werner <i>et al.</i> , 1975; Goker <i>et al.</i> , 2011)
<i>Acholeplasma</i>	C2-x ₉₇ -C4	-	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung	(Lazarev <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptococcus</i>	C2-x ₉₇ -C4	-	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung, pathogen	(Ward <i>et al.</i> , 2009)
<i>Methylobacterium</i> (α)	C2-x ₅ -C3	4Cys, (0Cys)	O ₂ , ass. Nitratreduktion, Wachstum auf Methanol	(Laukel <i>et al.</i> , 2004)

Das sind erstens die Varianten der Proteobakterien mit einem *Spacing* von 92 AS. Diesen fehlen die Reste C1 und C2 des Cys-Clusters entweder aufgrund einer N-terminal verkürzten Sequenz (*Burkholderia*) oder aufgrund mangelnder Sequenzkonservierung (*Glaciecola*). Varianten der zweiten Gruppe weisen einen Abstand der Cysteinreste von 97 bzw. 98 AS auf, was den FNR_{Ec}-Resten C2 und C4 entspricht. Zu dieser Gruppe zählen nur Nicht-Proteobakterien, denen die Gene der Nitratatmung fehlen (Tabelle 8). Einige wenige Methylobakterien besitzen C2 und C3 des Cluster-Bindemotivs von FNR_{Ec} mit einem Abstand von fünf AS. Methylobakterien gehören allerdings zu den Rhizobien (Sy *et al.*, 2001), die ein *Spacing* von sieben AS zwischen den entsprechenden Cysteinresten aufweisen. Keine dieser 2Cys-Homologen wurde bisher funktionell untersucht, sodass unklar ist, ob es sich um O₂-sensitive Regulatoren handelt.

In Milchsäurebakterien gibt es FNR_{Ec}-ähnliche Proteine mit zwei redox-sensitiven Cysteinresten, welche ebenfalls zur FNR-CRP-Familie gehören (Korner *et al.*, 2003). FlpA aus *Lactococcus lactis* besitzt zwei Cysteinreste an Position 15 und 112 des Proteins, was einem *Spacing* von 96 AS entspricht. *In vitro* koordiniert das FlpA-Dimer ein O₂-sensitives [4Fe-4S]-Cluster (Gostick *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000). *Lactobacillus casei* verfügt über ein Flp-Protein mit zwei Cysteinresten (C5-x₉₆-C102), was 41 % identisch zu FlpA ist. Das konservierte Cysteinpaar formt intramolekulare Disulfidbrücken als Antwort auf oxidativen Stress und fungiert demnach als Redox-Switch (Gostick *et al.*, 1998). FlpS der pathogenen Spezies *Streptococcus suis* besitzt ebenfalls zwei reaktive Cysteinreste, die allerdings sowohl ein anderes *Spacing* als auch eine andere Position innerhalb des Proteins einnehmen (C129-x₃₇-C167). Die Aktivität von FlpS ist O₂-abhängig, allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus (Disulfidbrücke oder alternative [Fe-S]-Clusterliganden) unklar (Willenborg *et al.*, 2016). Generell regulieren die Flp-Proteine die oxidative Stressantwort, die Zinkaufnahme sowie die Gene des Arginin-Stoffwechsels. Keines der Flp-Proteine der Milchsäurebakterien ist in der BLAST-Suche detektiert worden, was an der geringen Sequenzidentität von z. B. lediglich 22 % zwischen FNR_{Ec} und Flp_{Lbc} liegt. Alle Studien der Flp-Proteine sind jedoch *in vitro* durchgeführt worden, sodass nicht klar ist, ob unter *in vivo* Bedingungen dieselben Regulationsmechanismen wirken.

Abgesehen von den Flp-Proteinen der Bacilli, sind auch in Bacteroidetes und Clostridia Regulatoren mit zwei reaktiven Cysteinresten bekannt. MalR der Gattung *Bacteroides* sowie CprK aus *Desulfitobacterium* (Clostridia) gehören ebenfalls zu den Transkriptionsfaktoren der FNR-CRP-Familie (Korner *et al.*, 2003), sind aber ebenso wie Flp aufgrund mangelnder Sequenzidentität nicht im Stammbaum vertreten. Die metabolische Nutzung von Maltotriose in *Bacteroides*-Spezies ist abhängig von MalR. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist unbekannt. Jedoch wird ein Disulfid-Switch mittels der beiden Cysteinreste vermutet (Cho *et al.*, 2001). CprK aus *Desulfitobacterium* reguliert die Gene der Halo-respiration und besitzt ein Cysteinpaar in einem Abstand von 188 AS (C11, C200). Durch O₂-

Exposition bilden sich intermolekulare Disulfide zwischen den beiden Monomeren, welche CprK inaktivieren (Levy *et al.*, 2008).

Aufgrund des vergleichbaren *Spacings* der identifizierten 2Cys-Varianten der Nicht-Proteobakterien (und Proteobakterien) sowie der Flp-Proteine, sind ähnliche Mechanismen oder verwandte Funktionen für die FNR_{EC}-Varianten denkbar.

5.1.4 3Cys-Varianten von FNR_{EC} – FNR-Homologe mit alternativen Liganden?

Es sind nur sehr wenige 3Cys-FNR_{EC}-Homologe in der BLAST-Suche identifiziert worden. Bis auf eine Ausnahme in *Acidithiobacillus* (γ -Proteobakterien) sind alle 3Cys-Varianten in Nicht-Proteobakterien (Bacteroidetes und Clostridia) zu finden (Tabelle 9). Allen Varianten fehlt der dritte Cysteinrest des Cluster-Bindemotivs. Dieser ist entweder durch Serin, Asparagin oder Prolin substituiert, wobei in einigen Fällen ein weiterer Cysteinrest einige Aminosäuren entfernt lokalisiert ist (Abb. 18). Viele der Spezies mit 3Cys-Homologen sind strikt aerob oder anaerob und betreiben keine anaerobe Atmung (Tabelle 9). Die identifizierten FNR_{EC}-ähnlichen Proteine sind weder funktionell noch biochemisch charakterisiert, sodass unklar ist ob es sich um [Fe-S]-haltige Proteine handelt und ob eine der Aminosäuren als alternativer Ligand für die Bindung des Clusters dienen könnte.

Tabelle 9: Spezies mit 3Cys-Varianten von FNR und deren Stoffwechseleigenschaften. Angegeben sind die konservierten Cysteinreste und deren *Spacing* sowie die Substitution des (fehlenden) C3-Rests. Die Zugehörigkeit der Spezies ist durch γ (Proteobakterien) und C (Clostridia) gegeben.

Spezies	3Cys-FNR <i>Spacing</i>	C3- Austausch	Stoffwechseleigenschaften	Referenz
<i>Acidithiobacillus</i> (γ)	C-X ₂ -C-X ₉₇ -C	S	Schwefel-Oxidation	(Valdes <i>et al.</i> , 2009)
<i>Alkaliphilus</i> (C)	C-X ₂ -C-X ₉₇ -C	P	N ₂ , Gärung, Arsenat-Atmung	(Fisher <i>et al.</i> , 2008)
<i>Marvirga</i>	C-X ₂ -C-X ₉₈ -C	S	Strikt O ₂ , keine Nitratatmung	(Pagani <i>et al.</i> , 2011)
<i>Fluviiculo</i>	C-X ₂ -C-X ₉₈ -C	S	Strikt O ₂ , keine Nitratatmung	(O'Sullivan <i>et al.</i> , 2005)
<i>Chitinophaga</i>	C-X ₂ -C-X ₉₈ -C	S	Strikt O ₂ , keine Nitratatmung	(Glavina Del Rio <i>et al.</i> , 2010)
<i>Muricauda</i>	C-X ₂ -C-X ₉₈ -C	N	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung	(Bruns <i>et al.</i> , 2001)
<i>Maribacter</i>	C-X ₂ -C-X ₉₈ -C	N	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung	(Oh <i>et al.</i> , 2011)

Serin ist Cystein sehr ähnlich. In der Oxidoreduktase DPOR aus *Rhodobacter capsulatus* konnte trotz Serinsubstitution eines Clusterliganden das [4Fe-4S]-Cluster koordiniert werden, jedoch war dieses Enzym nicht mehr aktiv (Muraki *et al.*, 2010). Prinzipiell sind Serinreste demnach in der Lage als Ligand eines [Fe-S]-Clusters zu fungieren. Allerdings gibt es keine Belege für natürlich vorkommende Serinliganden. Viele Studien inklusive einiger Kristallisationsstudien bestätigen Aspartat als häufigen alternativen [4Fe-4S]-Clusterliganden wie in FNR_{Bs} (Gruner *et al.*, 2011), in *Pyrococcus furiosus* Ferredoxin (Calzolari *et al.*, 1995) oder auch in NiFe-Hydrogenasen aus *Methanothermobacter*

marburgensis (Vitt *et al.*, 2014) und *Ralstonia eutropha* (Schafer *et al.*, 2016). Neben Aspartat kann auch ein Histidinrest als vierter Clusterligand dienen (Lubitz *et al.*, 2014). Die Rieske-Proteine koordinieren ihre [Fe-S]-Cluster über zwei Histidin- und zwei Cysteinreste und sind Redoxenzyme der Atmungskette (Davidson *et al.*, 1992; Schneider & Schmidt, 2005). Seltene alternative Clusterliganden sind Glutamin (Dobritzsch *et al.*, 2001), der Co-Faktor der radikalen SAM-Enzyme S-Adenosyl-L-Methionin (Layer *et al.*, 2005) oder auch ein Wassermolekül der Umgebung wie in der Aconitase (Lauble *et al.*, 1992; Beinert & Kennedy, 1989).

Die geringe Anzahl an 3Cys-Varianten von FNR_{Ec} innerhalb der Proteobakterien deutet darauf hin, dass sie keine generelle regulatorische und funktionelle Rolle für die Bakterien besitzen. In Bacteroidetes hingegen existieren keine FNR_{Ec}-Homologen mit vollständigem Cluster-Bindemotiv, sodass der Verlust der Cysteinreste aufgrund des nicht-existenten fakultativen Lebensstils mit einer fehlenden Notwendigkeit des [Fe-S]-Clusters einhergeht. Eventuell nehmen diese Proteine eine andere Rolle in der Redoxregulation ein wie z.B. in MalR die Ausbildung von Disulfidbrücken als Redox-Switch (Vgl. Kapitel 5.1.3). Eine Cluster-Koordination mit einem alternativen Liganden wie Serin kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.2 FNR aus *B. subtilis* – Sauerstoffsensor der Bacilli

FNR aus *B. subtilis* reguliert die Genexpression der anaeroben Nitratatmung (Cruz Ramos *et al.*, 1995; Reents *et al.*, 2006b; Hartig & Jahn, 2012). Im Gegensatz zu FNR_{Ec} wird das [4Fe-4S]-Cluster C-terminal über einen Aspartatrest und drei Cysteinreste koordiniert (Reents *et al.*, 2006a; Gruner *et al.*). FNR_{Bs} ist ebenfalls Teil der FNR-CRP-Familie, jedoch aufgrund der Lokalisierung der Cysteindomäne deutlich verschieden von FNR_{Ec} und bildet zusammen mit den Pathogenitätsfaktoren PrfA aus *Listeria*-Spezies eine eigene Untergruppe (Korner *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der BLAST-Suche verdeutlichen die Dominanz des Bazillus FNR-Typs innerhalb der Bacilli und innerhalb der Gattung *Bacillus*. Das Fehlen von homologen Proteinen in Proteobakterien unterstreicht die Spezialisierung des *B. subtilis*- bzw. *E. coli*- FNR-Typs innerhalb der entsprechenden Bakterien.

5.2.1 OCys-Varianten von FNR_{Bs} – CRP-ähnliche Transkriptionsfaktoren

Den als OCys-Varianten definierten Homologen fehlen aufgrund einer kürzeren Sequenz die C-terminale cysteintragende Domäne sowie oftmals auch der konservierte Aspartatrest. Die Proteine weisen aber eine große Ähnlichkeit innerhalb der DNA-Bindedomäne zu FNR_{Bs} auf. Datenbankrecherchen belegen eine Domäne, die ähnlich zur Nukleotid-Bindedomäne von CRP ist, sowie ein HTH-CRP-Typ-Motiv für die DNA-Bindung. Die meisten der OCys-Varianten sind in anaeroben Clostridien zu finden. Einzelne Varianten existieren in anaeroben Negativicutes sowie aeroben Actinobakterien und Bacteroidetes (Tabelle 10), wobei keines der Proteine bisher funktionell charakterisiert wurde. Aufgrund des fehlenden Cluster-Bindemotivs und des damit verbundenen

fehlenden [Fe-S]-Clusters sind diese Proteine nicht in der Lage, als direkte Sauerstoffsensoren zu agieren. Allerdings kann eine indirekte Rolle der Proteine in der O₂-Wahrnehmung analog zu der von FixK2 und FixK als FNR_{Ec}-Homologe (Vgl. Kapitel 5.1.1, Tabelle 6) nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 10: Übersicht einiger Spezies mit OCys-Varianten von FNR_{Bs} und deren Stoffwechseleigenschaften. Die Bakterienphyla sind wie folgt abgekürzt: Clostridia C, Actinobacteria A, Bacteroidetes B, Negativicutes N und Bacilli Bac. * markiert Varianten, die den konservierten Aspartatrest enthalten.

Spezies	Stoffwechseleigenschaften	Referenz
<i>Thermoanaerobacter/bacterium</i> spp (C)	N ₂ , Gärung; thermophil	(Xue <i>et al.</i> , 2001; Tan <i>et al.</i> , 2014)
<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	N ₂ , Gärung, Arsenatatmung	(Fisher <i>et al.</i> , 2008)
<i>Clostridium perfringens</i>	N ₂ , Gärung, O ₂ -tolerant	(Shimizu <i>et al.</i> , 2002; Rolfe <i>et al.</i> , 1978)
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	N ₂ , Gärung, O ₂ -tolerant, Nitratatmung	(Kim <i>et al.</i> , 2012)
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (A), *	Strikt O ₂ , kein N ₂ -Wachstum; thermophil	(Carreto <i>et al.</i> , 1996)
<i>Niastella koreensis</i> (B), *	Strikt O ₂ , keine Nitratatmung, keine Gärung	(Weon <i>et al.</i> , 2006)
<i>Veillonella parvula</i> (N), *	N ₂ , Gärung, Nitratatmung	(Gronow <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Bac), *	Fakultativ N ₂ , keine Pflanzenwachstumsförderung	(Ruckert <i>et al.</i> , 2011)

Obwohl Clostridien als strikt anaerob gelten, können sie kurze Phasen und teilweise niedrige Konzentrationen von Sauerstoff erdulden und das Wachstum anschließend unter anaeroben Bedingungen fortsetzen (Brioukhanov & Netrusov, 2007). Die Toleranz gegenüber Sauerstoff variiert dabei sehr. Es gibt einige Arten für die bereits 0,4 % O₂ tödlich sind, wohingegen andere Arten bis zu zehn Prozent O₂ überstehen (Brioukhanov & Netrusov, 2007; Imlay, 2008b) und sogar anaerobe Atmung betreiben können wie *D. hafniense* oder auch *V. parvula* (Tabelle 10). In solchen Vertretern sind Sensoren für O₂ oder reaktive O₂-Produkte sinnvoll und denkbar.

Die Sequenz des FNR_{Bs}-ähnlichen Proteins aus *N. koreensis* beinhaltet neben dem konservierten Aspartatrest auch das N-terminale Cluster-Bindemotiv des *E. coli*-FNRs. Es handelt sich bei diesem Protein um einen Hybrid aus *B. subtilis*- und *E. coli*-FNR mit einer höheren Sequenzidentität mit FNR_{Bs}. Ähnlich verhält es sich mit der OCys-Variante aus *C. perfringens*, wobei hier lediglich zwei der vier *E. coli*-Cluster-koordinierenden Cysteinreste konserviert sind. Das FNR_{Bs}-ähnliche Protein aus *B. amyloliquefaciens* DSM7 ist C-terminal stark verkürzt, was zum Fehlen der cysteintragenden Domäne führt. Andere *B. amyloliquefaciens* Stämme besitzen hingegen ein funktionales FNR_{Bs} mit vollständigem Cluster-Bindemotiv.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle FNR_{Bs}-ähnlichen OCys-Varianten entweder in anaeroben oder aeroben Bakterien identifiziert wurden und allen das für die O₂-Wahrnehmung wichtige [Fe-S]-Cluster fehlt. Es handelt sich bei diesen Proteinen demnach um keine direkten O₂-

Sensoren, sondern um Transkriptionsfaktoren der FNR-CRP-Familie mit unbekannter Funktion. Aus diesem Grund wurden die Proteine aus der überarbeiteten Matrix entfernt.

5.2.2 4Cys-Homologe von FNR_{B5} – Regulatoren von O₂-abhängigen Prozessen

Außer den 0Cys-Varianten enthielten alle FNR_{B5}-Homologen das vollständige Asp-Cys-Motiv, was die Notwendigkeit der O₂-Wahrnehmung durch FNR_{B5} für das Überleben der entsprechenden Bakterien verdeutlicht. Der Großteil der Homologen existiert in fakultativ anaeroben Bacilli. Zwei Ausnahmen stellen die anaeroben Clostridia- und Negativcutes-Spezies dar (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht von FNR_{B5}-Homologen mit vollständigem Cluster-Bindemotiv sowie deren Funktion, genetische Organisation oder Stoffwechseleigenschaften.

Spezies	Funktion/ regulierte Gene, genetische Organisation oder Stoffwechseleigenschaften	Referenz
<i>B. subtilis</i> (apathogen)	Anaerobe Nitratatmung, Genlokus mit <i>nar</i> -Gene, <i>arfM</i> , <i>narK-fnr</i>	(Nakano & Hulett, 1997; Reents <i>et al.</i> , 2006a; Reents <i>et al.</i> , 2006b; Gruner <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. licheniformis</i> (apathogen)	Anaerobe Nitratatmung, Genlokus mit <i>nar</i> -Gene, <i>arfM</i> , <i>narK-fnr</i>	(Klinger <i>et al.</i> , 1998; Rey <i>et al.</i> , 2004)
<i>B. cereus</i> (pathogen)	Katabolische Gene (Kohlenhydrat-abhängig), Glucose-Fermentation, Enterotoxine Hbl und Nhe, Genlokus mit <i>nar</i> -Genen, <i>fnr</i>	(Zigha <i>et al.</i> , 2007; Messaoudi <i>et al.</i> , 2010; Esbelin <i>et al.</i> , 2012)
<i>B. megaterium</i> , <i>B. selenitrireducens</i> (apathogen)	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung	(Eppinger <i>et al.</i> , 2011; Switzer Blum <i>et al.</i> , 1998)
<i>G. thermoglucosidasius</i> <i>G. thermoleovorans</i>	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, <i>nar</i> -Gene	(Muhd Sakaff <i>et al.</i> , 2012; Brumm <i>et al.</i> , 2015)
<i>G. thermodenitrificans</i>	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, Genlokus mit <i>nar</i> -Gene, <i>narK-fnr</i>	(Feng <i>et al.</i> , 2007)
<i>G. sp</i> (<i>Paenibacillus sp</i>)	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, keine N-Fixierung; <i>nar</i> -Gene mit <i>nreABC</i> co-lokalisiert	(Mead <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. terrae</i> , <i>P. polymyxa</i> , <i>P. mucilaginosus</i>	Fakultativ N ₂ , N-Fixierung, Pflanzenwachstumsfördernd; <i>nar</i> -Gene nicht co-lokalisiert	(Lal & Tabacchioni, 2009; Shin <i>et al.</i> , 2012; Xiao <i>et al.</i> , 2016)
<i>Exiguobacterium</i>	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2008)
<i>Anoxybacillus</i>	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung, Genlokus mit Genen des Argininstoffwechsels	(Saw <i>et al.</i> , 2008)
<i>Macrococcus</i> (apathogen)	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, <i>nar</i> -Gene mit <i>nreABC</i> co-lokalisiert	(Baba <i>et al.</i> , 2009)
<i>Staphylococcus</i> (pathogen)	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, <i>nar</i> -Gene mit <i>nreABC</i> co-lokalisiert	(Mullner <i>et al.</i> , 2008; Nilkens <i>et al.</i> , 2014)
<i>Clostridium</i> (pathogen)	N ₂ , O ₂ -tolerant, keine Nitratatmung	(Skarin <i>et al.</i> , 2011)
<i>Selenomonas</i> (apathogen)	N ₂ , Gärung, <i>nar</i> -Gene nicht co-lokalisiert	(Kaneko <i>et al.</i> , 2015)

FNR aus *Bacillus licheniformis* ist auf Nukleotidebene 85 % identisch (97 % ähnlich) und reguliert ebenfalls die Gene der Nitratatmung (Tabelle 11). Im Gegensatz zu *B. subtilis* und *B. licheniformis* ist FNR im pathogenen *Bacillus cereus* essentiell für die Expression von Schlüsselenzymen des Katabolismus und der Enterotoxine Hbl und Nhe sowie für die Glukosegärung. Außerdem unterscheidet sich sowohl die genetische Anordnung als auch die Autoregulation von FNR_{Bc} (Tabelle 11). Obwohl FNR_{Bc} ein ähnliches redox-sensitives [4Fe-4S]-Cluster aufweist, unterscheidet sich die AS-Sequenz um das konservierte Cluster-Bindemotiv, was die Sensorik beeinflussen kann. FNR_{Bc} agiert sowohl in der Holo- als auch in der Apo-Form als Aktivator der Enterotoxinproduktion (Eselin *et al.*, 2012), was einen weiteren Unterschied zu FNR_{Bs} bedeutet.

Abhängig von der jeweiligen *Bacillus*-Art kann FNR demnach einerseits als Sauerstoffsensoren agieren, der die anaerobe Nitratatmung in nicht-pathogenen Arten wie *B. subtilis* und *B. licheniformis* reguliert. Andererseits ist FNR in der Lage, wie im Pathogen *B. cereus*, als redox-sensitiver Sensor den Zentralstoffwechsel und die Enterotoxinproduktion als Antwort auf Umweltsignale des menschlichen Darms zu regulieren. Funktionelle Studien in anderen *Bacillus*-Arten fehlen. Es ist vorstellbar, dass FNR_{Bs}-Homologe in anderen pathogenen Arten wie *B. anthracis*, *B. thuringensis* und *B. cytotoxicus* ähnlich wie FNR_{Bc} fungieren. Im Stammbaum von FNR_{Bs} finden sich die FNR-Homologen aus pathogenen Arten zusammen gruppiert an einem Ast, was für eine geringe evolutionäre Distanz spricht und damit die Hypothese untermauert. Der zweite große *Bacillus*-Ast des Stammbaums beinhaltet die FNR_{Bs}-ähnlichen Proteine aus den nicht-pathogenen Arten und den Pflanzen-fördernden Rhizobakterien *B. amyloliquefaciens* und *B. sp* (Chen *et al.*, 2007; He *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012). Diese FNR_{Bs}-Homologe erfüllen wahrscheinlich die Aufgabe als O₂-sensitiver Hauptregulator der Nitratatmung wie in *B. subtilis*. *B. megaterium* und *B. selenitireducens* sind nicht-pathogen, betreiben keine Nitratatmung und sind keiner der beiden großen *Bacillus*-Gruppen zugeordnet. Eine mögliche dritte FNR-Regulation ist demnach möglich.

FNR_{Bs}-Homologen der Gattung *Geobacillus* betreiben Nitratatmung und weisen teilweise eine zu *B. subtilis* ähnliche genetische Organisation auf (Tabelle 11), was für eine Regulation der Nitratatmung durch FNR wie in *B. subtilis* spricht. Die fehlende Co-Lokalisierung der Gene der Nitratatmung mit den FNR_{Bs}-Homologen aus Paenibazillen spricht gegen eine zu FNR_{Bs} analoge Regulation. Sie leben fakultativ anaerob entweder frei im Boden oder pflanzenassoziiert und sind zur N-Fixierung befähigt. Die relevanten Gene könnten durch FNR_{Bs}-Homologe in O₂-Abhängigkeit reguliert werden. Interessanterweise besitzen *P. terrae*, *P. polymyxa* und *P. mucilaginosus* jeweils zwei FNR_{Bs}-ähnliche Proteine mit unterschiedlicher AS-Sequenz um das Cluster-Bindemotiv. Die Proteobakterien *Pseudomonas putida* und *Burkholderia spp* weisen jeweils multiple Anzahlen von FNR_{Ec}-ähnlichen Proteinen auf, die eine unterschiedliche O₂-Sensitivität besitzen. Die Expression von multiplen FNR-ähnlichen Proteinen ermöglicht die Wahrnehmung von Sauerstoff über ein großes

Konzentrationspektrum. In *Ps. putida* erfüllen die drei FNR_{EC}-ähnlichen Proteine unterschiedliche, aber dennoch überlappende Funktionen (Ibrahim *et al.*, 2015). Auch wenn die Gene, die durch die FNR_{BS}-ähnlichen Proteine der Paenibazillen reguliert werden, unbekannt sind, ist die Verwendung von zwei FNR-ähnlichen Proteinen mit unterschiedlicher O₂-Sensitivität denkbar.

FNR aus *Exiguobacterium sibiricum*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Macrococcus caseolyticus* und *Staphylococcus pseudintermedius* wurde bisher weder funktionell noch biochemisch charakterisiert. Während *Mc. caseolyticus* und *S. pseudintermedius* zwar Nitratatmung betreiben, wird diese jedoch durch den Sauerstoffsensor NreB und das NreABC-System reguliert (Tabelle 11; Vgl. Kapitel 5.3.3, Tabelle 12). *Ex. sibiricum* und *Ab. flavithermus* hingegen sind nicht in der Lage Nitrat zu verstoffwechseln und besitzen auch kein NreABC-System. In *Ab. flavithermus* ist das *fnr*-Gen mit Genen des Argininstoffwechsels co-lokalisiert, was auf eine mögliche Regulation von FNR hindeuten könnte.

Die Funktion von FNR_{BS} aus den beiden anaeroben Firmicutes-Spezies *Clostridium botulinum* und *Selenomonas ruminantium* ist unbekannt (Tabelle 11). Im Stammbaum sind sie in direkter Nachbarschaft mit *Staphylococcus* und *Exiguobacterium* angeordnet, deren Funktion ebenfalls unbekannt ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass sie nicht als FNR_{BS}-ähnliche O₂-Sensoren fungieren.

5.3 NreB aus *S. aureus* – Sauerstoffsensor der Staphylokokken

Die Sensorkinase NreB agiert mit dem [4Fe-4S]-Cluster als direkter Sauerstoffsensor und reguliert zusammen mit dem Nitratsensor NreA und dem Antwortregulator NreC die Expression der anaeroben Nitratatmung (Mullner *et al.*, 2008; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Die Gene des NreABC-Systems sind co-lokalisiert mit den für die Nitratatmung essentiellen Genen wie der Nitratreduktase (Fedtke *et al.*, 2002; Schlag *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der Homologensuche verdeutlichen die Dominanz von NreB innerhalb der Bacilli und noch spezifischer die Spezialisierung innerhalb der Staphylokokken. NreB koordiniert sein [Fe-4S]-Cluster über vier konservierte Cysteinreste in der N-terminalen PAS-Domäne, an die sich C-terminal die Kinasedomäne anschließt (Kamps *et al.*, 2004; Mullner *et al.*, 2008). Neben NreB-Homologen, die das vollständige Cluster-Bindemotiv aufweisen, konnten auch Proteine identifiziert werden, denen Teile oder gar das gesamte Motiv fehlen. Die Varianten sind hauptsächlich außerhalb der Bacilli detektiert worden, was auf NreB mit [Fe-S]-Cluster als „Urform“ hinweist, welche dann an andere Bakterien über lateralen Gentransfer übertragen wurden.

5.3.1 OCys-Varianten von NreB_{sa} – Sensorkinasen der HisKA_3 Familie

Die Sequenzvergleiche zwischen NreB und den OCys-Varianten zeigen lediglich Ähnlichkeiten innerhalb der Kinasedomänen und nicht in der sensorischen PAS-Domäne. Die Datenbankrecherche bestätigt die

Proteine als Histidinkinasen und auch der Sequenzvergleich verdeutlicht das Vorhandensein des DxxxQ-Motivs der HisKA_3 Sensorkinasen (Huynh *et al.*, 2010). Zu finden waren diese Varianten außerhalb der Bacilli sowohl in anaeroben Actinobakterien, Clostridien, Negativicutes, Spirochaetes als auch in fakultativ anaeroben γ - und β - Proteobakterien. Die identifizierten Proteobakterien *Shewanella piezotolerans* und *Rhodoferax ferrireducens* sind mit einem FNR_{Ec}-Homolog ausgestattet, welches den anaeroben Stoffwechsel in diesen Proteobakterien reguliert (Cruz-Garcia *et al.*, 2011). *Desulfitobacterium hafniense* (Clostridia) besitzt die *nar*-Gene für die Nitratreduktion (Nonaka *et al.*, 2006) sowie eine 0Cys-Variante von FNR_{Bs}. Beiden Proteinen fehlt jedoch das Cluster-Bindemotiv, sodass die Regulation der anaeroben Atmung unbekannt ist.

Die mangelnde Ähnlichkeit innerhalb der Cluster-koordinierenden PAS-Domäne wie auch das fehlende [Fe-S]-Cluster-Bindemotiv dieser Proteine lassen vermuten, dass es sich um falsch-positive BLAST-Treffer handelt. Wie auch NreB sind es zwar Sensorkinasen, jedoch spielen die Proteine keine Rolle in der direkten Sauerstoffwahrnehmung. Deswegen wurden die Varianten aus dem Alignment entfernt und ein neuer phylogenetischer Stammbaum konstruiert.

5.3.2 NreB_{Sa}-Homologe

Der neue Stammbaum enthält neben den NreB-Homologen der Bacilli mit Cys-Cluster auch Varianten mit reduzierter Cysteinanzahl außerhalb der Bacilli, was auf einen möglichen Gentransfer sowie Cysteinverlust hindeutet. Die Gruppierung aller NreB-Homologe mit vollständigem Cluster-Bindemotiv an einem Hauptast spiegelt die geringe evolutionäre Distanz wieder. Die Ausnahme stellt das Homolog aus *Brevibacillus brevis* dar, welches trotz seines vollständigen NreB Cluster-Bindemotivs mit den Cysteinvarianten am zweiten Hauptast lokalisiert ist.

5.3.3 4Cys-Homologe von NreB_{Sa} – Regulation der Nitratatmung

Die 4Cys-Homologen von NreB_{Sa} weisen alle das C-x₂-C-x₁₁-C-x₂-C *Spacing* des Cluster-Bindemotivs auf und sind lediglich in den Bacilli vertreten. Die meisten Homologen sind innerhalb verschiedener *S. aureus*-Stämme sowie weiteren pathogenen Arten und der nicht-pathogenen Spezies *S. carnosus* vorhanden, welche sich stark von den pathogenen Spezies unterscheidet (Rosenstein *et al.*, 2009). Funktionelle Studien zum NreABC-System und dessen Regulation wurden in *S. carnosus* durchgeführt (Fedtke *et al.*, 2002; Mullner *et al.*, 2008; Reinhart *et al.*, 2010; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen den *nreABC*-Genen aus *S. carnosus* und *S. aureus* wird eine ähnliche Funktion und Regulation des NreABC-Systems in *S. aureus* angenommen (Schlag *et al.*, 2008).

Tabelle 12: NreB_{sa}-Homologe mit vollständigem Cluster-Bindemotiv und deren für die Nitratatmung relevanten Gene sowie der Funktion oder Stoffwechseleigenschaften.

Spezies	Relevante Gene	Funktion/ Stoffwechseleigenschaften	Referenz
<i>S. aureus</i> (pathogen), <i>S. carnosus</i> (apathogen)	<i>nreABC, nar</i> -Gene	Anaerobe Nitratatmung	(Fedtke <i>et al.</i> , 2002; Schlag <i>et al.</i> , 2008; Mullner <i>et al.</i> , 2008; Nilkens <i>et al.</i> , 2014; Niemann <i>et al.</i> , 2014)
<i>Mc. caseolyticus</i>	<i>nreABC, nar</i> -Gene	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung	(Baba <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. clausii</i>	<i>nreABC, nar</i> -Gene	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung	(Kobayashi <i>et al.</i> , 1995; Mullner <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. sp</i>	GAF-Protein, LuxR-Regulator, <i>nar</i> -Gene	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, keine N-Fixierung	(Mead <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bb. brevis</i>	LuxR-Regulator	Fakultativ N ₂ , keine Nitratatmung	(Chen <i>et al.</i> , 2012)

Macrococcus caseolyticus gilt als nächster Verwandter der Staphylokokken und weist ebenso wie *Bacillus clausii* und Spezies der Paenibazillen die Präsenz und gleiche genetische Organisation der *nreABC*- und *nar*-Gene auf. Des Weiteren sind diese Spezies in der Lage Nitratatmung zu betreiben (Tabelle 12). In *B. clausii* existiert im Gegensatz zu anderen Spezies der Gattung *Bacillus* kein FNR, sodass die anaerobe Atmung durch NreABC reguliert wird (Kobayashi *et al.*, 1995; Mullner *et al.*, 2008). Abgesehen von *B. clausii* und den Staphylokokken besitzen die Spezies zusätzlich ein FNR_{B_s}-Homolog, allerdings ist das entsprechende *fnr*-Gen nicht in der Nähe der Nitratreduktasegene lokalisiert, was eher für eine anaerobe Regulation der Nitratatmung durch NreABC statt FNR spricht. Die direkte Nachbarschaft von NreB-Homologen aus *P. sp* und *B. clausii* im Stammbaum verdeutlicht die geringe evolutionäre Distanz und untermauert ebenso die Funktion von NreABC als Hauptregulator der Nitratatmung in beiden Spezies.

Brevibacillus brevis gehört zur Familie der Paenibacillaceae und weist lediglich einen LuxR-Regulator auf, dessen Gen mit dem des NreB-Homologs co-lokalisiert ist. Das LuxR-Protein könnte in der Funktion homolog zu NreC sein. Das NreB-Homolog sowie die gesamte NreABC-Ausstattung aus *Bb. brevis* unterscheiden sich stark von der Referenz aus *S. aureus* (Tabelle 12). Dies wird durch die Anordnung des Homologes am zweiten Hauptast (zusammen mit den NreB-Varianten) und einer damit verbundenen größeren evolutionären Distanz zu NreB_{sa} verdeutlicht. Funktionelle Studien zu diesem NreB-Homolog fehlen ebenso wie Studien zum zusätzlichen FNR_{B_s}-Homolog.

5.3.4 3Cys-Varianten von NreB_{sa} – alternative Funktion außerhalb der Nitratreulation?

In *Thermus thermophilus* und *T. sp* konnten NreB-Homologe identifiziert werden, bei denen jeweils der erste Cysteinrest des Cluster-Bindemotivs durch Isoleucin und Valin ersetzt ist und sich der Abstand

zwischen C2 und C3 des Bindemotivs unterscheidet. Die Bakterien sind obligat aerob, sie zeigen kein anaerobes Wachstum und besitzen keine Nitratreduktase (Henne *et al.*, 2004). Isoleucin und Valin sind selbst nicht in der Lage FeS-Zentren zu ligandieren. Viele Studien inklusive Kristallisationsstudien bestätigen Aspartat als alternativen Liganden für FeS-Zentren (Calzolari *et al.*, 1995; Muraki *et al.*, 2010; Gruner *et al.*, 2011; Vitt *et al.*, 2014; Schafer *et al.*, 2016). Außerdem können ein oder zwei Histidinreste als Liganden genutzt werden (Davidson *et al.*, 1992; Schneider & Schmidt, 2005; Lubitz *et al.*, 2014). Die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase der Schweineleber ist der *E. coli* Fumaratreduktase ähnlich und koordiniert eines der vier [Fe-S]-Cluster über drei Cysteinreste und einen Glutaminrest (Dobritzsch *et al.*, 2001). Der Sequenzvergleich der 3Cys-Varianten von NreB aus der Gattung *Thermus* zeigt, dass sich direkt am N-Terminus ein zusätzlicher Cysteinrest sowie ein Aspartat- und Glutaminrest befinden, die als alternative Liganden fungieren könnten. Allerdings ist der Glutaminrest des DxxxQ-Motivs der Histidinkinasen durch Serin ersetzt. Aufgrund fehlender funktioneller und biochemischer Studien ist unklar, ob das NreB-Homolog aus *Thermus* ein [Fe-S]-haltiges Protein ist, welches eine ähnliche regulatorische Rolle wie NreB einnimmt. Die aerobe Lebensweise ebenso wie die fehlende Nitratatmung sprechen für eine alternative Funktion, die sich von der Regulation des NreABC-Systems in Staphylokokken unterscheidet.

5.3.5 2Cys-Varianten von NreB_{sa} – NreB-Homologe mit alternativem Mechanismus?

Den in *L. reuteri*, *L. plantarum* und *L. fermentum* identifizierten NreB-Homologen fehlt jeweils das N-terminale Cysteinpaar, sie zeigen jedoch sowohl innerhalb der PAS- als auch in der Kinasedomäne große Ähnlichkeit mit NreB_{sa}. Laktobazillen sind fakultativ anaerob und besitzen die Gene der dissimilatorischen Nitratreduktase (Kleerebezem *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2008). Sowohl *L. fermentum* als auch *L. plantarum* weisen ein NreA-ähnliches Protein auf, während es in *L. reuteri* fehlt (Mullner *et al.*, 2008; Uden *et al.*, 2013). Aufgrund des Vorhandenseins von lediglich zwei Cysteinresten liegt vermutlich eine andere Art der Regulation dieser NreB-Homologe vor. Für das [4Fe-4S]-Cluster der Nitrogenase NfID aus *Methanocaldococcus jannaschii* wurde spekuliert, dass je zwei Cysteinreste eines Monomers ein Cluster koordinieren, sodass ein Cluster pro Homodimer existiert (Staples *et al.*, 2007). Derselbe Mechanismus ist für NreB-Homologe in Laktobazillen vorstellbar ebenso wie die Cluster-Bindung durch alternative Liganden oder die regulatorische Formation einer Disulfidbrücke als Disulfid-Switch wie in den Flp-Proteinen (Gostick *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2000).

5.3.6 1Cys-Varianten von NreB_{sa} – Regulation außerhalb der Nitratatmung durch Redox-Switch?

NreB-ähnliche Proteine, die lediglich einen Cysteinrest konserviert haben, sind sowohl in den Bacilli *Paenibacillus* und *Halobacillus* als auch in *Clostridium sp.*, *Planctomyces limnophilus* und *Opitutus terrae* identifiziert worden. Am häufigsten ist der Rest C1 konserviert, wobei auch C2 oder C4 vorkommen

(Tabelle 13). In Paenibazillen existieren neben der 1Cys-Variante auch ein 4Cys-NreB-Homolog sowie ein FNR_{Bs}-Homolog (Tabelle 12 und 11), was auf verschiedene regulatorische Rollen für jedes Protein hindeutet. Während das 4Cys-NreB-Homolog zusammen mit Homologen von NreA und NreC wahrscheinlich die Regulation der Nitratatmung übernimmt, wäre für die 1Cys-Varianten eine andere Rolle in der Redoxwahrnehmung denkbar. Das OhrR-Protein aus *B. subtilis* besitzt einen redox-aktiven Cysteinrest, der die Aktivität des Repressors als Antwort auf Peroxidstress reguliert (Fuangthong & Helmann, 2002). Eine ähnliche Funktion ist für diese NreB-Varianten vorstellbar, jedoch ist keines der Proteine bisher funktionell oder biochemisch charakterisiert.

Tabelle 13: Übersicht der Spezies mit 1Cys-Varianten von NreB und deren Stoffwechseleigenschaften sowie die genetische Ausstattung der anaeroben Nitratatmung und des NreABC-Systems.

Spezies	Cys-Rest	Stoffwechseleigenschaften und genetische Ausstattung Nitratatmung	Referenz
<i>Paenibacillus sp</i>	C1	Fakultativ N ₂ , Nitratatmung, keine N-Fixierung <i>nar</i> -Gene, NreB(4Cys), GAF-Protein, LuxR-Regulator	(Mead <i>et al.</i> , 2012)
<i>Halobacillus</i>	C1	O ₂ , keine <i>nar</i> -Gene, kein NreA + NreC	(Pade <i>et al.</i> , 2013)
<i>Opitutus</i>	C1	N ₂ , Gärung; keine <i>nar</i> -Gene, kein NreA + NreC	(Chin <i>et al.</i> , 2001)
<i>Planctomyces</i>	C2	N ₂ , keine <i>nar</i> -Gene, kein NreA + NreC	(Labutti <i>et al.</i> , 2010)
<i>Clostridium</i>	C4	N ₂ , keine <i>nar</i> -Gene, kein NreA + NreC	(Yokoyama <i>et al.</i> , 2010; Yokoyama <i>et al.</i> , 2011)

Außer den fakultativen Paenibazillen fehlen allen Spezies mit 1Cys-Variante sowohl die Gene der anaeroben Nitratatmung als auch NreA und NreC (Tabelle 13), was gegen die typische Funktion von NreB in einem ZKS und gegen die Beteiligung der NreB-Varianten an der Nitratatmung spricht. Eine funktionell verschiedene Rolle dieser 1Cys-Varianten im Vergleich zu NreB_{So} wird durch eine niedrige Sequenzähnlichkeit mit der sensorischen PAS-Domäne von NreB untermauert.

5.4 WhiB3 aus *M. tuberculosis* – Redoxsensor der Actinobakterien

Im Gegensatz zu FNR und NreB handelt es sich bei WhiB3 aus *M. tuberculosis* eher um einen Redox- als einen reinen Sauerstoffsensoren (Singh *et al.*, 2007). Unter anaeroben Bedingungen koordiniert WhiB3 ein [4Fe-4S]-Cluster, allerdings besitzt diese Form nur mäßige DNA-Bindungsaktivität. Bei anhaltenden oxidativen Stressbedingungen in den Wirt-Makrophagen werden die Clusterkoordinierenden Cysteinthiole oxidiert und es kommt zur Ausbildung zweier intramolekularen Disulfidbrücken, welche die DNA-Bindungsaffinität stark erhöhen (Singh *et al.*, 2009). WhiB3 reguliert dabei eine Reihe von Genen unter anderem des virulenten Lipid- sowie Fettsäure-Stoffwechsels und ist demnach essentiell für das Überleben und die Persistenz in den Makrophagen (Singh *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2016; Steyn *et al.*, 2002).

Grundsätzlich kommen WhiB-ähnliche Proteine in einer Spezies in den Actinobakterien in multipler Anzahl mit diversen Funktionen vor und sind dabei jedoch auf Sequenzebene sehr unterschiedlich (Soliveri *et al.*, 2000; Geiman *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 2012b). Die BLAST-Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Limitierung von WhiB3-ähnlichen Proteinen innerhalb der Actinobakterien sowie deren Alleinstellung. Weder FNR- noch NreB-Homologe konnten in den Actinobakterien identifiziert werden, was die Spezialisierung von WhiB als [Fe-S]-haltiger Sensor innerhalb dieser Bakterien belegt. WhiB3-Homologe sind ausschließlich in verschiedenen Gattungen der Actinobakterien identifiziert worden mit der größten Anzahl innerhalb der Mycobakterien. Der phylogenetische Stammbaum von WhiB3 ist sehr verzweigt und weist wenige Äste mit Proteinen mit geringer evolutionärer Distanz auf. Ausgenommen hiervon sind die WhiB3-Homologen eines Astes aus *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* und *M. canetti*, die zum pathogenen *Mycobacterium tuberculosis complex* gehören (Rodriguez-Campos *et al.*, 2014). Die Verzweigung des gesamten Stammbaums spiegelt die Verteilung der WhiB3-ähnlichen Proteine in vielen verschiedenen Gattungen der Actinobakterien wieder.

5.4.1 3Cys-Varianten von WhiB3_{Mt} – Alternative Redoxsensoren etabliert?

Alle WhiB3-Homologe besitzen die konservierten Cluster-koordinierenden Cysteinreste, wobei lediglich fünf Prozent aufgrund einer N-terminal verkürzten Sequenz der erste Cysteinrest fehlt. Die 3Cys-Varianten sind unter anderem in *M. intracellulare*, *Streptomyces hygroscopicus* und *Amycolicoccus subflavus* vorhanden und über den gesamten Baum zerstreut, was auf einen unabhängigen Verlust des N-terminalen Bereichs inklusive dem ersten Cysteinrest hindeutet. Funktionelle und biochemische Studien zu diesen Proteinen fehlen. Bei den beiden *M. intracellulare*-Stämmen handelt es sich um klinische Isolate mit nur sechs statt sieben WhiB-ähnlichen Proteinen, wovon zwei N-terminal verkürzt sind, was zu unvollständigen Cluster-Bindemotiven führt. Während in *M. tuberculosis* der Peroxidregulator OxyR nicht funktional ist und die Antwort auf oxidativen Stress durch WhiB Proteine reguliert wird, wird funktionales OxyR in *M. intracellulare* vermutet (Lewis & Falkinham, 2015).

5.4.2 4Cys-Homologe von WhiB3_{Mt} – Regulation verschiedener redoxabhängiger zellulärer Prozesse

Die WhiB3-Homologen mit vollständigem Cluster-Bindemotiv sind sowohl in pathogenen als auch in nicht-pathogenen Mycobakterien identifiziert worden. Es wurde bereits gezeigt, dass ein ähnliches Protein aus *M. smegmatis* und *M. bovis* mit dem Virulenz-Sigma Faktor SigA interagieren kann und es sich um WhiB3-homologe Proteine handelt (Steyn *et al.*, 2002; Soliveri *et al.*, 2000). Die Funktion und Regulation von WhiB3 scheint in allen Mycobakterien-Arten ähnlich zu sein unabhängig ihrer Pathogenität.

Tabelle 14: WhiB3_{Mt}-Homologe mit vollständigem Cluster-Bindemotiv und deren Funktion.

Protein	Spezies	Funktion oder regulierte Gene	Referenz
WhiB3	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> (pathogen); <i>M. smegmatis</i> (apathogen)	Oxidative Stressantwort: (virulenter) Lipid- und Fettsäurestoffwechsel, Persistenz, Redox-Homeoöstase	(Singh <i>et al.</i> , 2007; Singh <i>et al.</i> , 2009; Mehta <i>et al.</i> , 2016; Soliveri <i>et al.</i> , 2000; Steyn <i>et al.</i> , 2002)
WhiD	<i>Sm. coelicolor</i> (apathogen)	Sporenbildung, Septumformation	(Molle <i>et al.</i> , 2000; Jakimowicz <i>et al.</i> , 2005; Crack <i>et al.</i> , 2009)
WhcB	<i>Cb. glutamicum</i> (apathogen)	Oxidative Stressantwort (mit WhcA + WhcE)	(Lee <i>et al.</i> , 2012; Choi <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2005)

Das WhiD Protein aus *Streptomyces coelicolor* ist homolog zu WhiB3_{Mt}, erfüllt allerdings eine andere Funktion (Tabelle 14). *In vitro* Experimente zeigen in Anwesenheit von O₂ oder Peroxidstress eine Clusterdegradation von WhiD ähnlich wie FNR_{Ec} (Jakimowicz *et al.*, 2005). Die Degradation des [4Fe-4S]-Clusters von nativem WhiD *in vivo* hingegen verläuft sehr langsam, sodass kein planares [2Fe-2S]-Cluster detektiert werden konnte (Crack *et al.*, 2009). Trotzdem wird deutlich, dass sowohl WhiD als auch WhiB3 als Redoxsensoren agieren, wobei sie in Abhängigkeit ihrer Pathogenität und Sporenbildung sehr verschiedene zelluläre Prozesse regulieren (Tabelle 14). Neben WhiD konnten in der BLAST-Suche in weiteren nicht-pathogenen *Streptomyces*-Arten sowie im Pflanzenpathogen *Sm. scabiei* (Chapleau *et al.*, 2016) WhiB3-Homologe identifiziert werden. Eine zu WhiB3_{Mt}-ähnliche Regulation in der Virulenz und Persistenz wäre demnach für die pathogene Spezies denkbar. Trotz fehlender funktioneller Studien in den übrigen *Streptomyces*-Arten scheint eine Funktion und Regulation dieser Proteine wie in WhiD_{Smc} wahrscheinlich. Die Lokalisation der *Streptomyces*-Homologen in direkter Nachbarschaft im Stammbaum bestätigt die geringe evolutionäre Distanz zueinander und untermauert demnach die WhiD_{Smc}-ähnliche Funktion in der Sporenbildung.

Während Mycobakterien und Streptomycceten sieben bzw. elf WhiB-ähnliche Proteine besitzen, weist die nicht-pathogene Spezies *Corynebacterium glutamicum* nur vier WhiB Proteine auf. WhcB ist homolog zu WhiB3 und reguliert zusammen mit WhcA und WhcE die oxidative Stressantwort in hierarchischer Weise, wohingegen WhcD essentiell für die Zellteilung und Septumbildung ist (Lee *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2017). In der Suche nach Homologen zu WhiB3_{Mt} konnte sowohl WhcB aus *Cb. glutamicum* als auch weitere ähnliche Proteine aus nicht-pathogenen und pathogenen Spezies identifiziert werden. Die WhiB3-ähnlichen Proteine in den nicht-pathogenen Arten sind wahrscheinlich ähnlich zu WhcB_{Cbgl}, wohingegen eine Funktion der pathogenen Homologen ähnlich zu WhiB3_{Mt} denkbar ist.

Funktionelle Studien zu WhiB3-ähnlichen Proteinen in anderen Actinobakterien fehlen. WhiB3 ist nah verwandt mit Proteinen aus *Nocardia*-Arten und plasmidkodierten Produkten aus *Rhodococcus*-Spezies (Saini *et al.*, 2012b). Rhodococci sind mehrheitlich nicht-pathogene, aerobe Bakterien mit einem linearen Chromosom und drei zusätzlichen Plasmiden (McLeod *et al.*, 2006). WhiB3_{Mt}-Homologe konnten sowohl in pathogenen *Nocardia*-Spezies als auch in pathogenen und nicht-pathogenen *Rhodococcus*-Arten identifiziert werden. Im phylogenetischen Stammbaum befinden sich die WhiB3-Ähnlichen einiger Rhodococci sowie von *Nocardia*- und *Corynebacterium*-Spezies in direkter Nachbarschaft zum Referenzprotein, was die Homologie der Proteine bestätigt.

Die sieben WhiB Proteine von *M. tuberculosis* zeigen nur eine moderate Sequenzähnlichkeit von unter 70 %, sind aber alle sehr ähnlich zu mycobakteriellen Phagenproteinen. Mobile genetische Elemente wie Plasmide oder Phagen lassen sich leichter mittels lateralem Gentransfer übertragen (Gogarten & Townsend, 2005; Saini *et al.*, 2012b). Die WhiB Proteine wurden deshalb vermutlich von einem Vorfahren mittels lateralem Gentransfer übertragen und jedes WhiB Protein ist unabhängig mit verschiedenen Funktionen entstanden (Saini *et al.*, 2012b). Da alle identifizierten Actinobakterien mit einem WhiB3-Homolog auch zusätzlich weitere WhiB-ähnliche Proteine besitzen, ist ein ähnlicher Mechanismus für alle WhiB Proteine innerhalb der unterschiedlichen Gattungen der Actinobakterien denkbar. Alles in allem sind WhiB3-ähnliche Proteine ausschließlich in aeroben Actinobakterien zu finden, was die Evolution der WhiB Proteine mit ihrem sensitiven [4Fe-4S]-Cluster nach der Akkumulation von Sauerstoff auf der Erde datiert.

5.5 Verbreitung und Evolution der [4Fe-4S]-haltigen O₂-Sensoren

Die überarbeitete Anwesenheitsmatrix in Abb. 30 verdeutlicht die Dominanz des jeweiligen [Fe-S]-haltigen Sensors innerhalb eines Bakterienphylums. FNR_{Ec}-Homologe sind hauptsächlich in den α -, β - und γ -Proteobakterien zu finden mit einigen einzelnen Homologen innerhalb von Nicht-Proteobakterien wie Clostridia oder Bacteroidetes mit unbekannter Funktion. Außerhalb der Proteobakterien existieren vor allem verschiedene Cysteinvarianten von FNR_{Ec}, was auf einen Gentransfer mit anschließendem Cysteinverlust hinweist. Lateraler Gentransfer ist nur dann erfolgreich, wenn das transferierte Gen oder Protein der Spezies eine neue vorteilhafte Anpassung oder Funktion ermöglicht (Gogarten & Townsend, 2005; Vos *et al.*, 2015). Wenn FNR_{Ec} als [Fe-S]-haltiger Regulator des anaeroben Stoffwechsels keine funktionelle Rolle in den Nicht-Proteobakterien einnehmen konnte, war die Konservierung der Cysteinreste nicht von Nöten, was wiederum das Vorhandensein der einzelnen Cysteinvarianten erklären kann. Homologe für FNR_{Bs} wurden ausschließlich in Firmicuten identifiziert. Weiterhin konnten bis auf zwei Homologe alle innerhalb der Bacilli verzeichnet werden. Zwischen den beiden FNR-Typen kommt es bis auf sehr wenige Ausnahmen (Vgl. Kapitel 5.6, Tabelle 15) zu keinen Überschneidungen, was auf eine unabhängige Entwicklung

hindeutet. Die NreB_{Sa}-Homologen mit Cluster-Bindemotiv sind exklusiv in Staphylokokken und anderen Bacilli-Gattungen detektiert worden. Die Existenz von Cysteinvarianten dieser Homologe mit unbekannter Funktion außerhalb der Bacilli deutet auf lateralen Gentransfer mit anschließendem Cysteinverlust hin. In Actinobakterien ist der einzige identifizierte O₂- bzw. Redoxsensor WhiB3, was dessen Alleinstellung und Spezialisierung unterstreicht. Die Exklusivität der O₂-Sensoren in ihren spezifischen Bakterienklassen weist auf eine mehrfach unabhängige Entwicklung der [4Fe-4S]-haltigen Sensoren hin.

5.6 Multiple [Fe-S]-haltige Sensoren innerhalb eines Organismus

Einige Mikroorganismen enthalten neben multiplen Anzahlen eines Sensors wie in dem Rhizobium *Rp. palustris* (4Cys-FNR_{Ec} AadR und 0Cys-FNR_{Ec} FixK) (Vgl. Kapitel 5.1.1 Tabelle 6) auch zwei unterschiedliche Sensoren. Die meisten Überschneidungen existieren zwischen FNR_{Bs} und NreB, die beide innerhalb der Firmicutes beziehungsweise spezifischer innerhalb der Bacilli vorkommen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht der Spezies mit multiplen [Fe-S]-haltigen Sensoren und der genetischen Organisation der Nitratatmungsgene. Die Bakterienphyla sind wie folgt abgekürzt: Bacilli B, Negativicutes Neg, Clostridia C, Proteobakterien γ oder β . * markiert NreB-/ FNR_{Bs}-Homologe, die aufgrund ihrer genetischen Organisation wahrscheinlich die Nitratatmung regulieren.

Spezies	FNR _{Ec}	FNR _{Bs}	NreB	Genetische Organisation
<i>S. pseudintermedius</i> (B)	-	4Cys	4Cys*	<i>nreABC</i> mit <i>nar</i> -Gene
<i>Mc. caseolyticus</i>	-	4Cys	4Cys*	<i>nreABC</i> mit <i>nar</i> -Gene
<i>Bb. brevis</i>	-	4Cys	4Cys	Keine <i>nar</i> -Gene
<i>P. sp (G. sp)</i>	-	4Cys	4Cys*	<i>nreABC</i> -Homologe mit <i>nar</i> -Gene
<i>P. terrae</i>	-	4Cys (2x)	4Cys*, 1Cys	<i>nreABC</i> -Homologe mit <i>nar</i> -Gene
<i>P. polymyxa</i>	-	4Cys (2x)	4Cys*, 1Cys	<i>nreABC</i> -Homologe mit <i>nar</i> -Gene
<i>P. mucilaginosus</i>	-	4Cys (2x)	1Cys	Keine <i>nar</i> -Gene
<i>P. sp JDR2</i>	-	4Cys	1Cys	Keine <i>nar</i> -Gene
<i>Se. ruminantium</i> (Neg)	-	4Cys*	0Cys	<i>fnr</i> -Homolog mit <i>nar</i> -Gene
<i>D. hafniense</i> Y51 (C)	-	0Cys	0Cys	<i>nreABC</i> -Homologe mit <i>nar</i> -Gene
<i>D. hafniense</i> DCB2	4Cys	0Cys	-	<i>nap</i> - statt <i>nar</i> -Gene
<i>Ap. oremlandii</i>	3Cys	0Cys	-	Keine <i>nar</i> -Gene
<i>Sh. piezotolerans</i> (γ)	4Cys	-	0Cys	Keine Co-Lokalisation
<i>Rh. ferrireducens</i> (β)	4Cys, 1Cys	-	0Cys	Keine Co-Lokalisation
<i>O. terrae</i>	1Cys	-	0Cys, 1Cys	Keine <i>nar</i> -Gene

Zwischen FNR_{Ec} und FNR_{Bs} gibt es nur zwei Überschneidungen, allerdings fehlt den FNR_{Bs}-ähnlichen Proteinen jeweils das Cluster-Bindemotiv. Auch zwischen FNR_{Ec} und NreB gibt es einige Überschneidungen, wobei auch hier kein 4Cys-NreB-Homolog beteiligt ist (Tabelle 15).

Während alle Spezies der Bacilli und Negativicutes ein FNR_{Bs}-Homolog mit vollständigem Cys-Cluster besitzen, ist dies für NreB in einigen Spezies nicht der Fall. Da sowohl FNR_{Bs} als auch NreB die anaerobe Nitratatmung regulieren, ist es unwahrscheinlich, dass beide Proteine innerhalb einer Spezies dieselbe Funktion einnehmen. In *B. subtilis* und *S. aureus* sind die Gene der Nitratatmung jeweils co-lokalisiert mit dem entsprechenden Sensor (Nakano & Hulett, 1997; Fedtke *et al.*, 2002; Schlag *et al.*, 2008). Die NreB-Homologen mit vollständigem Cys-Cluster sind mit den *nar*-Genen co-lokalisiert, was für NreB als Regulator der Nitratatmung in diesen Spezies spricht (Tabelle 15*). FNR_{Bs}-Homologe werden in diesen sowie in Spezies, die keine Nitratatmung betreiben und kein 4Cys-NreB-Homolog besitzen (einige Paenibazillen), eine andere, bisher unbekannte regulatorische Rolle einnehmen. Sowohl FNR_{Bs}- als auch 1Cys-NreB-Varianten haben Cysteinreste des Bindemotivs verloren und können eine andere Rolle in der Redoxwahrnehmung ausüben, jedoch nicht mehr als direkte [4Fe-4S]-haltige O₂-Sensoren fungieren. Die 0Cys-Varianten unterscheiden sich im Sequenzvergleich klar von FNR_{Bs} bzw. NreB_{So}. Deswegen handelt es sich wohlmöglich um falsch-positive BLAST-Treffer. Allerdings könnte es sich auch um ältere Proteine oder Vorfahren handeln, die aufgrund der anaeroben Lebensweise der Mikroorganismen kein [Fe-S]-Cluster evolviert haben.

Im Hinblick auf die Fragestellung ob FNR aus *E. coli* und *B. subtilis* einen gemeinsamen Vorfahren besitzen oder ob ein FNR-Typ sich aus dem anderen entwickelt hat, sind Spezies, die sowohl ein FNR_{Ec}- als auch ein FNR_{Bs}-ähnliches Protein enthalten, besonders interessant. Spezies mit Homologen beider FNR-Typen sowie zu FNR_{Bs} homologe Proteine mit einem N-terminalen Cysteincluster sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Spezies mit *E. coli*- und *B. subtilis*-Typ FNR und Hybrid-FNR-Proteine. Angegeben sind die Eigenschaften des Cysteinmotivs der entsprechenden FNR-Homologe.

Spezies	FNR _{Ec}	FNR _{Bs}
<i>D. hafniense</i>	4Cys: C-x-C-x ₆ -C-x ₉₇ -C	Kein D-Cys-Motiv, aber S103 (entspricht FNR _{Ec} C122)
<i>Ap. oremlandii</i>	3Cys: C-x ₂ -C-x ₉₇ -C	Kein D-Cys-Motiv, aber C105 (entspricht FNR _{Ec} C122)
<i>C. perfringens</i> str. 13	-	Kein D-Cys-Motiv, aber C5-x ₄ -C-x ₃ -C-x ₉₈ -C113, C113 (entspricht FNR _{Ec} C122)
<i>N. koreensis</i>	-	D143 vorhanden, keine Cys, aber C6-x ₄ -C-x ₂ -C-x ₂ -C-x ₈₇ -C105, C105 (entspricht FNR _{Ec} C122)

Den FNR_{Bs}-Varianten aus *D. hafniense* und *Alkaliphilus oremlandii* fehlt das vollständige Aspartat-Cystein-Bindemotiv, jedoch besitzt das FNR_{Bs}-Homolog aus *Ap. oremlandii* in der Crp-ähnlichen

Nukleotid-Bindedomäne einen Cysteinrest, der mit dem vierten Cysteinliganden den FNR_{Ec} korrespondiert. In *D. hafniense* ist dieser Rest durch Serin substituiert. Das FNR_{Bs}-ähnliche Protein aus *C. perfringens* weist weder den Aspartatrest noch die C-terminalen Cysteinreste auf, jedoch existieren drei N-terminale sowie ein zentraler Cysteinrest mit einem von FNR_{Ec} abweichenden *Spacing*. In *N. koreensis* ist der Aspartatrest des FNR_{Bs}-ähnlichen Proteins zwar existent, jedoch gibt es auch hier eine N-terminale Cysteindomäne sowie einen zentralen Cluster-bindenden Rest, welche eher FNR_{Ec} ähneln. Das Protein aus *N. koreensis* stellt so eine Art FNR-Hybrid dar, wobei die Entstehung und Entwicklung sowie die Funktion dieses Proteins unbekannt sind.

5.7 Ist CRP der Vorfahre der [Fe-S]-haltigen FNR-Sensoren?

CRP aus *E. coli* repräsentiert das Paradebeispiel eines regulatorischen Transkriptionsfaktors. Die Anwesenheitsmatrix in Abb. 10 zeigt deutlich, dass CRP im Gegensatz zu den [Fe-S]-haltigen Sensoren nicht auf eine Bakterienklasse spezialisiert ist, sondern in sehr vielen verschiedenen Bakteriengruppen existiert, was auf eine allgemeinere Funktion hindeutet. Als globaler Regulator kontrolliert CRP eine Vielzahl an unterschiedlichen zellulären Prozessen wie den Zucker- oder Aminosäurenstoffwechsel, verschiedene Transportprozesse, die Proteinfaltung sowie die Toxinproduktion. Die CRP-Aktivität wird durch cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) reguliert. In aktiver, cAMP-gebundener Form bindet CRP an spezifische, konservierte Promotorbindesequenzen der Zielgene und moduliert diese (Busby & Kolb, 1996; Busby & Ebright, 1999; Korner *et al.*, 2003). CRP besteht strukturell aus einer großen Nukleotid-Bindedomäne, die auch die Dimerisierungshelix einschließt, sowie einer C-terminalen HTH-DNA-Bindedomäne. Sehr ähnliche Domänen existieren ebenso in FNR, sodass das Vorhandensein dieser Domänen als Grundlage für die Einteilung in die FNR-CRP-Familie der Transkriptionsfaktoren gilt (Shaw *et al.*, 1983; Korner *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2009; Volbeda *et al.*, 2015). Neben den strukturellen Ähnlichkeiten der Domänen zwischen FNR und CRP, ähneln sich auch die DNA-Bindemotive der Zielgene (Vgl. Kapitel 2.4, Abb. 7). Während die FNR_{Bs}-Bindestellen identisch mit den CRP_{Ec}-Bindestellen sind, weicht die FNR_{Ec}-Bindestelle davon ab (Cruz Ramos *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996).

Zusätzlich zu den beiden [Fe-S]-haltigen FNR-Proteinen aus *E. coli* und *B. subtilis* gibt es noch weitere Regulatoren der Familie mit einem [4Fe-4S]-Cluster. Das Yeil-Protein aus *E. coli* beispielsweise ist der Regulator des N-Mangels in der stationären Phase und weist das Cluster-Bindemotiv C(68)-x₂₂-C-x-C-x₂₂-C auf (Anjum *et al.*, 2000), welches sich deutlich sowohl von FNR_{Ec} als auch von FNR_{Bs} unterscheidet. Drei Transkriptionsfaktoren derselben Regulatorfamilie mit drei unterschiedlichen [Fe-S]-Cluster-Bindemotiven deuten auf eine mehrfach unabhängige Akquisition der [4Fe-4S]-Cluster hin.

Zur Überprüfung ob FNR aus CRP durch Anlagerung eines [Fe-S]-Clusters entstanden ist, sollte ein gemeinsamer phylogenetischer Stammbaum erstellt werden. Aufgrund der niedrigen globalen

Sequenzidentität von 17,9 % zwischen CRP und FNR_{Ec} wurden dabei ein großer Stammbaum bestehend aus zwei separaten Stammbäumen von CRP und FNR_{Ec}. Von 717 CRP-Homologen und 664 FNR_{Ec}-Homologen gab es lediglich 398 Überlappungen. Diese befinden sich hauptsächlich in den Proteobakterien (Abb. 10). Die fehlende globale Sequenzähnlichkeit der Proteine wird auch durch die Gruppierung in verschiedene Bakterienklassen in der Matrix verdeutlicht. Mit Hilfe der angewendeten Methoden lassen sich deshalb keine Aussagen über die gegenseitige Abhängigkeit von FNR und CRP treffen. Während CRP ein globaler, cAMP-abhängiger Regulator ist, reagiert FNR spezifisch in Proteobakterien (oder Bacilli) sensitiv gegenüber O₂ und erfüllen damit vollkommen verschiedene Funktionen.

Es ist allerdings durchaus möglich, dass O₂-insensitives CRP evolutionär älter ist, bereits vor der Akkumulation des O₂ in der Atmosphäre existiert hat und als strukturelle Basis für die [Fe-S]-haltigen O₂-Sensoren FNR sowie für andere nicht O₂-sensitive Transkriptionsfaktoren wie DNR aus *Pseudomonas* (Zumft, 2002; Korner *et al.*, 2003) oder ArcR aus *B. licheniformis* (Maghnouj *et al.*, 2000; Korner *et al.*, 2003) dient.

5.8 Chemie der [Fe-S]-Cluster

[Fe-S]-Cluster gelten als die ältesten Co-Faktoren in Proteinen. Die [Fe-S]-haltigen Proteine kommen in allen Bereichen des Lebens mit den unterschiedlichsten Funktionen vor (Beinert *et al.*, 1997; Fontecave, 2006; Crack & Le Brun, 2017). Neben den spezifischen Studien der proteingebundenen Cluster werden die dahinterstehende Chemie und die Reaktionen der [Fe-S]-Cluster auch in biomimetischen Systemen studiert. Clusteranalogue können in protischen und aprotischen Systemen hergestellt werden. Dabei werden die synthetischen [Fe-S]-Cluster über diverse Liganden, oftmals verschiedene Thiolliganden oder auch Maquettes (kurze Cysteinpeptide) koordiniert (Venkateswara Rao & Holm, 2004; Meyer, 2008; Mulholland *et al.*, 1999; Hoppe *et al.*, 2011). Die Basiseinheit der [Fe-S]-Cluster bildet das rautenförmige [2Fe-2S] aus denen alle Arten der [Fe-S]-Cluster generiert werden können. Bei der Herstellung des kubischen [4Fe-4S]²⁺-Clusters handelt es sich um die einfachste Synthese, da es das stabilste Cluster unter anaeroben Bedingungen ist und eine thermodynamische Senke darstellt. Das ebenfalls stabile, planare [2Fe-2S]²⁺-Cluster hingegen ist schwerer zu synthetisieren, da es die Tendenz zur spontanen Dimerisierung zu einem kubischen [4Fe-4S]²⁺-Cluster besitzt. Es kann jedoch durch synthetische Oxidation aus einem [4Fe-4S]²⁺-Cluster generiert werden (Venkateswara Rao & Holm, 2004; Meyer, 2008; Hoppe *et al.*, 2011; Holm & Lo, 2016).

Die proteingebundenen [2Fe-2S]²⁺- sowie [4Fe-4S]²⁺-Cluster und deren Clusterumwandlungen sind in vielen biologischen Prozessen wie der O₂-Wahrnehmung von Bedeutung. In *Pyrococcus furiosus* Ferredoxin, der Aconitase sowie der Fumaratreduktase aus *E. coli* wird das [4Fe-4S]²⁺-Cluster durch Verlust eines Eisenatoms zu einem [3Fe-4S]¹⁺-Cluster konvertiert (Lovgreen *et al.*, 2011; Brown *et al.*,

2002; Manodori *et al.*, 1992), was demnach ein plausibles Intermediat in der O₂-getriebenen Degradation eines [4Fe-4S]²⁺- zu einem [2Fe-2S]²⁺-Clusters darstellt (Holm & Lo, 2016; Crack & Le Brun, 2017). Radikale SAM-Enzyme wie die Biotin- und Lipoatsynthase, die anaerobe Ribonukleotidreduktase sowie das aktivierende Enzym der Pyruvat-Formiat-Lyase koordinieren ihre [4Fe-4S]-Cluster über drei Cysteinreste und Methionin. Das Cluster dient als Elektronendonator in der radikalischen Enzymkatalyse und untergeht zusätzlich einer reversiblen O₂-Inaktivierung zu einem [2Fe-2S]²⁺-Cluster (Duin *et al.*, 1997; Mulliez *et al.*, 1999; Ollagnier-de Choudens & Fontecave, 1999; Ugulava *et al.*, 2000; Ollagnier-De Choudens *et al.*, 2000; Buis & Broderick, 2005; Broderick *et al.*, 2014). Neben den radikalischen SAM-Enzymen und den hier untersuchten O₂-Sensoren untergehen auch einige Nitrogenasen und das IscA-Protein (Iron-sulfur cluster assembly) Clusterumwandlungen von einem [4Fe-4S]²⁺- zu einem [2Fe-2S]²⁺-Cluster (Fu *et al.*, 1991; Mapolelo *et al.*, 2012).

Die synthetischen [4Fe-4S]-Clusteranalogen sind ebenfalls stark O₂-sensitiv und degradieren ebenso wie die genannten Beispiele in Anwesenheit von O₂ (Holm & Lo, 2016). In Proteinen sind die [Fe-S]-Cluster in die Tertiärstruktur der Proteine eingebettet, welche die Reaktivität und Sensitivität der Cluster bestimmt. Sie können je nach Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur mehr oder weniger zugänglich sein, sodass unterschiedliche O₂-Konzentrationen für die Oxidation und damit einhergehende Clusterdegradation nötig sind. In Proteinen, die im Elektronentransfer beteiligt sind, befinden sich die [Fe-S]-Cluster oftmals vollständig im Protein vergraben, wohingegen die [Fe-S]-Cluster der O₂-Sensoren zugänglicher sind, um eine optimale Anpassung an die gegebenen Bedingungen zu gewährleisten (Jervis *et al.*, 2009; Holm & Lo, 2016; Crack & Le Brun, 2017).

Die Vielzahl der synthetischen Clusteranaloge sowie der natürlich vorkommenden [Fe-S]-haltigen Proteine verdeutlicht die Entstehung von [4Fe-4S]²⁺- und [2Fe-2S]²⁺-Clustern unter den unterschiedlichsten Bedingungen mit verschiedensten Clusterliganden. Diese Cluster existieren in Proteinen mit unterschiedlichster Funktion, was auf eine, von der Clusterchemie getriebene, unabhängige Akquisition der [Fe-S]-Cluster hindeutet. Sowohl die Clusterchemie als auch die Proteinstruktur führte zur Nutzung von [4Fe-4S]²⁺-Clustern in der O₂-Wahrnehmung und der Umwandlung bzw. Degradation zu einem [2Fe-2S]²⁺-Cluster. Die Konformationsänderung, die durch den Umbau des kubischen zu einem planaren Cluster entsteht, wird in FNR, NreB und WhiB für unterschiedliche Antworten (Monomerisierung, DNA-Bindung, Kinaseinaktivierung) genutzt (Lazizzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997; Volbeda *et al.*, 2015; Reents *et al.*, 2006a; Gruner *et al.*, 2011; Mullner *et al.*, 2008; Nilkens *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2009).

Im Allgemeinen bildet das [Fe-S]-Cluster die Sensoreinheit in Redoxregulatoren, jedoch bestimmen die Umwelt des Clusters (Proteinstruktur) sowie die Clusterchemie (Degradation durch Oxidation) den Mechanismus (Konformationsänderung, DNA-Bindung) (Crack & Le Brun, 2017). Die Studien zur

Chemie der [Fe-S]-Cluster bestätigen das [4Fe-4S]²⁺-Cluster als wichtigste Einheit für O₂-Sensoren, die unabhängig voneinander in unterschiedlichen Proteinen und Organismen entstanden sind.

5.9 Schlussfolgerung zur Phylogenie der [Fe-S]-haltigen O₂-Sensoren

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob die [4Fe-4S]-haltigen Sensoren FNR aus *E. coli* sowie *B. subtilis*, NreB aus *S. aureus* und WhiB3 aus *M. tuberculosis* mehrfach unabhängig voneinander entstanden sind oder ob sie einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Bei diesen Sensoren handelt es sich um nicht-verwandte Proteine mit unterschiedlicher Funktion und Wirkungsweise, die jedoch alle eine ähnliche Reaktion des [Fe-S]-Clusters mit O₂ zeigen. Mit Hilfe der bioinformatischen Studien konnte die phylogenetische Verteilung der Sensoren innerhalb der verschiedenen Bakterienklassen, sowie etwaige Überschneidungen analysiert werden.

FNR aus *E. coli* ist weit verbreitet in den α -, β - und γ -Proteobakterien, wurde jedoch ebenfalls über lateralen Gentransfer an Nicht-Proteobakterien weitergegeben. Einige Proteobakterien sowie die Nicht-Proteobakterien weisen weniger als die vier für die Cluster-Koordination essentiellen Cysteinreste auf, was sich durch Verlust der Reste und andere regulatorischen Funktionen erklären lässt. FNR aus *B. subtilis* hingegen ist limitiert auf das Vorkommen in Firmicutes bzw. spezifischer in Bacilli. Abgesehen von den OCys-Varianten, die nicht als O₂-Sensor agieren können, wurden nur Homologe detektiert mit dem vollständigen Cluster-Bindemotiv, was die Spezialisierung und Wichtigkeit von FNR in Bacilli zeigt. FNR_{Ec} und FNR_{Bs} sind beide sehr verschiedenen, dennoch zeigen sie beide große Ähnlichkeit zu CRP (Domänenaufbau und DNA-Bindesequenzen). Es gibt einige Hinweise, dass CRP der Vorfahre der beiden verschiedenen FNR-Typen ist, welche unabhängig in den gramnegativen Proteobakterien sowie den grampositiven Bacilli entstanden sind. NreB aus *S. aureus* existiert hauptsächlich in Staphylokokken, aber auch in anderen Bacilli-Spezies sowie in Nicht-Bacilli. In Staphylokokken existiert kein FNR, sodass NreB zusammen mit NreC und NreA die funktionelle Rolle als Regulator der anaeroben Nitratatmung übernommen hat. NreB wurde über lateralen Gentransfer allerdings auch an andere Bacilli-Arten weitergegeben, welche das NreABC-System etabliert haben. In Nicht-Bacilli-Spezies haben die NreB-Homologe einige Cluster-koordinierenden Cysteinreste verloren, was auf die Etablierung einer anderen Funktion hindeutet. WhiB3 aus *M. tuberculosis* wurde ausschließlich in verschiedenen Actinobakterien identifiziert. Die Abwesenheit weiterer [Fe-S]-haltigen Sensoren unterstreicht ebenfalls die Spezialisierung und Wichtigkeit der WhiB-ähnlichen Proteine. Außer einigen Varianten mit verkürzter Sequenz (3Cys) enthalten alle Homologen das Cluster-Bindemotiv. WhiB3 ist demnach essentiell für Actinobakterien. WhiB3 ist vermutlich nach der Akkumulation von O₂ auf der Erde entstanden, da nur in aeroben Mikroorganismen Homologe detektiert werden konnten.

Die vorliegenden Ergebnisse und Analysen sowie die Studien mit synthetischen [Fe-S]-Analogen deuten auf eine mehrfach unabhängige Entwicklung der [4Fe-4S]-haltigen O₂-Sensoren hin. Die chemischen Eigenschaften sowie die Reaktivität der [Fe-S]-Cluster führte in der Natur zur unabhängigen Etablierung der reversiblen [4Fe-4S]/[2Fe-2S]-Umwandlung in der O₂-Wahrnehmung ungeachtet vom Protein. Die Proteinstruktur bestimmt jedoch die Sensitivität des jeweiligen O₂-Sensors und die Art und Weise, wie der Reiz an die Zelle weitergegeben wird.

5.10 Interaktion zwischen dem O₂-Sensor NreB und dem Nitratsensor NreA

Das NreABC-System reguliert in *S. carnosus* mit Hilfe der Co-Sensoren NreA (Nitrat) und NreB (Sauerstoff) die Expression der Nitratatmungsgene (Kamps *et al.*, 2004; Schlag *et al.*, 2008; Mullner *et al.*, 2008; Nilkens *et al.*, 2014; Niemann *et al.*, 2014). Um die systeminternen Regulationsmechanismen aufzuklären, ist die Identifizierung funktionell wichtiger Interaktionsstellen zwischen den einzelnen Proteinen essentiell. Auf der Oberfläche von NreA befinden sich zwei konservierte Bereiche (Koch-Singenstreu, 2013), die ein Indiz für potentielle Interaktionsflächen darstellen. Durch gerichtete Mutagenese wurden die konservierten AS-Reste substituiert und mit Hilfe verschiedener Interaktionsstudien sowie Funktionsstudien analysiert. Dies diente der Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen NreA und NreB sowie zwischen zwei NreA-Monomeren.

5.11 Interaktionsmodell von NreA und NreB basierend auf den BACTH-Studien

Das Arbeitsmodell des NreABC-Systems aus Abb. 8 geht von einer Interaktion zwischen dimerem NreA und dimerem NreB unter anaeroben Bedingungen in Abwesenheit von Nitrat aus (Nilkens *et al.*, 2014). Diese Interaktion führt zum inhibitorischen Effekt von NreA auf die NreB-Autophosphorylierungsaktivität. In Anwesenheit von Nitrat wird dieses von NreA gebunden und sowohl die Interaktion zwischen den NreA-Monomeren, als auch die NreA/NreB-Heterodimerisierung verändern sich, sodass NreB maximal phosphoryliert werden kann.

Die BACTH-Studien zur Homo- und Heterodimerisierung von NreA und NreB, die in Abwesenheit von NreC durchgeführt wurden, unterstützen die Annahme, dass Cluster I („Nitratbindetasche“) verantwortlich für die NreA-Dimerisierung ist, während Cluster II („N-Terminus“) auf der gegenüberliegenden Seite von NreA wichtig für die Interaktion zwischen NreA und NreB ist. Die durch Alanin substituierten AS-Reste des Cluster I (I43, G64, G66, G69 und G75) zeigten einen vollständigen Verlust der NreA-Dimerisierung. Im Gegensatz dazu entsprach die Interaktion dieser NreA-Varianten mit NreB der des Wildtyps. Die Ergebnisse untermauern die Wichtigkeit dieses Bereichs für die NreA/NreA-Homodimerisierung. Drei NreA-Varianten aus Cluster II (R21A, D27A und N51D) wiesen eine stark reduzierte NreA/NreB-Interaktion aus, welche auch durch Doppel- und Dreifachvarianten

bestätigt wurde (Barth, 2014). Im Bereich des Cluster II wurden keine Varianten identifiziert, die einen Effekt auf die NreA/NreA-Interaktion hatten.

Basierend auf diesen BACTH-Ergebnissen wurde das Interaktionsmodell in Abb. 33 moduliert. Die beiden NreA-Monomere sind um 180° zueinander gedreht und dimerisieren im Bereich des Cluster I um die Nitratbindetasche. Dort befindet sich die Helix α_3 , welche zusammen mit α_6 den Liganden über die Ausbildung partieller Dipole in der Bindetasche hält (Niemann *et al.*, 2014). Im Allgemeinen sind Helices an Dimerisierungsflächen von Proteinen beteiligt. So erfolgt die Dimerisierung von CRP und FNR aus *E. coli* über eine lange Dimerisierungshelix in der Nukleotid-Bindedomäne (Shaw *et al.*, 1983; Sharma *et al.*, 2009; Volbeda *et al.*, 2015). In FNR_{Ec} führt die [Fe-S]-Clusterdegradation nach O₂-Exposition zu strukturellen Änderungen, welche die Dimerisierungshelix einschließen und in der Monomerisierung resultieren (Volbeda *et al.*, 2015). Während die ligandfreie Form von NreA unbekannt ist, konnte die ligandgebundene Form von NreA bereits kristallisiert werden (Niemann *et al.*, 2014). Strukturelle Änderungen durch Bindung von Nitrat innerhalb des Cluster I können sich möglicherweise auf das gesamte NreA-Protein auswirken, sodass auch Cluster II auf der gegenüberliegenden Seite Konformationsänderungen erfährt, die wiederum in einer veränderten NreA/NreB-Interaktion resultieren. Da die Kristallstruktur von NreB allerdings ebenso unbekannt ist, wie die nitratfreie NreA-Form, sind keine potentiellen Interaktionsflächen auf NreB-Seite bekannt.

5.11.1 Einfluss von NreC auf die BACTH-Interaktion zwischen NreA und NreB

Die Methodik des BACTH-Systems erlaubt es, die Interaktion zwischen zwei Proteinen mit mehreren Fusionskombinationen zu testen. Für einige NreA-Varianten führte dies zu Daten, die unterschiedliche Vorhersagen zur Interaktion mit NreB machten (Abb. 34). Des Weiteren zeigten die Fusionen deutliche Unterschiede in einzelnen Experimenten, was zu sehr hohen Standardabweichungen führte. Diese Schwankungen können Hinweise sein, dass diese Untersuchungen wegen der Durchführung in *E. coli* oder wegen des Fehlens von NreC zumindest teilweise artifiziell sind. Für *S. carnosus* sind Two-Hybrid-Systeme zur Messung von Proteininteraktionen *in vivo* noch nicht verfügbar.

Das Vorliegen von NreC in den optimierten Interaktionsstudien zwischen NreA und NreB hatte einen positiven Effekt zur Folge, welcher sich durch besser reproduzierbare Ergebnisse zeigte. Auch wenn nicht alle vier getesteten Fusionskombinationen einer NreA-Variante mit NreB die gleichen Ergebnisse brachten, so führte die Komplettierung mit NreC in den BACTH-Heterodimerisierungsstudien zu einer deutlichen Verbesserung der Daten (Klein, 2018).

Genauere Untersuchungen ergaben ebenso, dass die Interaktion von NreA mit NreB auch von der Wachstumsphase und anderen Parametern abhängt, deren Bedeutung und Hintergrund aber nicht genauer geklärt werden konnte (Klein, 2018).

Das BACTH-System ist für die exponentielle Wachstumsphase von *E. coli* ausgelegt (Karimova *et al.*, 1998), sodass die Ergebnisse dieser Phase zu präferieren sind. Dies würde bedeuten, dass ohne NreC keine Interaktion von NreA und NreB möglich ist, sondern erst durch den stabilisierenden Effekt von NreC zustande kommt. Die fehlende Interaktion zwischen NreA und NreB in Anwesenheit von Nitrat in diesen Studien spricht für ein vollständiges Ablösen des Nitratsensors von NreB und nicht wie im Arbeitsmodell angenommen eine reduzierte bzw. veränderte Interaktion.

5.11.2 Widersprüchliche NreA*/NreB-BACTH-Interaktion in Abhängigkeit von NreC

Die Ergebnisse der NreA/NreB-Heterodimerisierung führen in Anwesenheit von NreC zu einem Modell, das sich von dem aus den Messungen ohne NreC (Abb. 35 und Abb. 33) deutlich unterscheidet. Das experimentelle Interaktionsmodell, das in Abwesenheit von NreC in *E. coli* bestimmt wurde, geht von einer NreA-Dimerisierungsstelle im Bereich von Cluster I aus. Bei Co-Expression von NreC wurden in dem gleichen Bereich NreA-Varianten identifiziert, die einen starken Interaktionsverlust mit NreB zeigten. In den NreA-Homodimerisierungsstudien ohne NreC waren vier der fünf Varianten mit reduzierter Dimerisierung Glycinreste. Glycinreste dienen in Proteinstrukturen aufgrund ihrer geringen Größe und fehlenden Seitenketten häufig zur Stabilisation in der Struktur oder Interaktion von Sekundärstrukturen. Die reduzierte Interaktion der NreA-Monomere könnte demnach auf eine Instabilität der NreA-Varianten zurückgeführt werden. Hinweise auf strukturelle Änderungen in den Varianten ergaben sich auch in den Gelfiltrationsanalysen. Die Anwesenheit von NreC könnte einen stabilisierenden Effekt sowohl auf NreA als auch auf NreB und deren Interaktion ausüben, da die Komplettierung des NreABC-Systems den physiologischen Bedingungen näherkommt. Um die systeminternen Interaktionen sowie deren Einfluss verifizieren zu können, muss das potentielle Interaktionsmodell mit unabhängigen Methoden entweder bestätigt oder widerlegt werden.

5.12 Zusammenhang zwischen Funktion und Interaktion von NreA-Varianten

Für das Verständnis des Einflusses von NreA auf die Autophosphorylierungsaktivität von NreB ist die Identifizierung der Interaktionsstellen wichtig. Es wird angenommen, dass eine Interaktion zwischen NreA und NreB die Phosphorylierung des ZKS in Abhängigkeit von Nitrat steuert (Abb. 8; Nilkens *et al.* (2014); Niemann *et al.* (2014); Nitrateffekt Vgl. Tabelle 17). Sind nun NreA-Varianten in ihrer Interaktion mit NreB geschwächt, sollte dies in einer nitratunabhängigen Stimulation von NreB resultieren, da kein inhibitorischer NreA-Effekt vorliegt. Im Gegensatz dazu führen NreA-Varianten, die eine permanente Interaktion mit NreB aufweisen, zu einer permanenten Repression der Zielgene (OFF-Phänotyp).

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen Interaktions- und Funktionsstudien und dem resultierenden Phänotyp basierend auf dem NreABC-Arbeitsmodell. + bedeutet vorhandene Interaktion oder Expression der Zielgene, während - für eine nicht vorhandene Interaktion oder Zielgenexpression steht. ++ definiert die Stimulation der Zielgenexpression.

<u>BACTH-Interaktionsstudien</u>		<u>Funktionsstudien</u>		<u>Regulations-Phänotyp</u>
NreA/NreB	NreA/NreB + NO ₃ ⁻	<i>narG-lip</i>	<i>narG-lip</i> + NO ₃ ⁻	
+	-	+	++	WT (Nitrateffekt)
-	-	++	++	ON (keine NO ₃ ⁻ Stimulation, "nitratblind")
+	+	-	-	OFF (keine Genexpression)

Der Vergleich zwischen den in Tabelle 17 dargestellten Zusammenhängen des NreABC-Systems mit den Ergebnissen der BACTH- und *narG-lip*-Funktionsstudien zeigt erhebliche Diskrepanzen. NreA-Varianten mit reduzierter Interaktion mit NreB aus Cluster II (R21A, D27A und N51D) zeigten in den Funktionsstudien bis auf NreA(R21A) einen wildtypischen Phänotyp. Eine erhöhte Proteinstabilität von NreA(R21A) und damit einhergehenden stärkeren Repressoraktivität führte zu einer ausbleibenden Expression der Zielgene (Koch-Singenstreu, 2013). Die NreA-Varianten aus Cluster I, welche eine wildtypische NreA/NreB-Interaktion aufwiesen, hatten den größten Effekt auf die Nitratregulation. NreA(I43A) und NreA(G64A) waren nitratblind in den *narG-lip*-Studien (ON), während die übrigen NreA-Varianten G66A, G69A und G75A nicht in der Lage waren, die Expression der Zielgene zu stimulieren (OFF-Phänotyp). Der Einfluss der NreA-Varianten aus Cluster I auf die Nitratregulation untermauert die Wichtigkeit dieser Reste. Diese Diskrepanzen verdeutlichen die Probleme mit den verfügbaren *in vivo* Testsystemen für die Funktion von NreABC.

5.13 Cystein-Crosslinking zur Bestätigung der NreA-Dimerisierungsfläche

Das oxidative *in vivo* Cystein-Crosslinking war nicht geeignet um Cluster I als Interaktionsstelle für die NreA-Dimerisierung zu bestätigen, da alle NreA-Varianten bereits bei Luftsauerstoff gleichermaßen ein Crosslinking-Produkt aufwiesen. Im modifizierten Cystein-Crosslinking führte die Zugabe von DTT während des Zellaufschlusses zu reduzierenden Bedingungen, welche eine Oxidation durch Luftsauerstoff verhinderte. Durch Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)₃ konnten die NreA-Varianten gecrosslinkt werden (Abb. 38). Jedoch wurden alle NreA-Varianten unabhängig ihrer Lokalisation im Protein permanent vernetzt, was auf eine mögliche inkorrekte Faltung von NreA hinweist. Die in der potentiellen Interaktionsfläche positionierte Variante NreA(G69C), zeigte die schwächste NreA-Dimerbande, wohingegen die nach innen gerichtete Variante NreA(A120C) das stärkste Crosslinking-Produkt darstellte. Dies könnte einerseits für eine veränderte Struktur bzw. Faltung des Proteins sprechen und andererseits für die Wichtigkeit des Restes G69 innerhalb des Proteins. Eine Substitution dieses Glycinrestes könnte einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität bedeuten. Die Reduktion der Oxidationsmittelkonzentration zeigte identische Ergebnisse.

5.13.1 Der Einfluss von Nitrat auf die Zugänglichkeit der Cysteinvarianten

Um die inkorrekte NreA-Faltung auszuschließen, wurden Cysteinzugänglichkeitsstudien mit NEM und PEG-Mal durchgeführt. Diese führten ebenso zu dem Ergebnis, dass alle NreA-Varianten, unabhängig von ihrer Position im Inneren des Proteins, zugänglich waren (Abb. 39A). Der Kontrollversuch mit PEG-Mal alleine diente dem Beleg der erfolgreichen PEG-Mal-Markierung (Abb. 39B). Es konnten jedoch Unterschiede zwischen den Zugänglichkeiten der NreA-Cysteinvarianten in Ab- und Anwesenheit von Nitrat beobachtet werden.

Die NreA-Varianten S49C, G69C, L70C und L99C zeigten in Abwesenheit von Nitrat schwache Zugänglichkeiten, welche durch die Anwesenheit von Nitrat gesteigert wurden (Abb. 39B). Alle diese Reste sind oberflächenexponiert und befinden sich in der potentiellen Interaktionsstelle (G69, L70) oder in Nachbarschaft der Nitratbindetasche (S49, L99). G69 und L70 sind Teil der Helix α_3 , die wichtig für die Nitratbindung ist (Niemann *et al.*, 2014). Es ist demnach vorstellbar, dass ohne Nitrat diese Reste weniger zugänglich sind, da dort die NreA-Monomere dimerisieren. Der Rest L99 befindet sich direkt am Beginn der Helix α_6 , die ebenso für die Nitratbindung wichtig ist. Außerdem sind in direkter Nachbarschaft die Reste Y95 (Deckel der Bindetasche) sowie P96 und I97 lokalisiert, welche Wasserstoffbrücken zu Nitrat ausbilden (Niemann *et al.*, 2014). S49 befindet sich in der Nähe des Restes W45, welcher über Wasserstoffbrücken direkt an der Nitratbindung beteiligt ist. Durch die Anwesenheit von Nitrat kommt es im gesamten Bereich der Nitratbindetasche, welche Cluster I miteinschließt, zu strukturellen Änderungen, die zu einer verbesserten Zugänglichkeit der Reste führen.

Die NreA-Varianten A16C und A29C zeigten in Abwesenheit von Nitrat sehr starke Zugänglichkeiten, welche durch die Anwesenheit von Nitrat reduziert wurden (Abb. 39B). A16 ist oberflächenexponiert und befindet sich auf dem gegenüberliegenden Bereich der NreA-Oberfläche in der Helix α_1 am N-Terminus. Der nach innen gerichtete Rest A29 zeigt mit seiner Seitenkette ebenfalls in die entgegengesetzte Richtung zur Nitratbindetasche. An der Nitratbindung sind die beiden Cysteinreste nicht beteiligt, sodass die resultierende Konformationsänderung zu einer geringeren Zugänglichkeit führt.

Die nach innen gerichtete Variante NreA(A120C) ist unabhängig von Nitrat nur leicht zugänglich (Abb. 39B), was auf ihre Lokalisation innerhalb des Proteins verweist.

Mit den erhaltenen Ergebnissen der Cystein-Crosslinkingstudien lässt sich das Interaktionsmodell des NreA-Dimers nicht bestätigen. In allen Versuchen wurden für die NreA-Cysteinvarianten unabhängig ihrer Lokalisation im Protein Crosslinking-Produkte detektiert. Dies spricht für eine inkorrekte Faltung des Proteins. Identische Ergebnisse wurden auch für eine niedrige Oxidationsmittelkonzentration erzielt. In den Zugänglichkeitsstudien mit NEM und PEG-Mal waren ebenso alle Reste

wasserzugänglich. Eine alternative Erklärung für die Zugänglichkeit aller Reste könnte die geringe Größe von NreA sein. Mit 18 kDa handelt es sich um ein kleines Protein, welches nur geringe Distanzen zwischen den nach innen gerichteten Resten und der Oberfläche hergibt. Es wäre demnach vorstellbar, dass durch die Reaktivität der Cysteinreste auch vermeintlich im Protein verborgene Reste *crosslinken* können. Außerdem können Veränderungen der Struktur durch das Einfügen der Substitution nicht ausgeschlossen werden. Die Methode des Cystein-Crosslinkings eignet sich nicht zur Identifizierung der potentiellen Interaktionsstelle des NreA-Dimers.

Die Zugänglichkeitsstudien mit PEG-Mal zeigten für die einzelnen NreA-Cysteinvarianten in Abhängigkeit von Nitrat Unterschiede. Varianten, die in der Nähe der Nitratbindetasche lokalisiert sind, wurden durch Nitrat zugänglicher. Dies spricht für Konformationsänderungen in diesem Bereich, welche sich auf die entsprechenden NreA-Varianten auswirkt. Da die Versuche allerdings nach Zugabe von SDS durchgeführt wurden, ist die physiologische Tertiärstruktur des Proteins nicht mehr gegeben. Die Studien belegen demnach die strukturellen Änderungen innerhalb von NreA durch die Zugabe von Nitrat, allerdings können sie das Modell des NreA-Dimers nicht bestätigen.

5.14 Die Gelfiltrationsstudien bestätigen NreA als Monomer

Die *in vitro* Gelfiltrationsstudien zeigten, dass sowohl wildtypisches NreA als auch die Varianten den monomeren Zustand aufwiesen (Abb. 40). Unter den gegebenen Bedingungen konnte NreA nicht als Dimer detektiert werden. Die Varianten NreA(R73A) und NreA(Y95A) zeigten allerdings ein reduziertes Elutionsverhalten auf, was auf eine partielle Denaturierung oder eine Strukturänderung hindeuten kann. Das vermutliche NreA-Dimer (Koch-Singenstreu, 2013) scheint bereits im Wildtyp labil zu sein, wenn NreA ohne die anderen Proteine des vermuteten NreABC-Komplexes vorliegt. Diese Instabilität des NreA-Dimers bei Expression und Überproduktion in *E. coli* könnte eine Ursache für die Probleme bei den Untersuchungen des NreA-Homodimers bzw. des NreA/NreB-Heterodimers *in vivo* in *E. coli* darstellen.

Die ligandgebundene Form von NreA wurde als Monomer kristallisiert, während die nitratfreie Form unbekannt ist. Berechnungen zu potentiellen Dimerisierungsstellen basierend auf dem NreA[NO₃⁻]-Kristall waren erfolglos (Niemann *et al.*, 2014). Das verwandte GAF-Domänen Protein SpoVT aus *B. subtilis* bildet ein physiologisches Dimer aus. Dieses wird über die Helices $\alpha 2$ und $\alpha 5$ jedes Monomers zu einem Vier-Helix-Bündel gebildet (Asen *et al.*, 2009). In NreA ist die Helix $\alpha 1$ analog zu $\alpha 2$ von SpoVT, während in NreA statt einer zu $\alpha 5$ analogen Helix der unstrukturierte Bereich des C-Terminus lokalisiert ist. Eine Dimerisierung über ein Vier-Helix-Bündel ist für NreA demnach ausgeschlossen. Es ist allerdings möglich, dass in der ligandfreien Form andere Strukturen ausgebildet werden, die eine Dimerisierung von NreA ermöglichen (Niemann *et al.*, 2014).

5.15 Alternative Interaktionsstudien zur Identifizierung der Interaktionsstellen in NreA

Das Arbeitsmodell des NreABC-Systems aus Abb. 8 basiert auf *in vivo narG-lip*-Funktionsstudien in *S. carnosus*, *in vitro* Phosphorylierungsstudien sowie verschiedener *in vivo* und *in vitro* Interaktionsstudien wie BACTH, HPINE (His-Tag-Protein Interaktions-Experiment) und Formaldehyd-Crosslinking. Alle *in vivo* Interaktionsstudien wurden in *E. coli* durchgeführt (Nilkens *et al.*, 2014; Koch-Singenstreu, 2013).

5.15.1 NreA/NreB-Interaktion mittels HPINE

Die HPINE-Experimente mit Wildtyp-Formen von NreA und NreB zeigten *in vivo* eine Interaktion unter aeroben Bedingungen zwischen NreA und NreB in *E. coli* (Koch-Singenstreu, 2013). Aus diesem Grund sollten die HPINE-Versuche mit den NreA-Varianten wiederholt werden, um die Interaktionsstellen zu verifizieren. Allerdings konnten die wildtypische Interaktion zwischen NreA und NreB nicht reproduziert werden, da die Proteine nicht zusammen co-eluierten. Um den physiologischen Bedingungen des NreABC-Systems näher zu kommen, wurde deswegen eine modifizierte Version der HPINE-Methode durchgeführt. Dabei wurden die beiden Proteine separat überproduziert: NreA in *E. coli* und NreB in *S. carnosus*. Nach der Überproduktion wurden die Zellen anaerob gemischt und aufgeschlossen. Es folgte das anaerobe Crosslinking mit Formaldehyd mit anschließender Aufreinigung über die entsprechenden Tags. Mit Hilfe dieser Methode konnte ebenso wenig eine wildtypische NreA/NreB-Interaktion detektiert werden (Abb. A 8). Die in *E. coli* durchgeführte HPINE-Methode eignet sich demnach nicht, um die Interaktionen der Proteine des NreABC-Systems aus *S. carnosus* zu untersuchen.

5.16 Bildet NreA Dimere aus?

Neben den *in vivo* BACTH-Studien wurde die NreA-Dimerisierung *in vitro* mittels Formaldehyd-Crosslinkings nachgewiesen (Koch-Singenstreu, 2013). Die Studien des oxidativen Cystein-Crosslinkings unterstützen die Ausbildung von NreA-Dimeren.

Im Gegensatz dazu wurde NreA in der Kristallisation (Niemann *et al.*, 2014) sowie in den *in vivo* HPINE-Versuchen (Koch-Singenstreu, 2013), nur als Monomer detektiert. Die neuen BACTH-Studien zeigten in der exponentiellen Phase ebenfalls keine Interaktion der NreA-Monomer unabhängig vom Vorhandensein von NreB und NreC (Klein, 2018). Während der Gelfiltrationsstudien konnte wildtypisches und mutiertes NreA nur als Monomer identifiziert werden. Alle diese Daten sprechen für einen monomeren Zustand von NreA. Es ist jedoch nicht klar, wieso in den früheren BACTH-Experimenten (Abb. 31, Abb. 32; Nilkens *et al.* (2014); Koch-Singenstreu (2013); Barth (2014)) NreA mit sich selbst interagiert. Die partielle Dimerisierung in den Crosslink-Experimenten lässt sich

Die Identifizierung von Interaktionsstellen innerhalb verschiedener Proteine eines Systems ist schwierig. Im marinen Bakterium *Pseudoalteromonas atlanticum* existiert das ZKS HahK-HarR (H-NOX-associated histidine kinase/response regulator), welches zusammen mit dem H-NOX (Heme-nitric oxide/oxygen binding) Protein in Abhängigkeit von NO die Biofilmproduktion reguliert. H-NOX agiert dabei als NO-Sensor, welcher wiederum die Autophosphorylierung der Kinase moduliert. Die Interaktionsstellen der einzelnen Proteine konnten bis jetzt nicht identifiziert werden (Arora & Boon, 2012). Um mögliche Interaktionsstellen von Proteinen berechnen zu können, sind Kristallstrukturen aller beteiligten Proteine von Nöten. Des Weiteren erfassen Interaktionsstudien nur die aktuelle Interaktion zum Zeitpunkt der Untersuchung. Es ist gut vorstellbar, dass es sich bei dem NreABC-System um ein dynamisches System handelt, in dem die Proteine keine starren Komplexe ausbilden. Dies wird vor allem durch die Phasenabhängigkeit der BACTH-Studien deutlich. Demnach herrscht abhängig vom durchgeführten Zeitpunkt der Messung in der Zelle eine eventuell andere Interaktionssituation, was in widersprüchlichen Ergebnissen resultiert.

6 Literatur

- Alam, M. S., Garg, S. K., & Agrawal, P. (2007). Molecular function of WhiB4/Rv3681c of Mycobacterium tuberculosis H37Rv: a [4Fe-4S] cluster co-ordinating protein disulphide reductase. *Mol Microbiol*, 63(5), 1414-1431
- Alam, M. S., Garg, S. K., & Agrawal, P. (2009). Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Febs j*, 276(1), 76-93
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402
- Andreae, C. A., Titball, R. W., & Butler, C. S. (2014). Influence of the molybdenum cofactor biosynthesis on anaerobic respiration, biofilm formation and motility in Burkholderia thailandensis. *Res Microbiol*, 165(1), 41-49
- Anjum, M. F., Green, J., & Guest, J. R. (2000). YeiL, the third member of the CRP-FNR family in Escherichia coli. *Microbiology*, 146 Pt 12, 3157-3170
- Antelmann, H., & Helmann, J. D. (2011). Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 14(6), 1049-1063
- Anthamatten, D., Scherb, B., & Hennecke, H. (1992). Characterization of a fixLJ-regulated Bradyrhizobium japonicum gene sharing similarity with the Escherichia coli fnr and Rhizobium meliloti fixK genes. *J Bacteriol*, 174(7), 2111-2120
- Arai, H., Kodama, T., & Igarashi, Y. (1997). Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol*, 25(6), 1141-1148
- Aravind, L., & Ponting, C. P. (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci*, 22(12), 458-459
- Arora, D. P., & Boon, E. M. (2012). Nitric oxide regulated two-component signaling in Pseudoalteromonas atlantica. *Biochem Biophys Res Commun*, 421(3), 521-526
- Asen, I., Djuranovic, S., Lupas, A. N., & Zeth, K. (2009). Crystal structure of SpoVT, the final modulator of gene expression during spore development in Bacillus subtilis. *J Mol Biol*, 386(4), 962-975
- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., & Hiramatsu, K. (2009). Complete genome sequence of Macrocooccus caseolyticus strain JCSCS5402, [corrected] reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J Bacteriol*, 191(4), 1180-1190
- Bannan, J. D., Moran, M. J., MacInnes, J. I., Soltes, G. A., & Friedman, R. L. (1993). Cloning and characterization of btr, a Bordetella pertussis gene encoding an FNR-like transcriptional regulator. *J Bacteriol*, 175(22), 7228-7235
- Barth, C. (2014). *Charakterisierung einer potentiellen Interaktionsfläche des Nitratsensors NreA aus Staphylococcus carnosus*. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Bartolini, E., Frigimelica, E., Giovanazzi, S., Galli, G., Shaik, Y., Genco, C., Welsch, J. A., Granoff, D. M., Grandi, G., & Grifantini, R. (2006). Role of FNR and FNR-regulated, sugar fermentation genes in Neisseria meningitidis infection. *Mol Microbiol*, 60(4), 963-972
- Bates, D. M., Lazazzera, B. A., & Kiley, P. J. (1995). Characterization of FNR* mutant proteins indicates two distinct mechanisms for altering oxygen regulation of the Escherichia coli transcription factor FNR. *J Bacteriol*, 177(14), 3972-3978
- Batut, J., & Boistard, P. (1994). Oxygen control in Rhizobium. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66(1-3), 129-150
- Batut, J., Daveran-Mingot, M. L., David, M., Jacobs, J., Garnerone, A. M., & Kahn, D. (1989). fixK, a gene homologous with fnr and crp from Escherichia coli, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in Rhizobium meliloti. *Embo j*, 8(4), 1279-1286
- Becker, S., Holighaus, G., Gabrielczyk, T., & Unden, G. (1996). O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 178(15), 4515-4521
- Beinert, H., Holm, R. H., & Munck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*, 277(5326), 653-659

- Beinert, H., & Kennedy, M. C. (1989). 19th Sir Hans Krebs lecture. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanism of iron-sulfur enzymes. *Eur J Biochem*, *186*(1-2), 5-15
- Bekker, M., Alexeeva, S., Laan, W., Sawers, G., Teixeira de Mattos, J., & Hellingwerf, K. (2010). The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool. *J Bacteriol*, *192*(3), 746-754
- Beliaev, A. S., Thompson, D. K., Fields, M. W., Wu, L., Lies, D. P., Nealson, K. H., & Zhou, J. (2002). Microarray transcription profiling of a *Shewanella oneidensis* *etrA* mutant. *J Bacteriol*, *184*(16), 4612-4616
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Res*, *33*(Database issue), D34-38
- Bian, S., & Cowan, J. A. (1999). Protein-bound iron-sulfur centers. Form, function, and assembly. *Coordination Chemistry Reviews*, *190-192*, 1049-1066
- Bolann, B. J., & Ulvik, R. J. (1993). Decay of superoxide catalyzed by ferritin. *FEBS Lett*, *318*(2), 149-152
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254
- Brekasis, D., & Paget, M. S. (2003). A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Embo j*, *22*(18), 4856-4865
- Brioukhanov, A. L., & Netrusov, A. I. (2007). Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *43*(6), 567-582
- Broderick, J. B., Duffus, B. R., Duschene, K. S., & Shepard, E. M. (2014). Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chem Rev*, *114*(8), 4229-4317
- Brown, N. M., Kennedy, M. C., Antholine, W. E., Eisenstein, R. S., & Walden, W. E. (2002). Detection of a [3Fe-4S] cluster intermediate of cytosolic aconitase in yeast expressing iron regulatory protein 1. Insights into the mechanism of Fe-S cluster cycling. *J Biol Chem*, *277*(9), 7246-7254
- Brumm, P. J., Land, M. L., & Mead, D. A. (2015). Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Stand Genomic Sci*, *10*, 73
- Bruns, A., Rohde, M., & Berthe-Corti, L. (2001). *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, *51*(Pt 6), 1997-2006
- Buettner, F. F., Bendalla, I. M., Bosse, J. T., Meens, J., Nash, J. H., Hartig, E., Langford, P. R., & Gerlach, G. F. (2009). Analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* HlyX (FNR) regulon and identification of iron-regulated protein B as an essential virulence factor. *Proteomics*, *9*(9), 2383-2398
- Buis, J. M., & Broderick, J. B. (2005). Pyruvate formate-lyase activating enzyme: elucidation of a novel mechanism for glyxyl radical formation. *Arch Biochem Biophys*, *433*(1), 288-296
- Busby, S., & Ebright, R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*, *293*(2), 199-213
- Busby, S., & Kolb, A. (1996). The CAP Modulon. In E. C. C. Lin & A. S. Lynch (Eds.), *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli* (pp. 255-279). New York: Chapman & Hall.
- Calzolari, L., Gorst, C. M., Zhao, Z. H., Teng, Q., Adams, M. W., & La Mar, G. N. (1995). 1H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry*, *34*(36), 11373-11384
- Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L., & Takai, K. (2006). The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nat Rev Microbiol*, *4*(6), 458-468
- Canfield, D. E., Habicht, K. S., & Thamdrup, B. (2000). The Archean sulfur cycle and the early history of atmospheric oxygen. *Science*, *288*(5466), 658-661
- Canfield, D. E., & Teske, A. (1996). Late Proterozoic rise in atmospheric oxygen concentration inferred from phylogenetic and sulphur-isotope studies. *Nature*, *382*(6587), 127-132

- Cao, B., Ma, T., Ren, Y., Ren, Y., Li, G., Li, P., Guo, X., Ding, P., & Feng, L. (2011). Complete genome sequence of *Pusillimonas* sp. T7-7, a cold-tolerant diesel oil-degrading bacterium isolated from the Bohai Sea in China. *J Bacteriol*, *193*(15), 4021-4022
- Carreto, L., Moore, E., Nobre, M. F., Wait, R., Riley, P. W., Sharp, R. J., & Da Costa, M. S. (1996). *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a New Thermophilic Species Isolated from a Thermally Polluted Effluent. *Int J Syst Evol Microbiol*, *46*(2), 460-465
- Casonato, S., Cervantes Sanchez, A., Haruki, H., Rengifo Gonzalez, M., Provvedi, R., Dainese, E., Jaouen, T., Gola, S., Bini, E., Vicente, M., Johnsson, K., Ghisotti, D., Palu, G., Hernandez-Pando, R., & Manganelli, R. (2012). WhiB5, a transcriptional regulator that contributes to *Mycobacterium tuberculosis* virulence and reactivation. *Infect Immun*, *80*(9), 3132-3144
- Chapleau, M., Guertin, J. F., Farrokhi, A., Lerat, S., Burrus, V., & Beaulieu, C. (2016). Identification of genetic and environmental factors stimulating excision from *Streptomyces scabiei* chromosome of the toxicogenic region responsible for pathogenicity. *Mol Plant Pathol*, *17*(4), 501-509
- Chawla, M., Parikh, P., Saxena, A., Munshi, M., Mehta, M., Mai, D., Srivastava, A. K., Narasimhulu, K. V., Redding, K. E., Vashi, N., Kumar, D., Steyn, A. J., & Singh, A. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB4 regulates oxidative stress response to modulate survival and dissemination in vivo. *Mol Microbiol*, *85*(6), 1148-1165
- Chen, W., Wang, Y., Li, D., Li, L., Xiao, Q., & Zhou, Q. (2012). Draft genome sequence of *Brevibacillus brevis* strain X23, a biocontrol agent against bacterial wilt. *J Bacteriol*, *194*(23), 6634-6635
- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Sussmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol*, *25*(9), 1007-1014
- Chin, K. J., Liesack, W., & Janssen, P. H. (2001). *Opiritatus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, *51*(Pt 6), 1965-1968
- Cho, K. H., Cho, D., Wang, G. R., & Salyers, A. A. (2001). New regulatory gene that contributes to control of *Bacteroides thetaiotaomicron* starch utilization genes. *J Bacteriol*, *183*(24), 7198-7205
- Choi, W. W., Park, S. D., Lee, S. M., Kim, H. B., Kim, Y., & Lee, H. S. (2009). The *whcA* gene plays a negative role in oxidative stress response of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*, *290*(1), 32-38
- Colonna-Romano, S., Arnold, W., Schluter, A., Boistard, P., Puhler, A., & Priefer, U. B. (1990). An Fnr-like protein encoded in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* shows structural and functional homology to *Rhizobium meliloti* FixK. *Mol Gen Genet*, *223*(1), 138-147
- Consortium, T. U. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, *45*(D1), D158-d169
- Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K. W., Detter, J. C., Del Rio, T. G., Hammon, N., Dalin, E., Tice, H., Pitluck, S., Bruce, D., Goodwin, L., Han, C., Tapia, R., Saunders, E., Schmutz, J., Brettin, T., Larimer, F., Land, M., Hauser, L., Vargas, C., Nieto, J. J., Kyrpides, N. C., Ivanova, N., Goker, M., Klenk, H. P., Csonka, L. N., & Woyke, T. (2011). Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11(T)). *Stand Genomic Sci*, *5*(3), 379-388
- Copeland, A., Spring, S., Goker, M., Schneider, S., Lapidus, A., Del Rio, T. G., Tice, H., Cheng, J. F., Chen, F., Nolan, M., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavrommatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. C., Meincke, L., Sims, D., Brettin, T., Detter, J. C., Han, C., Chain, P., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., & Lucas, S. (2009). Complete genome sequence of *Desulfomicrobium baculatum* type strain (X). *Stand Genomic Sci*, *1*(1), 29-37
- Crack, J., Green, J., & Thomson, A. J. (2004). Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem*, *279*(10), 9278-9286

- Crack, J. C., den Hengst, C. D., Jakimowicz, P., Subramanian, S., Johnson, M. K., Buttner, M. J., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2009). Characterization of [4Fe-4S]-containing and cluster-free forms of *Streptomyces* WhiD. *Biochemistry*, *48*(51), 12252-12264
- Crack, J. C., Gaskell, A. A., Green, J., Cheesman, M. R., Le Brun, N. E., & Thomson, A. J. (2008). Influence of the environment on the [4Fe-4S]₂⁺ to [2Fe-2S]₂⁺ cluster switch in the transcriptional regulator FNR. *J Am Chem Soc*, *130*(5), 1749-1758
- Crack, J. C., Green, J., Cheesman, M. R., Le Brun, N. E., & Thomson, A. J. (2007). Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(7), 2092-2097
- Crack, J. C., Green, J., Hutchings, M. I., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2012a). Bacterial iron-sulfur regulatory proteins as biological sensor-switches. *Antioxid Redox Signal*, *17*(9), 1215-1231
- Crack, J. C., Green, J., Le Brun, N. E., & Thomson, A. J. (2006). Detection of sulfide release from the oxygen-sensing [4Fe-4S] cluster of FNR. *J Biol Chem*, *281*(28), 18909-18913
- Crack, J. C., Green, J., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2012b). Iron-sulfur cluster sensor-regulators. *Curr Opin Chem Biol*, *16*(1-2), 35-44
- Crack, J. C., Green, J., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2014a). Iron-sulfur clusters as biological sensors: the chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *Acc Chem Res*, *47*(10), 3196-3205
- Crack, J. C., Hutchings, M. I., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2016). Biochemical properties of *Paracoccus denitrificans* FnrP: reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *J Biol Inorg Chem*, *21*(1), 71-82
- Crack, J. C., & Le Brun, N. E. (2017). Redox-sensing iron-sulfur cluster regulators. *Antioxid Redox Signal*
- Crack, J. C., Stapleton, M. R., Green, J., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2014b). Influence of association state and DNA binding on the O(2)-reactivity of [4Fe-4S] fumarate and nitrate reduction (FNR) regulator. *Biochem J*, *463*(1), 83-92
- Crack, J. C., Thomson, A. J., & Le Brun, N. E. (2017). Mass spectrometric identification of intermediates in the O₂-driven [4Fe-4S] to [2Fe-2S] cluster conversion in FNR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(16), E3215-E3223
- Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A., & Glaser, P. (1995). Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *Embo j*, *14*(23), 5984-5994
- Cruz-Garcia, C., Murray, A. E., Rodrigues, J. L., Gralnick, J. A., McCue, L. A., Romine, M. F., Löffler, F. E., & Tiedje, J. M. (2011). Fnr (EtrA) acts as a fine-tuning regulator of anaerobic metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol*, *11*, 64
- Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M. N., Scott, C., Thomson, A. J., Green, J., & Poole, R. K. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *Embo j*, *21*(13), 3235-3244
- Davidson, E., Ohnishi, T., Atta-Asafo-Adjei, E., & Daldal, F. (1992). Potential ligands to the [2Fe-2S] Rieske cluster of the cytochrome bc₁ complex of *Rhodobacter capsulatus* probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, *31*(13), 3342-3351
- Dibden, D. P., & Green, J. (2005). In vivo cycling of the *Escherichia coli* transcription factor FNR between active and inactive states. *Microbiology*, *151*(Pt 12), 4063-4070
- Dispensa, M., Thomas, C. T., Kim, M. K., Perrotta, J. A., Gibson, J., & Harwood, C. S. (1992). Anaerobic growth of *Rhodospseudomonas palustris* on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J Bacteriol*, *174*(18), 5803-5813
- Dobritzsch, D., Schneider, G., Schnackerz, K. D., & Lindqvist, Y. (2001). Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *Embo j*, *20*(4), 650-660
- Domenech, P., Barry, C. E., 3rd, & Cole, S. T. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol*, *4*(1), 28-34

- Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., Sanyal, I., Flint, D. H., & Johnson, M. K. (1997). [2Fe-2S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry*, *36*(39), 11811-11820
- Edwards, J., Cole, L. J., Green, J. B., Thomson, M. J., Wood, A. J., Whittingham, J. L., & Moir, J. W. (2010). Binding to DNA protects *Neisseria meningitidis* fumarate and nitrate reductase regulator (FNR) from oxygen. *J Biol Chem*, *285*(2), 1105-1112
- Elvers, K. T., Turner, S. M., Wainwright, L. M., Marsden, G., Hinds, J., Cole, J. A., Poole, R. K., Penn, C. W., & Park, S. F. (2005). NssR, a member of the Crp-Fnr superfamily from *Campylobacter jejuni*, regulates a nitrosative stress-responsive regulon that includes both a single-domain and a truncated haemoglobin. *Mol Microbiol*, *57*(3), 735-750
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka, K. K., Koenig, S. S., Creasy, H. H., Rosovitz, M. J., Riley, D. R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L. D., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J., & Vary, P. S. (2011). Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J Bacteriol*, *193*(16), 4199-4213
- Eselin, J., Jouanneau, Y., & Duport, C. (2012). *Bacillus cereus* Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR. *BMC Microbiol*, *12*, 125
- Falke, J. J., Dernburg, A. F., Sternberg, D. A., Zalkin, N., Milligan, D. L., & Koshland, D. E., Jr. (1988). Structure of a bacterial sensory receptor. A site-directed sulfhydryl study. *J Biol Chem*, *263*(29), 14850-14858
- Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B., & Gotz, F. (2002). The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the narT gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. *J Bacteriol*, *184*(23), 6624-6634
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., Tang, Y., Liu, X., Han, W., Peng, X., Liu, R., & Wang, L. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(13), 5602-5607
- Finneran, K. T., Johnsen, C. V., & Lovley, D. R. (2003). *Rhodoferrax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *Int J Syst Evol Microbiol*, *53*(Pt 3), 669-673
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev*, *58*(3), 352-386
- Fisher, E., Dawson, A. M., Polshyna, G., Lisak, J., Crable, B., Perera, E., Ranganathan, M., Thangavelu, M., Basu, P., & Stolz, J. F. (2008). Transformation of inorganic and organic arsenic by *Alkaliphilus oremlandii* sp. nov. strain OhILAs. *Ann N Y Acad Sci*, *1125*, 230-241
- Fonknechten, N., Chaussonnerie, S., Tricot, S., Lajus, A., Andreesen, J. R., Perchat, N., Pelletier, E., Gouyvenoux, M., Barbe, V., Salanoubat, M., Le Paslier, D., Weissenbach, J., Cohen, G. N., & Kreimeyer, A. (2010). *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics*, *11*, 555
- Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nat Chem Biol*, *2*(4), 171-174
- Fu, W. G., Morgan, T. V., Mortenson, L. E., & Johnson, M. K. (1991). Resonance Raman studies of the [4Fe-4S] to [2Fe-2S] cluster conversion in the iron protein of nitrogenase. *FEBS Lett*, *284*(2), 165-168
- Fuangthong, M., & Helmann, J. D. (2002). The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(10), 6690-6695
- Fuchs, G., Eitinger, T., & Schlegel, H. G. (2014). *Allgemeine Mikrobiologie*: Thieme.
- Galimand, M., Gamper, M., Zimmermann, A., & Haas, D. (1991). Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, *173*(5), 1598-1606
- Geiman, D. E., Raghunand, T. R., Agarwal, N., & Bishai, W. R. (2006). Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis* whiB-like genes. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(8), 2836-2841

- Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G., & Perutz, M. F. (1995). Kinase activity of oxygen sensor FixL depends on the spin state of its heme iron. *Biochemistry*, *34*(1), 232-236
- Glavina Del Rio, T., Abt, B., Spring, S., Lapidus, A., Nolan, M., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J. F., Chen, F., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Chain, P., Saunders, E., Detter, J. C., Brettin, T., Rohde, M., Goker, M., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., & Lucas, S. (2010). Complete genome sequence of *Chitinophaga pinensis* type strain (UQM 2034). *Stand Genomic Sci*, *2*(1), 87-95
- Gogarten, J. P., & Townsend, J. P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol*, *3*(9), 679-687
- Goker, M., Gronow, S., Zeytun, A., Nolan, M., Lucas, S., Lapidus, A., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J. F., Pitluck, S., Liolios, K., Pagani, I., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Jeffries, C. D., Brambilla, E. M., Rohde, M., Detter, J. C., Woyke, T., Bristow, J., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Eisen, J. A., Kyrpides, N. C., & Klenk, H. P. (2011). Complete genome sequence of *Odoribacter splanchnicus* type strain (1651/6). *Stand Genomic Sci*, *4*(2), 200-209
- Gostick, D. O., Green, J., Irvine, A. S., Gasson, M. J., & Guest, J. R. (1998). A novel regulatory switch mediated by the FNR-like protein of *Lactobacillus casei*. *Microbiology*, *144* (Pt 3), 705-717
- Gostick, D. O., Griffin, H. G., Shearman, C. A., Scott, C., Green, J., Gasson, M. J., & Guest, J. R. (1999). Two operons that encode FNR-like proteins in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*, *31*(5), 1523-1535
- Götz, F., & Schumacher, B. (1987). Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiology Letters*, *40*(2), 285-288
- Grabbe, R., Klopprogge, K., & Schmitz, R. A. (2001). Fnr is required for NifL-dependent oxygen control of nif gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*, *183*(4), 1385-1393
- Gradstein, F. M. (2012). *The Geologic Time Scale 2012*: Elsevier.
- Green, J., & Baldwin, M. L. (1997). HlyX, the FNR homologue of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, is a [4Fe-4S]-containing oxygen-responsive transcription regulator that anaerobically activates FNR-dependent class I promoters via an enhanced AR1 contact. *Mol Microbiol*, *24*(3), 593-605
- Green, J., Crack, J. C., Thomson, A. J., & LeBrun, N. E. (2009). Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol*, *12*(2), 145-151
- Green, J., Irvine, A. S., Meng, W., & Guest, J. R. (1996). FNR-DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters. *Mol Microbiol*, *19*(1), 125-137
- Green, J., & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol*, *2*(12), 954-966
- Green, J., Sharrocks, A. D., Green, B., Geisow, M., & Guest, J. R. (1993). Properties of FNR proteins substituted at each of the five cysteine residues. *Mol Microbiol*, *8*(1), 61-68
- Gronow, S., Welnitz, S., Lapidus, A., Nolan, M., Ivanova, N., Glavina Del Rio, T., Copeland, A., Chen, F., Tice, H., Pitluck, S., Cheng, J. F., Saunders, E., Brettin, T., Han, C., Detter, J. C., Bruce, D., Goodwin, L., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Pati, A., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Rohde, M., Goker, M., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., & Lucas, S. (2010). Complete genome sequence of *Veillonella parvula* type strain (Te3). *Stand Genomic Sci*, *2*(1), 57-65
- Gruner, I., Fradrich, C., Bottger, L. H., Trautwein, A. X., Jahn, D., & Hartig, E. (2011). Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing [4Fe-4S]₂⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. *J Biol Chem*, *286*(3), 2017-2021
- Guest, J. R. (1995). The Leeuwenhoek Lecture, 1995. Adaptation to life without oxygen. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *350*(1332), 189-202
- Hartig, E., & Jahn, D. (2012). Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. *Adv Microb Physiol*, *61*, 195-216
- He, P., Hao, K., Blom, J., Ruckert, C., Vater, J., Mao, Z., Wu, Y., Hou, M., He, P., He, Y., & Borriss, R. (2012). Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *J Biotechnol*, *164*(2), 281-291

- Hebert, L., Moumen, B., Pons, N., Duquesne, F., Breuil, M. F., Goux, D., Batto, J. M., Laugier, C., Renault, P., & Petry, S. (2012). Genomic characterization of the *Taylorella* genus. *PLoS One*, *7*(1), e29953
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H. P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., & Fritz, H. J. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol*, *22*(5), 547-553
- Hillion, M., & Antelmann, H. (2015). Thiol-based redox switches in prokaryotes. *Biol Chem*, *396*(5), 415-444
- Ho, Y. S., Burden, L. M., & Hurley, J. H. (2000). Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *Embo j*, *19*(20), 5288-5299
- Holland, H. D. (1999). When did the Earth's atmosphere become oxic? A Reply. *Geochem News*, *100*, 20-22
- Holm, R. H., & Lo, W. (2016). Structural Conversions of Synthetic and Protein-Bound Iron-Sulfur Clusters. *Chem Rev*, *116*(22), 13685-13713
- Hoppe, A., Pandelia, M. E., Gartner, W., & Lubitz, W. (2011). [Fe(4)S(4)]- and [Fe(3)S(4)]-cluster formation in synthetic peptides. *Biochim Biophys Acta*, *1807*(11), 1414-1422
- Huynh, T. N., Noriega, C. E., & Stewart, V. (2010). Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(49), 21140-21145
- Ibrahim, S. A., Crack, J. C., Rolfe, M. D., Borrero-de Acuna, J. M., Thomson, A. J., Le Brun, N. E., Schobert, M., Stapleton, M. R., & Green, J. (2015). Three *Pseudomonas putida* FNR Family Proteins with Different Sensitivities to O₂. *J Biol Chem*, *290*(27), 16812-16823
- Imlay, J. A. (2002). How oxygen damages microbes: oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Adv Microb Physiol*, *46*, 111-153
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, *57*, 395-418
- Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol*, *59*(4), 1073-1082
- Imlay, J. A. (2008a). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*, *77*, 755-776
- Imlay, J. A. (2008b). How obligatory is anaerobiosis? *Mol Microbiol*, *68*(4), 801-804
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*, *11*(7), 443-454
- Iuchi, S., Cameron, D. C., & Lin, E. C. (1989). A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *171*(2), 868-873
- Iuchi, S., & Lin, E. C. (1988). *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(6), 1888-1892
- Jakimowicz, P., Cheesman, M. R., Bishai, W. R., Chater, K. F., Thomson, A. J., & Buttner, M. J. (2005). Evidence that the *Streptomyces* developmental protein WhiD, a member of the WhiB family, binds a [4Fe-4S] cluster. *J Biol Chem*, *280*(9), 8309-8315
- Jervis, A. J., Crack, J. C., White, G., Artymiuk, P. J., Cheesman, M. R., Thomson, A. J., Le Brun, N. E., & Green, J. (2009). The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(12), 4659-4664
- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & de Lajudie, P. (2004). *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*(Pt 6), 2269-2273
- Kaminski, P. A., Mandon, K., Arigoni, F., Desnoues, N., & Elmerich, C. (1991). Regulation of nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*: identification of a *fixK*-like gene, a positive regulator of *nifA*. *Mol Microbiol*, *5*(8), 1983-1991
- Kamps, A., Achebach, S., Fedtke, I., Uden, G., & Gotz, F. (2004). Staphylococcal NreB: an O(2)-sensing histidine protein kinase with an O(2)-labile iron-sulphur cluster of the FNR type. *Mol Microbiol*, *52*(3), 713-723

- Kaneko, J., Yamada-Narita, S., Abe, N., Onodera, T., Kan, E., Kojima, S., Miyazaki, T., Yamamoto, Y., Oguchi, A., Ankai, A., Ichikawa, N., Nakazawa, H., Fukui, S., Takahashi, M., Yamazaki, S., Fujita, N., & Kamio, Y. (2015). Complete genome sequence of *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* will accelerate further understanding of the nature of the class Negativicutes. *FEMS Microbiol Lett*, *362*(9)
- Kargalioglu, Y., & Imlay, J. A. (1994). Importance of anaerobic superoxide dismutase synthesis in facilitating outgrowth of *Escherichia coli* upon entry into an aerobic habitat. *J Bacteriol*, *176*(24), 7653-7658
- Karimova, G., Dautin, N., & Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol*, *187*(7), 2233-2243
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(10), 5752-5756
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, *30*(4), 772-780
- Kern, M., & Simon, J. (2016). Three transcription regulators of the Nss family mediate the adaptive response induced by nitrate, nitric oxide or nitrous oxide in *Wolinella succinogenes*. *Environ Microbiol*, *18*(9), 2899-2912
- Khoroshilova, N., Beinert, H., & Kiley, P. J. (1995). Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(7), 2499-2503
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H., & Kiley, P. J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(12), 6087-6092
- Kiley, P. J., & Beinert, H. (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev*, *22*(5), 341-352
- Kiley, P. J., & Reznikoff, W. S. (1991). Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen. *J Bacteriol*, *173*(1), 16-22
- Kim, S. H., Harzman, C., Davis, J. K., Hutcheson, R., Broderick, J. B., Marsh, T. L., & Tiedje, J. M. (2012). Genome sequence of *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2, a Gram-positive anaerobe capable of dehalogenation and metal reduction. *BMC Microbiol*, *12*, 21
- Kim, T. H., Park, J. S., Kim, H. J., Kim, Y., Kim, P., & Lee, H. S. (2005). The *whcE* gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, *337*(3), 757-764
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., Fiers, M. W., Stiekema, W., Lankhorst, R. M., Bron, P. A., Hoffer, S. M., Groot, M. N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M., & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(4), 1990-1995
- Klein, R. (2018). *Dephosphorylierungs- und Interaktionsstudien im NreABC-System von Staphylococcus carnosus*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Klinger, A., Schirawski, J., Glaser, P., & Uden, G. (1998). The *fnr* gene of *Bacillus licheniformis* and the cysteine ligands of the C-terminal FeS cluster. *J Bacteriol*, *180*(13), 3483-3485
- Klippel, B., Lochner, A., Bruce, D. C., Davenport, K. W., Detter, C., Goodwin, L. A., Han, J., Han, S., Land, M. L., Mikhailova, N., Nolan, M., Pennacchio, L., Pitluck, S., Tapia, R., Woyke, T., Wiebusch, S., Basner, A., Abe, F., Horikoshi, K., Keller, M., & Antranikian, G. (2011). Complete genome sequence of the marine cellulose- and xylan-degrading bacterium *Glaciecola* sp. strain 4H-3-7+YE-5. *J Bacteriol*, *193*(17), 4547-4548
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., Kawai, S., & Ito, S. (1995). Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16. *Appl Microbiol Biotechnol*, *43*(3), 473-481
- Koch, H., Lucker, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P. H., Wagner, M., & Daims, H. (2015). Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(36), 11371-11376

- Koch-Singenstreu, M. (2013). *Das GAF-Domänen-Protein NreA : ein neuartiger Nitratrezeptor aus Staphylococcus carnosus*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Konar, M., Alam, M. S., Arora, C., & Agrawal, P. (2012). WhiB2/Rv3260c, a cell division-associated protein of Mycobacterium tuberculosis H37Rv, has properties of a chaperone. *Febs j*, 279(15), 2781-2792
- Korner, H., Sofia, H. J., & Zumft, W. G. (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev*, 27(5), 559-592
- Kumka, J. E., & Bauer, C. E. (2015). Analysis of the FnrL regulon in Rhodobacter capsulatus reveals limited regulon overlap with orthologues from Rhodobacter sphaeroides and Escherichia coli. *BMC Genomics*, 16, 895
- Labutti, K., Sikorski, J., Schneider, S., Nolan, M., Lucas, S., Glavina Del Rio, T., Tice, H., Cheng, J. F., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Tindall, B. J., Rohde, M., Goker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., & Lapidus, A. (2010). Complete genome sequence of Planctomyces limnophilus type strain (Mu 290). *Stand Genomic Sci*, 3(1), 47-56
- Lal, S., & Tabacchioni, S. (2009). Ecology and biotechnological potential of Paenibacillus polymyxa: a minireview. *Indian J Microbiol*, 49(1), 2-10
- Larsson, C., Luna, B., Ammerman, N. C., Maiga, M., Agarwal, N., & Bishai, W. R. (2012). Gene expression of Mycobacterium tuberculosis putative transcription factors whiB1-7 in redox environments. *PLoS One*, 7(7), e37516
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., & Stout, C. D. (1992). Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry*, 31(10), 2735-2748
- Laukel, M., Rossignol, M., Borderies, G., Volker, U., & Vorholt, J. A. (2004). Comparison of the proteome of Methylobacterium extorquens AM1 grown under methylotrophic and nonmethylotrophic conditions. *Proteomics*, 4(5), 1247-1264
- Layer, G., Kervio, E., Morlock, G., Heinz, D. W., Jahn, D., Retey, J., & Schubert, W. D. (2005). Structural and functional comparison of HemN to other radical SAM enzymes. *Biol Chem*, 386(10), 971-980
- Lazarev, V. N., Levitskii, S. A., Basovskii, Y. I., Chukin, M. M., Akopian, T. A., Vereshchagin, V. V., Kostrjukova, E. S., Kovaleva, G. Y., Kazanov, M. D., Malko, D. B., Vitreschak, A. G., Sernova, N. V., Gelfand, M. S., Demina, I. A., Serebryakova, M. V., Galyamina, M. A., Vtyurin, N. N., Rogov, S. I., Alexeev, D. G., Ladygina, V. G., & Govorun, V. M. (2011). Complete genome and proteome of Acholeplasma laidlawii. *J Bacteriol*, 193(18), 4943-4953
- Lazazzera, B. A., Bates, D. M., & Kiley, P. J. (1993). The activity of the Escherichia coli transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev*, 7(10), 1993-2005
- Lazazzera, B. A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M. C., & Kiley, P. J. (1996). DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from Escherichia coli are regulated by oxygen. *J Biol Chem*, 271(5), 2762-2768
- Lee, D. S., Kim, P., Kim, E. S., Kim, Y., & Lee, H. S. (2017). Corynebacterium glutamicum WhcD interacts with WhiA to exert a regulatory effect on cell division genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*
- Lee, G. F., Lebert, M. R., Lilly, A. A., & Hazelbauer, G. L. (1995). Transmembrane signaling characterized in bacterial chemoreceptors by using sulfhydryl cross-linking in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3391-3395
- Lee, J. Y., Park, J. S., Kim, H. J., Kim, Y., & Lee, H. S. (2012). Corynebacterium glutamicum whcB, a stationary phase-specific regulatory gene. *FEMS Microbiol Lett*, 327(2), 103-109
- Levy, C., Pike, K., Heyes, D. J., Joyce, M. G., Gabor, K., Smidt, H., van der Oost, J., & Leys, D. (2008). Molecular basis of halorespiration control by CprK, a CRP-FNR type transcriptional regulator. *Mol Microbiol*, 70(1), 151-167
- Lewis, A. H., & Falkinham, J. O., 3rd. (2015). Microaerobic growth and anaerobic survival of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare and Mycobacterium scrofulaceum. *Int J Mycobacteriol*, 4(1), 25-30

- Lofblom, J., Kronqvist, N., Uhlen, M., Stahl, S., & Wernerus, H. (2007). Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *J Appl Microbiol*, *102*(3), 736-747
- Lovgreen, M. N., Martic, M., Windahl, M. S., Christensen, H. E., & Harris, P. (2011). Crystal structures of the all-cysteinylyl-coordinated D14C variant of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin: [4Fe-4S] <--> [3Fe-4S] cluster conversion. *J Biol Inorg Chem*, *16*(5), 763-775
- Lubitz, W., Ogata, H., Rudiger, O., & Reijerse, E. (2014). Hydrogenases. *Chem Rev*, *114*(8), 4081-4148
- Lucker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damste, J. S., Spieck, E., Le Paslier, D., & Daims, H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(30), 13479-13484
- Maghnouj, A., Abu-Bakr, A. A., Baumberg, S., Stalon, V., & Vander Wauven, C. (2000). Regulation of anaerobic arginine catabolism in *Bacillus licheniformis* by a protein of the Crp/Fnr family. *FEMS Microbiol Lett*, *191*(2), 227-234
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(36), 13318-13323
- Manodori, A., Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R. P., Werth, M. T., & Johnson, M. K. (1992). [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* fumarate reductase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, *31*(10), 2703-2712
- Mapolelo, D. T., Zhang, B., Naik, S. G., Huynh, B. H., & Johnson, M. K. (2012). Spectroscopic and functional characterization of iron-bound forms of *Azotobacter vinelandii* (Nif)IscA. *Biochemistry*, *51*(41), 8056-8070
- Martinez, S. E., Beavo, J. A., & Hol, W. G. (2002a). GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv*, *2*(5), 317-323
- Martinez, S. E., Wu, A. Y., Glavas, N. A., Tang, X. B., Turley, S., Hol, W. G., & Beavo, J. A. (2002b). The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(20), 13260-13265
- Math, R. K., Jin, H. M., Kim, J. M., Hahn, Y., Park, W., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2012). Comparative genomics reveals adaptation by *Alteromonas* sp. SN2 to marine tidal-flat conditions: cold tolerance and aromatic hydrocarbon metabolism. *PLoS One*, *7*(4), e35784
- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J., Holt, R., Brinkman, F. S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., & Eltis, L. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(42), 15582-15587
- Mead, D. A., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J. F., Bruce, D. C., Goodwin, L. A., Pitluck, S., Chertkov, O., Zhang, X., Detter, J. C., Han, C. S., Tapia, R., Land, M., Hauser, L. J., Chang, Y. J., Kyrpides, N. C., Ivanova, N. N., Ovchinnikova, G., Woyke, T., Brumm, C., Hochstein, R., Schoenfeld, T., & Brumm, P. (2012). Complete Genome Sequence of *Paenibacillus* strain Y4.12MC10, a Novel *Paenibacillus lautus* strain Isolated from Obsidian Hot Spring in Yellowstone National Park. *Stand Genomic Sci*, *6*(3), 381-400
- Mehta, M., Rajmani, R. S., & Singh, A. (2016). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 Responds to Vacuolar pH-induced Changes in Mycothiol Redox Potential to Modulate Phagosomal Maturation and Virulence. *J Biol Chem*, *291*(6), 2888-2903
- Melville, S. B., & Gunsalus, R. P. (1990). Mutations in *fnr* that alter anaerobic regulation of electron transport-associated genes in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(31), 18733-18736
- Messaoudi, K., Clavel, T., Schmitt, P., & Duport, C. (2010). Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73. *Res Microbiol*, *161*(1), 30-39

- Meyer, J. (2008). Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J Biol Inorg Chem*, *13*(2), 157-170
- Molle, V., Palframan, W. J., Findlay, K. C., & Buttner, M. J. (2000). WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, *182*(5), 1286-1295
- Monzel, C., & Unden, G. (2015). Transmembrane signaling in the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: A long-range piston-type displacement of transmembrane helix 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(35), 11042-11047
- Moore, L. J., & Kiley, P. J. (2001). Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor. *J Biol Chem*, *276*(49), 45744-45750
- Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D. J., McKay, L. L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., & Hattori, M. (2008). Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res*, *15*(3), 151-161
- Morris, R. P., Nguyen, L., Gatfield, J., Visconti, K., Nguyen, K., Schnappinger, D., Ehrt, S., Liu, Y., Heifets, L., Pieters, J., Schoolnik, G., & Thompson, C. J. (2005). Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(34), 12200-12205
- Muhd Sakaff, M. K., Abdul Rahman, A. Y., Saito, J. A., Hou, S., & Alam, M. (2012). Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans* CCB_US3_UF5. *J Bacteriol*, *194*(5), 1239
- Mukhopadhyay, A., Redding, A. M., Joachimiak, M. P., Arkin, A. P., Borglin, S. E., Dehal, P. S., Chakraborty, R., Geller, J. T., Hazen, T. C., He, Q., Joyner, D. C., Martin, V. J., Wall, J. D., Yang, Z. K., Zhou, J., & Keasling, J. D. (2007). Cell-wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol*, *189*(16), 5996-6010
- Mulder, N. J., Zappe, H., & Steyn, L. M. (1999). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* homologue of the *Streptomyces coelicolor* whiB gene. *Tuber Lung Dis*, *79*(5), 299-308
- Mulholland, S. E., Gibney, B. R., Rabanal, F., & Dutton, P. L. (1999). Determination of nonligand amino acids critical to [4Fe-4S]₂^{+/+} assembly in ferredoxin maquettes. *Biochemistry*, *38*(32), 10442-10448
- Mulliez, E., Ollagnier-de Choudens, S., Meier, C., Cremonini, M., Luchinat, C., Trautwein, A. X., & Fontecave, M. (1999). Iron-sulfur interconversions in the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem*, *4*(5), 614-620
- Mullner, M., Hammel, O., Mienert, B., Schlag, S., Bill, E., & Unden, G. (2008). A PAS domain with an oxygen labile [4Fe-4S]₂⁺ cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*. *Biochemistry*, *47*(52), 13921-13932
- Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G., & Fujita, Y. (2010). X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature*, *465*(7294), 110-114
- Nakano, M. M., & Hulett, F. M. (1997). Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiology Letters*, *157*(1), 1-7
- Nascimento, A. L., Verjovski-Almeida, S., Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E., Digiampietri, L. A., Harstkeerl, R. A., Ho, P. L., Marques, M. V., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Haake, D. A., & Martins, E. A. (2004). Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res*, *37*(4), 459-477
- Nellen-Anthamatten, D., Rossi, P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fischer, H. M., & Hennecke, H. (1998). *Bradyrhizobium japonicum* FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J Bacteriol*, *180*(19), 5251-5255
- Nelson-Sathi, S., Sousa, F. L., Roettger, M., Lozada-Chavez, N., Thiergart, T., Janssen, A., Bryant, D., Landan, G., Schonheit, P., Siebers, B., McInerney, J. O., & Martin, W. F. (2015). Origins of major archaeal clades correspond to gene acquisitions from bacteria. *Nature*, *517*(7532), 77-80

- Niemann, V., Koch-Singenstreu, M., Neu, A., Nilkens, S., Gotz, F., Unden, G., & Stehle, T. (2014). The NreA protein functions as a nitrate receptor in the staphylococcal nitrate regulation system. *J Mol Biol*, *426*(7), 1539-1553
- Nilkens, S. (2013). *The NreABC system of Staphylococcus carnosus combines nitrate and oxygen sensing by an NreA/NreB sensor complex*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Nilkens, S., Koch-Singenstreu, M., Niemann, V., Gotz, F., Stehle, T., & Unden, G. (2014). Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*. *Mol Microbiol*, *91*(2), 381-393
- Nonaka, H., Keresztes, G., Shinoda, Y., Ikenaga, Y., Abe, M., Naito, K., Inatomi, K., Furukawa, K., Inui, M., & Yukawa, H. (2006). Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J Bacteriol*, *188*(6), 2262-2274
- O'Sullivan, L. A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2005). *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family Cryomorphaceae in the phylum 'Bacteroidetes'. *Int J Syst Evol Microbiol*, *55*(Pt 5), 2189-2194
- Oh, H. M., Kang, I., Yang, S. J., Jang, Y., Vergin, K. L., Giovannoni, S. J., & Cho, J. C. (2011). Complete genome sequence of strain HTCC2170, a novel member of the genus *Maribacter* in the family Flavobacteriaceae. *J Bacteriol*, *193*(1), 303-304
- Oh, J. I., Eraso, J. M., & Kaplan, S. (2000). Interacting regulatory circuits involved in orderly control of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol*, *182*(11), 3081-3087
- Ollagnier-de Choudens, S., & Fontecave, M. (1999). The lipoate synthase from *Escherichia coli* is an iron-sulfur protein. *FEBS Lett*, *453*(1-2), 25-28
- Ollagnier-De Choudens, S., Sanakis, Y., Hewitson, K. S., Roach, P., Baldwin, J. E., Munck, E., & Fontecave, M. (2000). Iron-sulfur center of biotin synthase and lipoate synthase. *Biochemistry*, *39*(14), 4165-4173
- Pade, N., Kocher, S., Roessler, M., Hanelt, I., & Muller, V. (2013). Bioenergetics of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: composition and regulation of the respiratory chain. *Appl Environ Microbiol*, *79*(12), 3839-3846
- Pagani, I., Chertkov, O., Lapidus, A., Lucas, S., Del Rio, T. G., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J. F., Nolan, M., Saunders, E., Pitluck, S., Held, B., Goodwin, L., Liolios, K., Ovchinnikova, G., Ivanova, N., Mavromatis, K., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Jeffries, C. D., Detter, J. C., Han, C., Tapia, R., Ngatchou-Djao, O. D., Rohde, M., Goker, M., Spring, S., Sikorski, J., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Klenk, H. P., & Kyrpides, N. C. (2011). Complete genome sequence of *Marivirga tractuosa* type strain (H-43). *Stand Genomic Sci*, *4*(2), 154-162
- Panmanee, W., Vattanaviboon, P., Poole, L. B., & Mongkolsuk, S. (2006). Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress. *J Bacteriol*, *188*(4), 1389-1395
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J., & Gaudin, C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a Cellulolytic, Mesophilic: Species from Decayed Grass. *Int J Syst Evol Microbiol*, *34*(2), 155-159
- Ponting, C. P., & Aravind, L. (1997). PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Current Biology*, *7*(11), R674-R677
- Raedts, J., Siemerink, M. A., Levisson, M., van der Oost, J., & Kengen, S. W. (2014). Molecular characterization of an NADPH-dependent acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Appl Environ Microbiol*, *80*(6), 2011-2020
- Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Böttger, L. H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A. X., Jahn, D., & Härtig, E. (2006a). *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol Microbiol*, *60*(6), 1432-1445
- Reents, H., Munch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., & Hartig, E. (2006b). The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, *188*(3), 1103-1112

- Reinhart, F., Huber, A., Thiele, R., & Uden, G. (2010). Response of the oxygen sensor NreB to air in vivo: Fe-S-containing NreB and apo-NreB in aerobically and anaerobically growing *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol*, *192*(1), 86-93
- Rey, F. E., & Harwood, C. S. (2010). FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *Mol Microbiol*, *75*(4), 1007-1020
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jorgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S. D., & Berka, R. M. (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*, *5*(10), R77
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*, *16*(6), 276-277
- Ritalahti, K. M., Justicia-Leon, S. D., Cusick, K. D., Ramos-Hernandez, N., Rubin, M., Dornbush, J., & Löffler, F. E. (2012). *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *Int J Syst Evol Microbiol*, *62*(Pt 1), 210-216
- Rodrigues, D. F., Ivanova, N., He, Z., Huebner, M., Zhou, J., & Tiedje, J. M. (2008). Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million year old permafrost: a genome and transcriptome approach. *BMC Genomics*, *9*, 547
- Rodriguez-Campos, S., Smith, N. H., Boniotti, M. B., & Aranaz, A. (2014). Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*, *97 Suppl*, S5-S19
- Rolfe, R. D., Hentges, D. J., Campbell, B. J., & Barrett, J. T. (1978). Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, *36*(2), 306-313
- Romero-Silva, M. J., Mendez, V., Agullo, L., & Seeger, M. (2013). Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate ring-cleavage pathways and related 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate peripheral pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLoS One*, *8*(2), e56038
- Rosenstein, R., Nerz, C., Biswas, L., Resch, A., Raddatz, G., Schuster, S. C., & Gotz, F. (2009). Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl Environ Microbiol*, *75*(3), 811-822
- Rosenstein, R., Peschel, A., Wieland, B., & Gotz, F. (1992). Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *J Bacteriol*, *174*(11), 3676-3683
- Ruckert, C., Blom, J., Chen, X., Reva, O., & Borriss, R. (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T) reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J Biotechnol*, *155*(1), 78-85
- Saini, V., Farhana, A., Glasgow, J. N., & Steyn, A. J. (2012a). Iron sulfur cluster proteins and microbial regulation: implications for understanding tuberculosis. *Curr Opin Chem Biol*, *16*(1-2), 45-53
- Saini, V., Farhana, A., & Steyn, A. J. (2012b). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3: a novel iron-sulfur cluster protein that regulates redox homeostasis and virulence. *Antioxid Redox Signal*, *16*(7), 687-697
- Salmon, K., Hung, S. P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G. W., & Gunsalus, R. P. (2003). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem*, *278*(32), 29837-29855
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sass, A. M., Schmerk, C., Agnoli, K., Norville, P. J., Eberl, L., Valvano, M. A., & Mahenthalingam, E. (2013). The unexpected discovery of a novel low-oxygen-activated locus for the anoxic persistence of *Burkholderia cenocepacia*. *Isme j*, *7*(8), 1568-1581
- Saw, J. H., Mountain, B. W., Feng, L., Omelchenko, M. V., Hou, S., Saito, J. A., Stott, M. B., Li, D., Zhao, G., Wu, J., Galperin, M. Y., Koonin, E. V., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Rigden, D. J., Dunfield, P. F., Wang, L., & Alam, M. (2008). Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1. *Genome Biol*, *9*(11), R161

- Schafer, C., Bommer, M., Hennig, S. E., Jeoung, J. H., Dobbek, H., & Lenz, O. (2016). Structure of an Actinobacterial-Type [NiFe]-Hydrogenase Reveals Insight into O₂-Tolerant H₂ Oxidation. *Structure*, *24*(2), 285-292
- Schlag, S. (2008). *Dissimilatory nitrate and nitrite reduction in staphylococci: regulation and implication in biofilm formation*. Eberhard Karls-Universität, Tübingen.
- Schlag, S., Fuchs, S., Nerz, C., Gaupp, R., Engelmann, S., Liebeke, M., Lalk, M., Hecker, M., & Gotz, F. (2008). Characterization of the oxygen-responsive NreABC regulon of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, *190*(23), 7847-7858
- Schluter, A., Patschkowski, T., Unden, G., & Priefer, U. B. (1992). The *Rhizobium leguminosarum* FnrN protein is functionally similar to *Escherichia coli* Fnr and promotes heterologous oxygen-dependent activation of transcription. *Mol Microbiol*, *6*(22), 3395-3404
- Schneider, D., & Schmidt, C. L. (2005). Multiple Rieske proteins in prokaryotes: where and why? *Biochim Biophys Acta*, *1710*(1), 1-12
- Scott, C., Guest, J. R., & Green, J. (2000). Characterization of the *Lactococcus lactis* transcription factor FlpA and demonstration of an in vitro switch. *Mol Microbiol*, *35*(6), 1383-1393
- Scott, C., Partridge, J. D., Stephenson, J. R., & Green, J. (2003). DNA target sequence and FNR-dependent gene expression. *FEBS Lett*, *541*(1-3), 97-101
- Sharma, H., Yu, S., Kong, J., Wang, J., & Steitz, T. A. (2009). Structure of apo-CAP reveals that large conformational changes are necessary for DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(39), 16604-16609
- Shaw, D. J., Rice, D. W., & Guest, J. R. (1983). Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, *166*(2), 241-247
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., & Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(2), 996-1001
- Shin, S. H., Kim, S., Kim, J. Y., Song, H. Y., Cho, S. J., Kim, D. R., Lee, K. I., Lim, H. K., Park, N. J., Hwang, I. T., & Yang, K. S. (2012). Genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003, a xylanase-producing bacterium isolated from soil found in forest residue. *J Bacteriol*, *194*(5), 1266
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, *7*, 539
- Singh, A., Crossman, D. K., Mai, D., Guidry, L., Voskuil, M. I., Renfrow, M. B., & Steyn, A. J. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog*, *5*(8), e1000545
- Singh, A., Guidry, L., Narasimhulu, K. V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K. E., Giles, G. I., Lancaster, J. R., Jr., & Steyn, A. J. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(28), 11562-11567
- Skarin, H., Hafstrom, T., Westerberg, J., & Segerman, B. (2011). *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics*, *12*, 185
- Smith, L. J., Stapleton, M. R., Fullstone, G. J., Crack, J. C., Thomson, A. J., Le Brun, N. E., Hunt, D. M., Harvey, E., Adinolfi, S., Buxton, R. S., & Green, J. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide-sensitive iron-sulfur cluster. *Biochem J*, *432*(3), 417-427
- Soliveri, J. A., Gomez, J., Bishai, W. R., & Chater, K. F. (2000). Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene whiB are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology*, *146* (Pt 2), 333-343
- Song, J. Y., Kim, H. A., Kim, J. S., Kim, S. Y., Jeong, H., Kang, S. G., Kim, B. K., Kwon, S. K., Lee, C. H., Yu, D. S., Kim, B. S., Kim, S. H., Kwon, S. Y., & Kim, J. F. (2012). Genome sequence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. strain JS. *J Bacteriol*, *194*(14), 3760-3761
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313

- Staples, C. R., Lahiri, S., Raymond, J., Von Herbulis, L., Mukhophadhyay, B., & Blankenship, R. E. (2007). Expression and association of group IV nitrogenase NifD and NifH homologs in the non-nitrogen-fixing archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*. *J Bacteriol*, *189*(20), 7392-7398
- Steyn, A. J., Collins, D. M., Hondalus, M. K., Jacobs, W. R., Jr., Kawakami, R. P., & Bloom, B. R. (2002). *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(5), 3147-3152
- Sutton, V. R., Mettert, E. L., Beinert, H., & Kiley, P. J. (2004). Kinetic analysis of the oxidative conversion of the [4Fe-4S]₂⁺ cluster of FNR to a [2Fe-2S]₂⁺ Cluster. *J Bacteriol*, *186*(23), 8018-8025
- Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J. F., & Oremland, R. S. (1998). *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch Microbiol*, *171*(1), 19-30
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., & Dreyfus, B. (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol*, *183*(1), 214-220
- Tan, E., Chen, Y., Kuan, J., Lin, C., Jagoda, S. S., Lin, F., Tzou, W., Kinoshita, S., Watabe, S., Asakawa, S., & Liu, S. (2014). Draft Genome Sequence of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* Strain NTOU1, a Thermophilic Bacterium Isolated from Marine Shallow Hydrothermal Vents. *Genome Announc*, *2*(5)
- Tolla, D. A., & Savageau, M. A. (2010). Regulation of aerobic-to-anaerobic transitions by the FNR cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, *397*(4), 893-905
- Tsagou, V., Kefalogianni, I., Sini, K., & Aggelis, G. (2003). Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in the presence of NH₄⁺. *Appl Microbiol Biotechnol*, *62*(5-6), 574-578
- Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H. D., & Rojo, F. (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ Microbiol*, *10*(7), 1690-1702
- Ugulava, N. B., Gibney, B. R., & Jarrett, J. T. (2000). Iron-sulfur cluster interconversions in biotin synthase: dissociation and reassociation of iron during conversion of [2Fe-2S] to [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry*, *39*(17), 5206-5214
- Unden, G., & Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta*, *1320*(3), 217-234
- Unden, G., & Duchene, A. (1987). On the role of cyclic AMP and the Fnr protein in *Escherichia coli* growing anaerobically. *Arch Microbiol*, *147*(2), 195-200
- Unden, G., & Guest, J. R. (1985). Isolation and characterization of the Fnr protein, the transcriptional regulator of anaerobic electron transport in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, *146*(1), 193-199
- Unden, G., Müllner, M., & Reinhard, F. (2010). Sensing of Oxygen by Bacteria. In J. K. Krämer R. (Ed.), *Bacterial Signaling*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Unden, G., Nilkens, S., & Singenstreu, M. (2013). Bacterial sensor kinases using Fe-S cluster binding PAS or GAF domains for O₂ sensing. *Dalton Trans*, *42*(9), 3082-3087
- Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K. I., & Komagata, K. (1995). *Characterization and Description of Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov (Vol. 45).
- Valdes, J., Quatrini, R., Hallberg, K., Dopson, M., Valenzuela, P. D., & Holmes, D. S. (2009). Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *J Bacteriol*, *191*(18), 5877-5878
- Van den Mooter, M., & Swings, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int J Syst Bacteriol*, *40*(4), 348-369
- Van Spanning, R. J., De Boer, A. P., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V., Stouthamer, A. H., & Van Der Oost, J. (1997). FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol*, *23*(5), 893-907

- Veldman, R., Reijnders, W. N., & van Spanning, R. J. (2006). Specificity of FNR-type regulators in *Paracoccus denitrificans*. *Biochem Soc Trans*, *34*(Pt 1), 94-96
- Venkateswara Rao, P., & Holm, R. H. (2004). Synthetic analogues of the active sites of iron-sulfur proteins. *Chem Rev*, *104*(2), 527-559
- Vergara-Irigaray, M., Fookes, M. C., Thomson, N. R., & Tang, C. M. (2014). RNA-seq analysis of the influence of anaerobiosis and FNR on *Shigella flexneri*. *BMC Genomics*, *15*, 438
- Vitt, S., Ma, K., Warkentin, E., Moll, J., Pierik, A. J., Shima, S., & Ermler, U. (2014). The F(4)(2)(0)-reducing [NiFe]-hydrogenase complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the first X-ray structure of a group 3 family member. *J Mol Biol*, *426*(15), 2813-2826
- Volbeda, A., Darnault, C., Renoux, O., Nicolet, Y., & Fontecilla-Camps, J. C. (2015). The crystal structure of the global anaerobic transcriptional regulator FNR explains its extremely fine-tuned monomer-dimer equilibrium. *Sci Adv*, *1*(11), e1501086
- Vollack, K. U., Hartig, E., Korner, H., & Zumft, W. G. (1999). Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four *fnr*-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. *Mol Microbiol*, *31*(6), 1681-1694
- Vos, M., Hesselman, M. C., Te Beek, T. A., van Passel, M. W. J., & Eyre-Walker, A. (2015). Rates of Lateral Gene Transfer in Prokaryotes: High but Why? *Trends Microbiol*, *23*(10), 598-605
- Ward, P. N., Holden, M. T., Leigh, J. A., Lennard, N., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Quail, M. A., Woodward, J., Barrell, B. G., Egan, S. A., Field, T. R., Maskell, D., Kehoe, M., Dowson, C. G., Chanter, N., Whatmore, A. M., Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2009). Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics*, *10*(1), 54
- Weiss, M. C., Sousa, F. L., Mrnjavac, N., Neukirchen, S., Roettger, M., Nelson-Sathi, S., & Martin, W. F. (2016). The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol*, *1*(9), 16116
- Weon, H. Y., Kim, B. Y., Yoo, S. H., Lee, S. Y., Kwon, S. W., Go, S. J., & Stackebrandt, E. (2006). *Niastella koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Niastella yeongjuensis* sp. nov., novel members of the phylum Bacteroidetes, isolated from soil cultivated with Korean ginseng. *Int J Syst Evol Microbiol*, *56*(Pt 8), 1777-1782
- Werner, H., Rintelen, G., & Kunstek-Santos, H. (1975). [A new butyric acid-producing bacteroides species: *B. splanchnicus* n. sp. (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Orig A*, *231*(1-3), 133-144
- Whitehead, R. N., Overton, T. W., Snyder, L. A., McGowan, S. J., Smith, H., Cole, J. A., & Saunders, N. J. (2007). The small FNR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*: comparison with the larger *Escherichia coli* FNR regulon and interaction with the NarQ-NarP regulon. *BMC Genomics*, *8*, 35
- Willenborg, J., Koczula, A., Fulde, M., de Greeff, A., Beineke, A., Eisenreich, W., Huber, C., Seitz, M., Valentin-Weigand, P., & Goethe, R. (2016). FlpS, the FNR-Like Protein of *Streptococcus suis* Is an Essential, Oxygen-Sensing Activator of the Arginine Deiminase System. *Pathogens*, *5*(3)
- Williams, R. J. P., & Rickaby, R. (2012). *Evolution's Destiny: Co-evolving Chemistry of the Environment and Life*: Royal Society of Chemistry.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Tse, H., Teng, J. L., Curreem, S. O., Tsang, A. K., Fan, R. Y., Wong, G. K., Huang, Y., Loman, N. J., Snyder, L. A., Cai, J. J., Huang, J. D., Mak, W., Pallen, M. J., Lok, S., & Yuen, K. Y. (2009). The complete genome and proteome of *Laribacter hongkongensis* reveal potential mechanisms for adaptations to different temperatures and habitats. *PLoS Genet*, *5*(3), e1000416
- Wood, G. E., Khelef, N., Guiso, N., & Friedman, R. L. (1998). Identification of Btr-regulated genes using a titration assay. Search for a role for this transcriptional regulator in the growth and virulence of *Bordetella pertussis*. *Gene*, *209*(1-2), 51-58
- Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G., & Poole, R. K. (2000). Regulation of cytochrome bd expression in the obligate aerobic *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide. *J Biol Chem*, *275*(7), 4679-4686
- Xiao, B., Sun, Y. F., Lian, B., & Chen, T. M. (2016). Complete genome sequence and comparative genome analysis of the *Paenibacillus mucilaginosus* K02. *Microb Pathog*, *93*, 194-203

- Xue, Y., Xu, Y., Liu, Y., Ma, Y., & Zhou, P. (2001). Thermoanaerobacter tengcongensis sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 4), 1335-1341
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., & Arakawa, M. (1992). Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol*, 36(12), 1251-1275
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-119
- Ye, R. W., Haas, D., Ka, J. O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C., & Tiedje, J. M. (1995). Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in Pseudomonas aeruginosa requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol*, 177(12), 3606-3609
- Yokoyama, S., Niwa, T., Osawa, T., & Suzuki, T. (2010). Characterization of an O-desmethylangolensin-producing bacterium isolated from human feces. *Arch Microbiol*, 192(1), 15-22
- Yokoyama, S., Oshima, K., Nomura, I., Hattori, M., & Suzuki, T. (2011). Complete genomic sequence of the O-desmethylangolensin-producing bacterium Clostridium rRNA cluster XIVa strain SY8519, isolated from adult human intestine. *J Bacteriol*, 193(19), 5568-5569
- Yuen, K. Y., Woo, P. C., Teng, J. L., Leung, K. W., Wong, M. K., & Lau, S. K. (2001). Laribacter hongkongensis gen. nov., sp. nov., a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema. *J Clin Microbiol*, 39(12), 4227-4232
- Zhang, B., Crack, J. C., Subramanian, S., Green, J., Thomson, A. J., Le Brun, N. E., & Johnson, M. K. (2012). Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated [2Fe-2S] and cysteine-ligated [4Fe-4S] clusters in the FNR regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39), 15734-15739
- Zhou, A., Chen, Y. I., Zane, G. M., He, Z., Hemme, C. L., Joachimiak, M. P., Baumohl, J. K., He, Q., Fields, M. W., Arkin, A. P., Wall, J. D., Hazen, T. C., & Zhou, J. (2012). Functional characterization of Crp/Fnr-type global transcriptional regulators in Desulfovibrio vulgaris Hildenborough. *Appl Environ Microbiol*, 78(4), 1168-1177
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., & Duport, C. (2007). The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in Bacillus cereus F4430/73. *J Bacteriol*, 189(7), 2813-2824
- Zumft, W. G. (2002). Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4(3), 277-286

I Anhang

a. Stammbäume der [4Fe-4S]-haltigen Sensoren

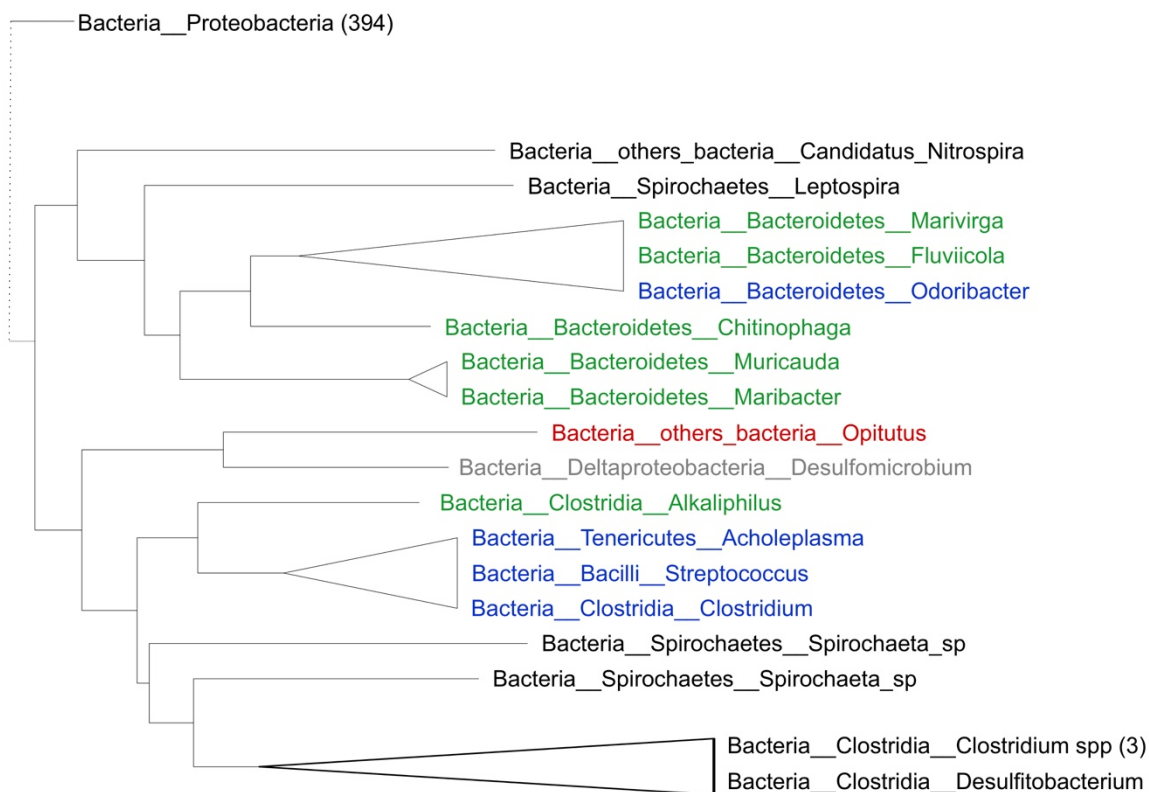


Abb. A 1: Ausschnitt des FNR_{Ec}-Stammbaums der Nicht-Proteobakterien. Die FNR_{Ec}-Varianten sind basierend auf ihrer Anzahl der konservierten Cysteine farblich markiert: 4Cys (Schwarz), 3Cys (grün), 2Cys (blau), 1Cys (rot) und 0Cys (grau). Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der Spezies an. Durch Zusammenrücken der Äste sind die evolutionären Distanzen verloren und der Baum zeigt eine schematische Verteilung der Varianten aus den Nicht-Proteobakterien.

Der gesamte, originale Stammbaum von FNR_{Ec} ist der Dissertation am Ende angehängt.

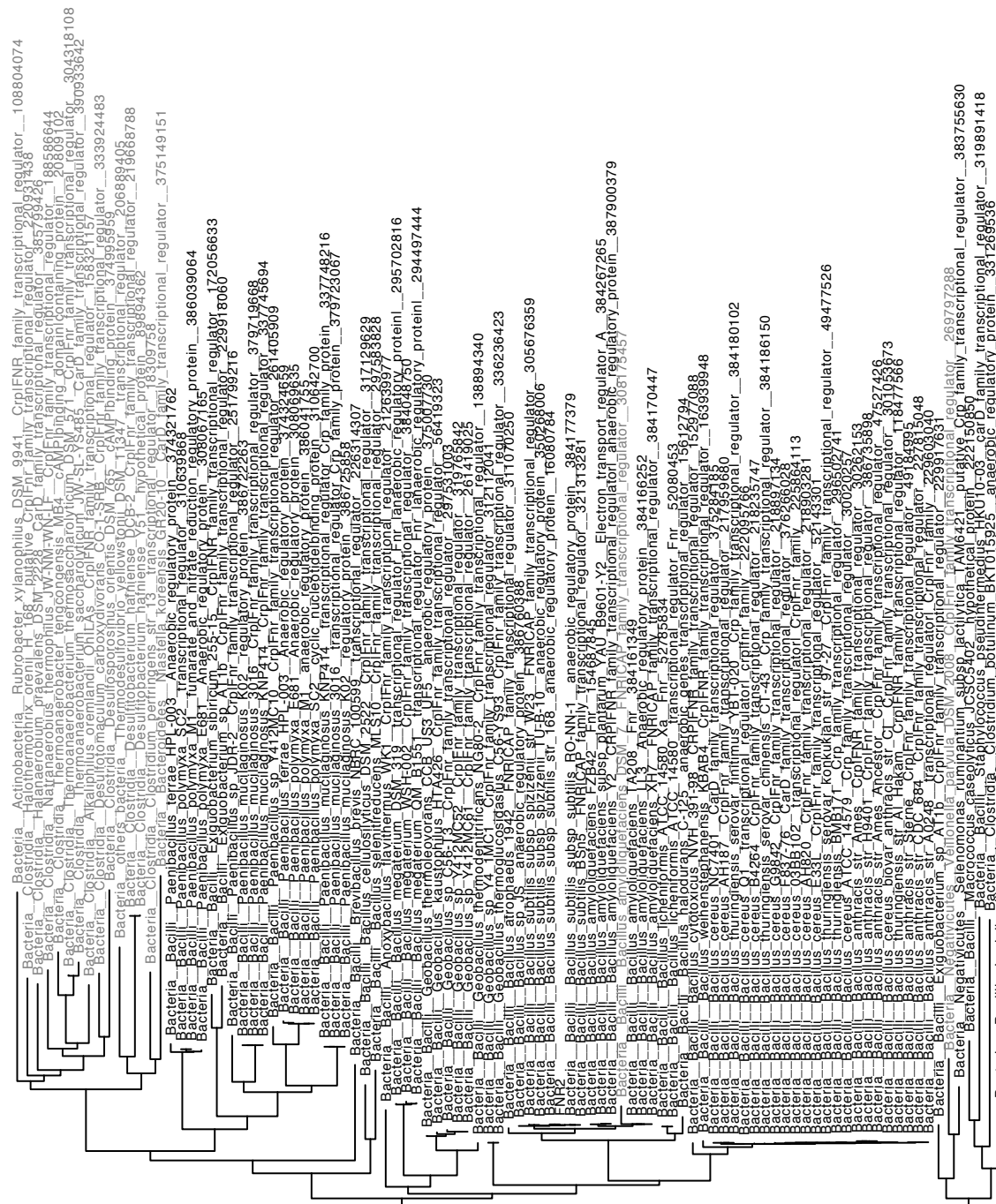


Abb. A 2: Stammbaum von FNR_{B5}. FNR_{B5}-Varianten mit vollständigem Aspartat-Cysteinmotiv sind schwarz dargestellt, Varianten ohne konserviertes Cys-Cluster sind grau markiert. Die evolutionäre Distanz ist angeben.

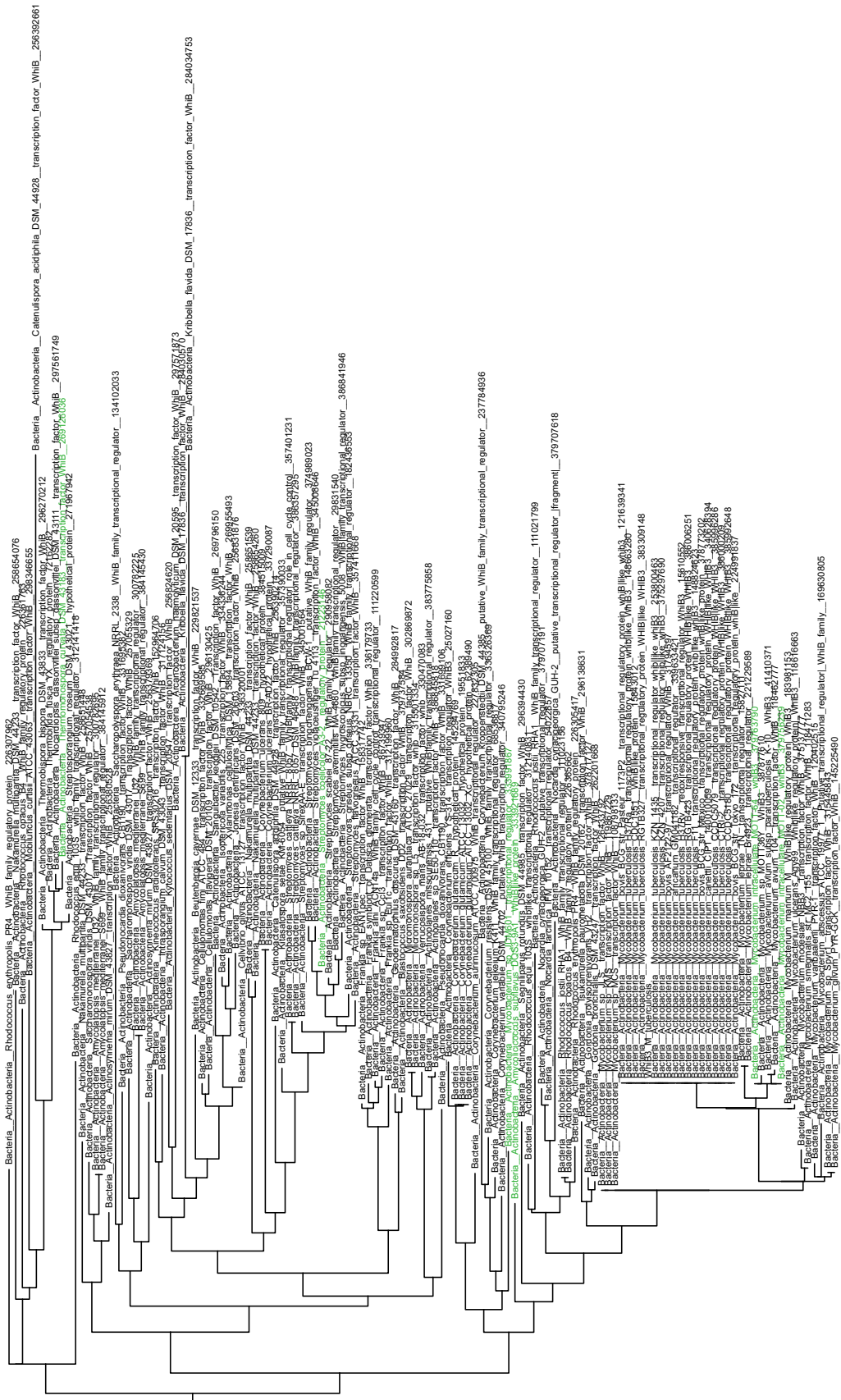


Abb. A 4: Stammbaum von WhiB3_{Mt}. WhiB3_{Mt}-Homologe mit vollständigem Cys-Cluster sind schwarz dargestellt. Varianten mit drei konservierten Cysteinen (3Cys) grün. Die evolutionäre Distanz ist angegeben.

b. Alignments

```

Mb. sp          -----MAL-DTAALHPRAVESASCPSLHDG-----DLFAGCPELIGSPSTFARDE 44
FNR_Ec          MI-P---EKRIIRRIQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIERKKPIQKGQ 56
Variovorax     MFNPSLTQAAARAAPKAGIAVHERAS--R-----KLVETQQLLKECLAPQRRVVHAGD 52
                :
                .

```

Abb. A 5: Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen FNR_{Ec} und 1Cys-Varianten aus *Methylobacterium sp* und *Variovorax paradoxus*. Die Homologen mit einem konservierten Cysteinrest sind rot dargestellt. Konservierte Cysteinreste des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt, zusätzliche Cysteinreste türkis. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an. Konserviert sind C1 (*Methylobacterium sp*) oder C3 (*Variovorax*) des Cys-Motivs.

```

NreB_Sa        KIVFADDNGKIIAM-----NDAAKDILSEEDNYSAVANAI C--HR CEGYT-NAY--D 69
Clostridium sp GNTYQDKRGILINSVQEELSGMDLVETPIILAENLASLLALPLWKEDQVEGLMMAFRTF 120
                .: *..* :*          : . . *: *: * :* : .: ** * :
NreB_Sa        VQS C KDCF---LESMQVQATNFQVFMKTKDQKVMPTATYQLIDQDRGIHAFTLQNVSSQ 126
Clostridium sp SKFSKACYEKIVHEIAVEELGLELY-----PEPYEA-----VRDFRLSGDYRS 163
                : . * * : . . . : * : . . . . : * : . : * * . .
NreB_Sa        SEED---NYSAVANAI C HRC EGYTNAYDV-----QSC KDCF-LESMQVQATNFQ 89
Planctomyces   GEKFPYITYLAATSTIAWY CGPRPATFALTGLFLSAFYFFASPRGSEFYVSGIDAQVGAV- 113
                . * : . * * . . . : * : : : * : . * . . . . * .

```

Abb. A 6: Ausschnitt der Sequenzvergleiche zwischen NreB_{Sa} und 1Cys-Varianten aus *Clostridium sp* und *Planctomyces limnophilus*. Die Homologen mit einem konservierten Cysteinrest sind rot dargestellt. Konservierte Cysteinreste des [Fe-S]-Cluster-bindenden Motivs sind gelb unterlegt. Die Zahlen geben die Position der AS in der Sequenz an. Konserviert sind C4 (*Clostridium sp*) oder C2 (*Planctomyces*) des Cys-Motivs.

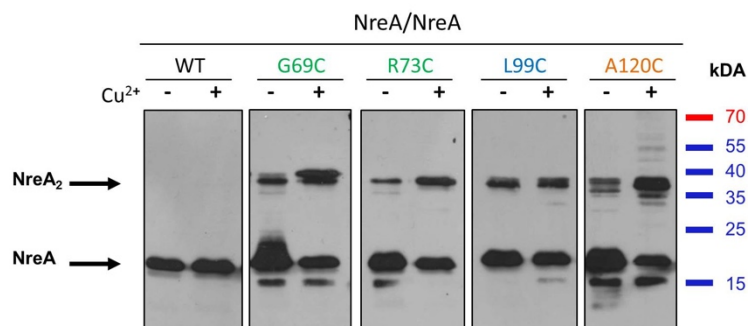
c. Oxidatives *in vivo* Cystein-Crosslinking von NreA-Varianten

Abb. A 7: Western Blots des oxidativen *in vivo* Cystein-Crosslinkings unter aeroben Bedingungen mit Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)₃ von NreA-Varianten. Die Zellen des *E. coli* Stammes M15 wurden mit den Plasmiden der NreA-Cysteinvarianten transformiert und aerob ohne Nitrat gezüchtet. Nach Oxidation mit Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)₃ wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopp-Lsg (inkl. SDS-Ladepuffer ohne DTT) gestoppt und die Proteine direkt mittels SDS-Page aufgetrennt. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte mit dem spezifischen Antikörper gegen NreA. Die Pfeile markieren das NreA-Monomer, sowie das Crosslinking-Produkt NreA₂. Die Variante A120C enthält einen nicht-oberflächenexponierten Rest (nach Abb. 37, orange), während G69C und R73C innerhalb (nach Abb. 37, grün) und A99C außerhalb der potentiellen Homodimerisierungsfläche (nach Abb. 37, blau) lokalisiert sind.

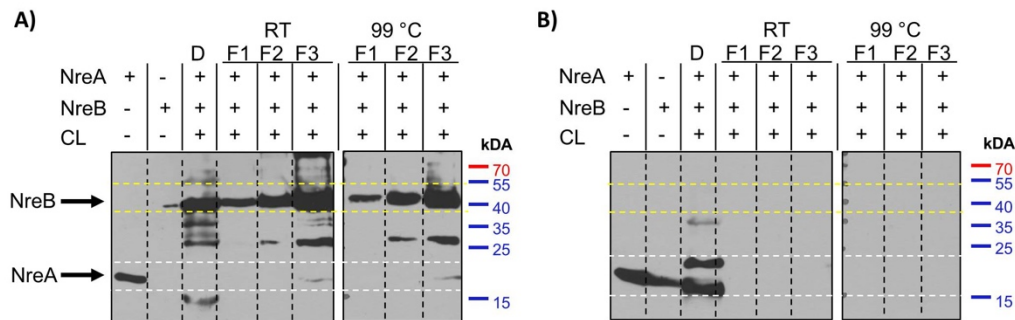
d. *In vivo* HPINE-Interaktionsstudien zwischen NreA und NreB

Abb. A 8: Modifiziertes HPINE: NreA/NreB-Interaktion. A) zeigt die Detektion mit dem primären Antikörper Anti-His aus Maus (1:10.000, 1 h) und dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper Anti-Maus (1:10.000, 1 h). B) zeigt die Detektion mit dem primären Antikörper Anti-NreA aus Kaninchen (1:4.000, 1 h) und dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit-HRP (1:10.000, 1 h). Als Crosslinker wurde 1 % Paraformaldehyd verwendet. Der Durchfluss ist durch D gekennzeichnet, während die ersten Elutionsfraktionen durch F1-F3 gekennzeichnet sind. Die Proben wurden vor der Beladung des SDS-Gels aufgekocht (99 °C) oder direkt aufgetragen (RT). Als Positivkontrollen dienten aufgereinigtes NreA-His (pQE31*nreA*) bzw. NreB-His (pQE31*nreB*). Das berechnete Molekulargewicht von NreA beträgt etwa 18 kDa, während NreB ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa aufweist.

Strep-NreA (pMW1243) wurde aerob bei 37 °C in *E. coli* JM109 gezüchtet. Die HK wurde 5 %ig inokuliert und bei einer OD_{578} von 0,5 mit 200 ng/ml AHT für 5 h induziert. NreB-His (pQE31*nreB*) wurde in *S. carnosus* m1 kultiviert. Als Kulturmedium wurde Hefeextrakt-Medium (45 g/L Hefeextrakt, 40 mM Glycerin und 50 mM NaP_i pH 7,2) eingesetzt. Nach mindestens 24 h Wachstum der VK wurde die HK 12,5 %ig inokuliert. Das HK-Medium enthielt zusätzlich 10 mM Ammoniumeisen(III)citrat sowie 1 mM Cysteinhydrochlorid. Bei einer OD_{578} von 10 wurde mit 3,3 M Xylose für 6 h induziert. Nach Ablauf der Induktionsdauer wurden die Zellen luftdicht in Müller-Krempel-Flaschen mit Rührfisch verschlossen und über Nacht bei 4 °C gerührt. Nach dem Einschleusen in das Anaerobenzelt, wurden die Zellen in einem 4:1-Verhältnis (NreA:NreB) gemischt und für 10 Minuten unter Rühren inkubiert. Anschließend fand in anaeroben Zentrifugenbechern die Zellernte statt. Das Zellpellet wurde im N_2 -Zelt mit anaerobem Resuspensionspuffer (50 mM HEPES-Puffer pH 7,2, 300 mM NaCl, 20 % Glycerin, 10 mM Imidazol und 10 mM β -Mercaptoethanol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in anaeroben Röhrcchen mit Glasperlen an der FastPrep (3x 20 s, 5,5 m/s). Die Glasperlen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zellextrakt wurde mit 1 % Paraformaldehyd als Crosslinker für 10 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe des doppelten Volumens an Resuspensionspuffer wurde das Crosslinking gestoppt. Die weitere Proteinisolierung konnte außerhalb des Anaerobenzeltes laut Herstellerangaben über eine Ni-NTA-Säule bei 4 °C erfolgen. Der Waschpuffer enthielt 50 mM HEPES pH 7,2, 1 M NaCl, 20 % Glycerin, 20 mM Imidazol und 1 mM β -Mercaptoethanol. Der Elutionspuffer unterschied sich in der Konzentration von NaCl (300 mM) sowie Imidazol (150 mM).

e. Verwendete Plasmide und Primer

Tab. A 1: Verwendete Plasmide für die BACTH-Interaktionsstudien (und Expressionstudien).

Plasmide	Genotyp	Referenz
pKT25-zip	Leucin zipper von GCN4 (1) in pKT25, zur Expression von T_{25} Zip, Kan ^r	Karimova <i>et al.</i> (1998)
pUT18C-zip	Leucin zipper von GCN4 (1) in pUT18C, zur Expression von T_{18} Zip, Amp ^r	
pMW1423	<i>nreA</i> in pKT25 über <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI, zur Expression von T_{25} NreA, Kan ^r	Koch-Singenstreu (2013)
pMW1775	<i>nreA</i> in pKNT25 über <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI, zur Expression von NreA T_{25} , Kan ^r	
pMW1451	<i>nreA</i> in pUT18C über <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI, zur Expression von T_{18} NreA, Amp ^r	
pMW1778	<i>nreA</i> in pUT18 über <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI, zur Expression von NreA T_{18} , Amp ^r	
pMW1424	<i>nreB</i> in pUT18C über <i>Xba</i> I und <i>Eco</i> RI, zur Expression von T_{18} NreB, Amp ^r	
pMW1779	<i>nreB</i> in pUT18 über <i>Xba</i> I und <i>Eco</i> RI, zur Expression von NreB T_{18} , Amp ^r	
pMW2582	pMW1779-Derivat (pUT18nreB), mit <i>nreC</i> -Strep nach <i>nreB</i> , <i>in frame</i> über <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I, Amp ^r	Klein (2018)
pMW2583	pMW1424-Derivat (pUT18CnreB), mit <i>nreC</i> -Strep nach <i>nreB</i> , <i>in frame</i> über <i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I, Amp ^r	
pMW2182	pMW1423-Derivat, aber NreA(I43A)	Diese Arbeit
pMW2186	pMW1423-Derivat, aber NreA(G64A)	
pMW2190	pMW1423-Derivat, aber NreA(G66A)	
pMW2194	pMW1423-Derivat, aber NreA(G69A)	
pMW2206	pMW1423-Derivat, aber NreAG75A)	
pMW2183	pMW1775-Derivat, aber NreAI43A)	
pMW2257	pMW1775-Derivat, aber NreA(R21A)	Barth (2014)
pMW2223	pMW1775-Derivat, aber NreA(D27A)	
pMW2235	pMW1775-Derivat, aber NreA(N51D)	
pMW2180	pMW1778-Derivat, aber NreAI43A)	Diese Arbeit
pMW2184	pMW1778-Derivat, aber NreA(G64A)	
pMW2188	pMW1778-Derivat, aber NreA(G66A)	
pMW2192	pMW1778-Derivat, aber NreA(G69A)	
pMW2204	pMW1778-Derivat, aber NreAG75A)	
pMW2316	pMW1451-Derivat, aber NreA(R21A)	
pMW2314	pMW1451-Derivat, aber NreA(D27A)	
pMW2315	pMW1451-Derivat, aber NreA(N51D)	

Tab. A 2: Verwendete Plasmide für die *narG-lip*-Funktionsstudien.

Plasmide	Genotyp	Referenz
pMW1001	pPS44 (inkl. <i>Lip</i> -Gen aus <i>S. hyicus</i>) mit Promotor von <i>narG</i> vor dem Lipasegen, in <i>Bam</i> HI Schnittstelle, Cam ^r	Nilkens (2013)
pMW1040	<i>E. coli</i> / <i>S. carnosus</i> Shuttle-Vektor mit Amp ^r (<i>E. coli</i>) und Cam ^r (<i>S. carnosus</i>), <i>nreABC</i> mit nativem Promotor, <i>pnarGlip</i> eingefügt über <i>Sbf</i> I und <i>Nhe</i> I in selber Orientierung wie <i>nreABC</i>	
pMW1062	pMW1040-Derivat, aber NreA(R21A)	Koch-Singenstreu (2013)
pMW1454	pMW1040-Derivat, aber NreA(D27A)	
pMW1515	pMW1040-Derivat, aber NreA(N51D)	
pMW3636	pMW1040-Derivat, aber NreA(I43A)	Diese Arbeit
pMW2410	pMW1040-Derivat, aber NreA(G64A)	
pMW2402	pMW1040-Derivat, aber NreA(G66A)	
pMW2412	pMW1040-Derivat, aber NreA(G69A)	
pMW2824	pMW1040-Derivat, aber NreA(I43A), <i>nreA</i> * eingefügt über <i>Sac</i> I und <i>Xba</i> I	
pMW2825	pMW1040-Derivat, aber NreA(G64A), <i>nreA</i> * eingefügt über <i>Sac</i> I und <i>Xba</i> I	
pMW2826	pMW1040-Derivat, aber NreA(G66A), <i>nreA</i> * eingefügt über <i>Sac</i> I und <i>Xba</i> I	
pMW2827	pMW1040-Derivat, aber NreA(G69A), <i>nreA</i> * eingefügt über <i>Sac</i> I und <i>Xba</i> I	
pMW2828	pMW1040-Derivat, aber NreA(G75A), <i>nreA</i> * eingefügt über <i>Sac</i> I und <i>Xba</i> I	

Tab. A 3: Verwendete Plasmide für die Cystein-Crosslinkingstudien und Cystein-Zugänglichkeitsstudien.

Plasmide	Genotyp	Referenz
pQE31 <i>nreA</i>	<i>nreA</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag, über <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III eingefügt, Kan ^r , Amp ^r , IPTG induzierbar	Schlag (2008)
pMW2614	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(A16C)	Diese Arbeit
pMW2820	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(A29C)	
pMW2667	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(S49C)	
pMW2615	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(G69C)	
pMW2633	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(L70C)	
pMW2616	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(R73C)	
pMW2617	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(L99C)	
pMW2618	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat, aber NreA(A120C)	

Tab. A 4: Verwendete Plasmide für die Gelfiltrationsstudien.

Plasmide	Genotyp	Referenz
pMW1733	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat mit NreA(Y95A)	Nilkens (2013)
pMW2821	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat mit NreA(R21A)	Diese Arbeit
pMW2822	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat mit NreA(G69A)	
pMW2823	pQE31 <i>nreA</i> -Derivat mit NreA(R73A)	

Tab. A 5: Verwendete Plasmide für die HPINE-Interaktionsstudien.

Plasmide	Genotyp	Referenz
pMW1243	pASK-IBA13plus-Derivat, <i>nreA</i> über <i>Xho</i> I und <i>Eco</i> RV eingefügt, N-terminaler Strep-Tag, AHT induzierbar, Amp ^r	Nilkens (2013)
pCQE1 <i>nreB</i>	<i>nreB</i> mit C-terminalem His ₆ -Tag, Expressionsvektor für Staphylokokken, Xylose induzierbar; <i>xylA</i> Promotor (Reprimierung durch Glukose), Cam ^r	Fedtke <i>et al.</i> (2002)

Tab. A 6: Verwendete NreA-Mutageneseprimer.

Primer	Sequenz (5' → 3')	TM [°C]	Referenz
01_NreA-R21A-for	GCT TTG GAT GAA ATC GCA GAA ACA GAG	67	Koch-Singenstreu (2013)
01_NreA-R21A-rev	CTC TGT TTC TGC GAT TTC ATC CAA AGC		
15_NreA-D27A-for	CAG AGA AAT TTG CTT TTG CAG CGA TTG	65,3	
15_NreA-D27A-rev	CAA TCG CTG CAA AAG CAA ATT TCT CTG		
20_NreA-N51D-for	GAA ATA TGC TTC CGG CGA TAT CAA CTA CCG C	72,1	
20_NreA-N51D-rev	GCG GTA GTT GAT ATC GCC GGA AGC ATA TTT C		
09_NreA-Y95A-for	GAC AAA TTA GGT GCT CCG ATT GTT TTG AG	67,4	
09_NreA-Y95A-rev	CTC AAA ACA ATC GGA GCA CCT AAT TTG TC		
37_NreA-I43A-for	GAT TGC ATA GTG CGG TCG CTA AAT GGA AAT ATG	67	
37_NreA-I43A-rev	CAT ATT TCC ATT TAG CGA CCG CAC TAT GCA ATC		
38_NreA-G64A-for	GTT TTA AGA CCA GCA AAA GGT TTG GCT GGT C	66,8	
38_NreA-G64A-rev	GAC CAG CCA AAC CTT TTG CTG GTC TTA AAA C		
39_NreA-G66A-for	GAC CAG GAA AAG CTT TGG CTG GTC TGG	68	
39_NreA-G66A-rev	CCA GAC CAG CCA AAG CTT TTC CTG GTC		
40_NreA-G69A-for	GAA AAG GTT TGG CTG CTC TGG TAA TTC	65,1	
40_NreA-G69A-rev	CGA ATT ACC AGA GCA GCC AAA CCT TTT C		
42_NreA-R73A-for	GGT CTG GTA ATT GCA ACG GGC TCT AG	66,4	
42_NreA-R73A-rev	CTA GAG CCC GTT GCA ATT ACC AGA CC		
43_NreA-G75A-for	GGT AAT TCG AAC GGC CTC TAG AAA GAT TG	65,3	Diese Arbeit
43_NreA-G75A-rev	CAA TCT TTC TAG AGG CCG TTC GAA TTA CC		
NreA-A16C-for	GAT TAC CAA GAT TGT TTG GAT GAA ATC	58,9	
NreA-A16C-rev	GAT TTC ATC CAA ACA ATC TTG GTA ATC		
NreA-A29C-for	GAA ATT TGA TTT TTG TGC GAT TGC ATT G	59,3	
NreA-A29C-rev	CAA TGC AAT CGC ACA AAA ATC AAA TTT C		
NreA-S49C-for	GAA ATA TGC TTG CGG CAA TAT C	56,5	
NreA-S49C-rev	GAT ATT GCC GCA AGC ATA TTT C		
NreA-G69C-for	GAA AAG GTT TGG CTT GTC TGG TAA TTC	56,7	
NreA-G69C-rev	GAA TTA CCA GAC AAG CCA AAC CTT TTC		
NreA-L70C-for	GGT TTG GCT GGT TGC GTA ATT CGA AC	64,8	
NreA-L70C-rev	GTT CGA ATT ACG CAA CCA GCC AAA CC		
NreA-R73C-for	GTC TGG TAA TTT GTA CGG GCT CTA G	63	
NreA-R73C-rev	CTA GAG CCC GTA CAA ATT ACC AGA C		
NreA-L99C-for	CCG ATT GTT TGC AGT GAA GCA C	60,3	
NreA-L99C-rev	GTG CTT CAC TGC AAA CAA TCG G		
NreA-A120C-for	GGG TTT ATG GTT GTT TGT TAT TAG G	58,1	
NreA-A120C-rev	CCT AAT AAC AAA CAA CCA TAA ACC C		

Tab. A 7: Verwendete Sequenzierungsprimer.

Primer	Sequenz (5' → 3')	TM [°C]	Anwendungsort
T18-T25_forward	GTA TGT TGT GTG GAA TTG TG	56,1	pMW1775, pMW1778, pMW1451
T18-T25_rev_ex	GTC GGG GCT GGC TTA ACT ATG	61,8	pMW1778, pMW1451
pKT25_seq_for2	GCG ATT CGG TGA CCG ATT AC	59,3	pMW1423
pKT25_seq_rev	GGA TGT GCT GCA AGG CGA TT	53,8	pMW1423
pKNT25_seq_rev	GTC GGC GGC GTT TGC GTA	60,5	pMW1775
Sequ_nreA	GGAGTGTCCATTATCTTATGC	58,4	pMW1040-nreA
F_Seq_SD_nreA	CTA GAG AGT CAT TAC CCC AG	51,8	pMW1040-nreA
pMW1040_nreB_Pmel-R	CTG TTC CTT TAG GAT CAT CTC	50,5	pMW1040-nreA
pQE31-nreA-His-for	GAG GAG AAA TTA ACT ATG AGA GGA TC	54,8	pQE31nreA
pQE31-vorT5Prom-for	GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC G	60,4	pQE31nreA

II Lebenslauf

III Veröffentlichungen, Konferenzen und Präsentationen

Veröffentlichungen

C. Barth, W. Martin, G. Uden, M. Weiss (2018)

Origin and Phylogenetic relation of [4Fe-4S]-containing O₂-sensors of bacteria

Manuskript in Arbeit.

Konferenzen und Posterpräsentationen

- 03/2017 Jahrestagung Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Würzburg
Poster: C. Barth und G. Uden
Functional important interaction sites of the nitrate sensor NreA of *Staphylococcus carnosus*
- 03/2016 Jahrestagung Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Jena

IV Danksagung

V Erklärung

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

Mainz, Mai 2018

