

Komplexbildung der Sensorkinase DcuS von *E. coli* mit
dem Antwortregulator DcuR und dem *dcuB* Promotor:
Einfluss der Phosphorylierung und von Fumarat

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität

in Mainz

Stefaniya Georgieva Gencheva

Geb. am 04.02.1984 in Varna (Bulgarien)

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Abstract.....	- 1 -
1. Zusammenfassung.....	- 2 -
2. Einleitung	- 3 -
2.1 Regulation des Energiestoffwechsels und der Atmung von <i>E. coli</i>	- 3 -
2.2 Der C ₄ -Dicarbonsäure-Stoffwechsel und die Transporter	- 5 -
2.3 Regulation des C ₄ -Dicarbonsäure-Stoffwechsels und das Zweikomponenten-System DcuS-DcuR in <i>E. coli</i>	- 8 -
2.4 Protein-Protein Interaktionen	- 14 -
2.5 Protein-DNA Interaktion.....	- 16 -
2.6 Ziel dieser Arbeit	- 16 -
3. Material und Methoden	- 18 -
3.1 Zucht von <i>E. coli</i>	- 18 -
3.1.1 Stämme, Plasmide und Primer.....	- 19 -
3.1.2 Puffer, Lösungen und Chemikalien	- 20 -
3.2 Molekulargenetische Methoden	- 20 -
3.2.2 Konstruktion von Plasmiden	- 22 -
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	- 25 -
3.3.1 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität.....	- 25 -
3.3.2 Überproduktion zytosolischer und transmembraner Proteine	- 26 -
3.3.3 Affinitätschromatographie	- 26 -
3.3.4 Dialyse.....	- 27 -
3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 28 -
3.3.6 Rekonstitution von His ₆ -DcuS und Substitutionen	- 28 -
3.3.7 SDS-PAGE und Semi-Dry-Western-Blotting.....	- 30 -
3.3.8 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-System	- 31 -

3.3.9 Phosphorylierung von rekonstituiertem His ₆ -DcuS, His ₆ -PASC-Kinase und Substitutionen - 31	- 31
3.3.10 Phosphorylübertragung von DcuS oder PASC-Kinase auf DcuR.....	- 33 -
3.3.11 Chemische Phosphorylierung von DcuR.....	- 33 -
3.3.12 Phosphat Affinity SDS-PAGE	- 33 -
3.4 Biophysikalische Methoden.....	- 35 -
3.4.1 Size Exklusion Chromatographie (SEC).....	- 35 -
3.4.2 Microscale Thermophorese (MST).....	- 37 -
3.4.3 Thermische Entfaltung mit Prometheus NT.48	- 43 -
3.4.4 DNA-Bindungsstudien (EMSA)	- 44 -
3.4.5 Ko-Lokalisation-Ermittlung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	- 45 -
3.5 Bioinformatische Methoden	- 46 -
4. Ergebnisse.....	- 47 -
4.1 Komplexbildung zwischen DcuS (PASC-Kinase) und DcuR sowie die Rolle der Phosphorylierung.....	- 47 -
4.1.1 Chromatographie von PASC-Kinase, DcuR und das DcuS x R Komplex	- 47 -
4.1.2 Thermische Stabilität von PASC-Kinase, DcuR und deren Komplexe	- 56 -
4.1.3 Komplex-Stabilität gemessen an dessen K _d -Wert.....	- 62 -
4.1.4 <i>In vitro</i> Autophosphorylierung von DcuS und PASC-Kinase	- 64 -
4.1.5 Interaktion zwischen DcuS und DcuR <i>in vivo</i> : BACTH-Messungen	- 67 -
4.2 Identifizierung von DcuS und DcuR Interaktionsstellen für die Komplexbildung.....	- 69 -
4.2.1 Alignment und Auswahl von Substitutionen in DcuS beteiligt an der Komplexbildung....	- 69 -
4.2.2 Auswirkung der DcuS-Substitutionen auf die <i>dcuB-lacZ</i> Expression	- 72 -
4.2.3 Auswirkung der DcuS-Substitutionen auf der DcuS-DcuR-Interaktion untersucht mittels BACTH - 74 -	- 74 -
4.2.4 <i>In vivo</i> Ko-Lokalisation von DcuS-Substitutionen mit DcuR	- 76 -
4.2.5 Alignment und Auswahl von Substitutionen in DcuR für die Komplexbildung mit DcuS..	- 78 -
4.2.6 Auswirkung der DcuR Substitutionen auf die DcuS-DcuR Interaktion untersucht mittels BACTH - 79 -	- 79 -

4.3	Das Zusammenspiel der PASC-Kinase x R-Komplexes mit der DNA	- 80 -
4.3.1	DNA-Bindungsstudien	- 81 -
4.3.2	Affinität von DcuR für <i>dcuBp1</i> und die Rolle von PASC-Kinase auf die Komplexbildung...	- 86 -
4.3.3	Thermische Stabilität der Komplexpartner und dem Komplex	- 92 -
4.3.4	<i>In vivo</i> Ko-Lokalisation von DcuS-DcuR und <i>dcuBp1</i>	- 96 -
5.	Diskussion	- 98 -
5.1	Der DcuS (PASC-Kinase) x DcuR - Komplex und die Rolle der Phosphorylierung	- 98 -
5.2	Identifizierung von PASC-Kinase- und DcuR-Substitutionen mit Bedeutung für die Komplexbildung.....	- 108 -
5.2.2	Reste in DcuR mit Bedeutung für die Komplexbildung.....	- 111 -
5.2	Das Zusammenspiel des DcuS(PASC-Kinase) x R-Komplexes mit der DNA.....	- 113 -
6.	Literatur	- 116 -
7.	Anhang.....	- 127 -
7.1	Stämme	- 127 -
7.2	Plasmide	- 127 -
7.3	Primer.....	- 133 -
7.4	Medien, Lösungen und Puffer	- 136 -
7.4.1	Medien und Antibiotika	- 136 -
7.4.2	Puffer und Lösungen	- 137 -
7.5	Chemikalien.....	- 143 -
7.6	Abbildungen	- 145 -
8.	Danksagung.....	- 160 -
9.	Poster.....	- 161 -

I. Abkürzungsverzeichnis

AR	Antwortregulator
AS	Aminosäure
AcP	Acetylphosphat
app.	apparent
CrbP	Carbamoylphosphar
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DHp	Dimerisierung und Histidinphospho-Transfer-Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECF	Extracytoplasmatischer σ -Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKS	Einkomponentensystem
GAF	cGMP-spezifisch und -stimulierte Phosphodiesterasen, Anabaena Adenylatcyclasen und <i>E.coli</i> FhIA
HAMP	Histidinkinasen; Adenylcyclasen; Methylakzeptierende Proteine; Phosphatasen
HPt	Histidine-containing Phosphotransfer Domäne
HRP	Horseradish peroxidase
HTH	Helix-Turn-Helix
IP	Inflection Point bzw. Wendepunkt
IgG	Immunoglobulin G
<i>lacZ</i>	Gen der β -Galaktosidase
KA	Katalytische und ATP-bindende Domäne
Ka	Assoziationskonstante
Kd	Dissoziationskonstante

MOPS	N-Morpholino-Propansulfonsäure
MU	Miller-Units
Mr	relative Molmasse
MST	Microscale Thermophorese
PDI	Protein-DNA-Interaktion
PPI	Protein-Protein-Interaktion
REC	Empfänger-Domäne des AR
SEC	Size Exklusion Chromatographie
SK	Sensorkinase
SHK	Sensor-Histidinkinasen
T	Thermophorese
TJ	Temperatursprung
Tm	Melting point bzw. Schmelzpunkt

1. Abstract

The two-component system DcuS-DcuR of *Escherichia coli* consists of the membrane-bound sensor histidine kinase DcuS and the response regulator DcuR. The sensor histidine kinase DcuS belongs to the CitA C₄-dicarboxylate family. DcuS-DcuR regulate expression of the C₄-dicarboxylate metabolism. C₄-dicarboxylates are products of plant and bacterial metabolism. The uptake of these substances is facilitated by different transporters. Under aerobic conditions, the C₄-dicarboxylate is mainly taken up by the Symporter DctA. Under anaerobic conditions, it is mainly the antiporter DcuB that ensures the uptake. DcuS forms DcuS/DctA or DcuS/DcuB sensor complexes with the transporters under aerobic conditions and anaerobic conditions, respectively. Presence of C₄-dicarboxylates leads to phosphorylation of DcuS and subsequent phosphoryl transfer to DcuR. Phosphorylated DcuR induces the expression of genes coding for the transporters and enzymes involved in C₄-dicarboxylate metabolism.

In this study the interaction and complex formation between DcuS and DcuR was investigated. DcuS forms a complex with DcuR and complex formation was stabilized by phosphorylation of DcuS or DcuR. This Complex is transient, with medium binding affinity, but strong and specific interaction.

Six amino acids in DcuS which are directly or indirectly involved in complex formation have been identified. These are located on the α 1- and α 2-helix and the linker region of the DHP domain of DcuS. Mutations in the Glu350 and Lys354 residues lead to the stimulation of the complex formation. In contrast, mutations of Asn353, Gly360 and Leu361 lead to the inhibition of the interaction between DcuS and DcuR.

DcuR and DcuR-phosphate bind to the promoter of *dcuB*, but phosphorylation affects binding and the type of DcuR-*dcuB* complexes. The presence of DcuS has an influence on DcuR binding to the promoter.

1. Zusammenfassung

Das Zweikomponenten-System DcuS-DcuR von *Escherichia coli* besteht aus der membranständigen Sensorhistidinkinase DcuS und dem zytoplasmatischen Antwortregulator DcuR. Die Sensorhistidinkinase DcuS gehört zur Familie der CitA C₄-Dicarbonsäure-Sensoren. Das DcuSR-System dient der Regulierung des C₄-Dicarbonsäurestoffwechsel. C₄-Dicarbonsäuren sind Produkte des pflanzlichen und bakteriellen Metabolismus. Die Aufnahme dieser Stoffe erfolgt unter aeroben Bedingungen über den Symporter DctA. Unter anaeroben Bedingungen übernimmt hauptsächlich der Antiporter DcuB die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäure. DcuS bildet einen DcuS/DctA oder DcuS/DcuB Sensorkomplex mit den Transportern unter aeroben beziehungsweise anaeroben Bedingungen. Die Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäure führt zur Phosphorylierung von DcuS und anschließender Phosphorylübertragung auf DcuR. Phosphorylierter DcuR induziert die Expression der Gene, kodierend für die Transporter und Enzyme, die beteiligt an dem C₄-Dicarbonsäurestoffwechsel sind.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion und Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR untersucht. DcuS bildet einen Komplex mit DcuR und die Komplexbildung wurde durch Phosphorylierung von DcuS oder DcuR stabilisiert. Dieser Komplex ist transient, mit mittlerer Bindungsaffinität, aber starker und spezifischer Interaktion.

Es wurden fünf Aminosäuren in DcuS identifiziert, die direkt oder indirekt an der Komplexbildung beteiligt sind. Diese befinden sich auf der α 1- und α 2-Helix und der dazwischen befindlichen Linker der DHp-Domäne von DcuS. Mutationen in den Glu350- und Lys354-Resten führen zur Stimulierung der Komplexbildung. Dagegen führen Mutationen von Asn353, Gly360 und Leu361 zur Hemmung der Interaktion zwischen DcuS und DcuR.

DcuR und DcuR-Phosphat binden an den Promotor von *dcuB*, aber die Phosphorylierung beeinflusst die Bindung und die Art der DcuR-*dcuB*-Komplexe. Die Anwesenheit von DcuS hat einen Einfluss auf die Bindung von DcuR an den Promotor.

2. Einleitung

In Prokaryoten befindet sich das genetische Material der Zelle (Chromosom) dicht verpackt im Nukleoid, ohne Zellkern (Shatalkin, 2004). Die Prokaryoten besiedeln unterschiedlichste Standorte und haben eine Biomasse von 77,2 Gt (Gigatonnen). Das sind 15 % der gesamten auf der Erde vorkommenden Biomasse. Gemeinsam haben sie eine vielseitige individuelle Anpassungsfähigkeit, Stoffwechselvielfalt und katalysieren die biogeochemischen Stoffkreisläufe der Erde. Sie werden in unterschiedlichsten biotechnologischen Verfahren eingesetzt (Whitman *et al.*, 1998; Bar-On *et al.*, 2018).

Der Mensch und die Mikroorganismen entwickeln sich parallel zu- und miteinander weiter. Lange Zeit prägten Hunger, mangelnde Hygiene und Infektionskrankheiten das Leben der Menschen. Wissenschaftliche Erkenntnisse, neue Technologien, Bildung sowie Aufklärung, speziell in den letzten 100 Jahre, verbesserten die Lebensbedingungen- und Qualität vieler Menschen und eröffneten den Kampf gegen Infektionskrankheiten und deren Erreger.

Ein wichtiger Schritt im Erforschen von Mikroorganismen ist deren Kultivierung. *Escherichia coli* wurde erstmals 1886 von Theodor Escherich beschrieben und ist seitdem als Modellorganismus und Werkzeug der Molekularbiologie bekannt (Blount, 2015). Dieses gram-negative γ -Proteobakterium hat vielseitige metabolische und regulatorische Fähigkeiten, durch die die Kolonisierung von Boden, Wasser, Tieren und Pflanzen ermöglicht wird. *E. coli* siedelt sich im Dickdarm von Wirbeltieren an und ist ein fester Bestandteil des Säugetier-Darm-Mikrobioms (Leimbach *et al.*, 2013; Blount, 2015; Wörner, 2017). *E. coli* hat unterschiedliche Strategien in der Beziehung zu seinem Wirt und kann eine mutualistische oder kommensalistische, aber auch eine pathogene Interaktion mit dem Wirt eingehen (Hendrickson, 2009; Blount, 2015).

2.1 Regulation des Energiestoffwechsels und der Atmung von *E. coli*

Beim Energiestoffwechsel werden bevorzugt energiereiche Kohlenstoffquellen verwendet. Hexosen (z. B. Glucose) aber auch C₄-Dicarbonsäuren (Succinat, Fumarat und L-Malat) sind bevorzugte C-Quellen (Kohlenstoffquellen) für *E. coli*. Die Regulation der Glucose-Verwertung wird im Wesentlichen durch das Phosphotransfersystem (PTS-System) durchgeführt (Deutscher *et al.*, 2006; Uden *et al.*, 2016). Dabei wird das Substrat durch

Transporter in der Zelle aufgenommen und über mehrere Proteinkinasen durch Phosphorylierung für den Abbau aktiviert. Entscheidend dabei ist das Verhältnis an phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem EIIA-Protein, welches wiederum von der Anwesenheit von Glucose abhängt. Ist keine Glucose als Substrat vorhanden, liegt das EIIA-Protein phosphoryliert vor und aktiviert die Adenylatcyclase welche cAMP bildet. cAMP bindet an dem cAMP-Rezeptor-Protein (CRP), das als Transkriptionsaktivator für die Expression von Genen fungiert, die an der Aufnahme von alternativen C-Quellen wie Pentosen, aber auch C₄-Dicarbonsäure beteiligt sind (Blencke *et al.*, 2003; Deutscher *et al.*, 2006; Unden *et al.*, 2016).

Zur Verstoffwechslung von externer C₄-Dicarbonsäure werden unter aeroben und anaeroben Bedingungen verschiedene C₄-Dicarbonsäure-Transporter, der Citratzyklus und der Pyruvat-Bypass benötigt (Unden *et al.*, 2016). Wird unter aeroben Bedingungen, anstelle von Glucose, Fumarat als Substrat vorgelegt, wird dieses im Citratzyklus vollständig oxidiert. (Zienz *et al.*, 1998; Janasch *et al.*, 2002).

Wichtig für die Umsetzung der C-Quellen ist die Anwesenheit von Elektronentransportwegen. Welche Elektronentransportwege zur Energiegewinnung benutzt werden, wird von *E. coli* auf der Transkriptionsebene gesteuert, da viele der Operone (kodierend für Enzyme des Elektronentransports) auf das Vorhandensein von Elektronenakzeptoren reagieren. So kann *E. coli* zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel umschalten (Gunsalus, 1992).

Wenn Sauerstoff vorhanden ist, wird hauptsächlich aerobe Atmung betrieben und das Substrat wird vollständig zu Kohlendioxid oxidiert. Die Energieausbeute ist hierbei maximal, da diese an das Redoxpotential des Elektronenakzeptors gekoppelt ist. Die Sauerstoffregulation wird in *E. coli* gleichzeitig von zwei Regulatoren gesteuert. Die Steuerung übernehmen zum einen das Zweikomponenten-System ArcB/A (Aerobic respiratory Control), zum anderen das zytoplasmatische Einkomponentensystem FNR (Fumarat Nitratreduktase Regulator) (Gunsalus, 1992; Goh *et al.*, 2005; Unden *et al.*, 2016). In der Abwesenheit von Sauerstoff wird bevorzugt die Synthese der Nitratatmung durch Nitrat induziert. Wenn auch Nitrat fehlt, werden DMSO / TMAO oder Fumarat zur Oxidation benutzt. Die potenzielle freie Energie, die durch die Reduktion der alternativen Substrate

entsteht, ist deutlich niedriger als mit Sauerstoff oder Nitrat (Gunsalus, 1992; Gencheva, 2016; Uden et al., 2016).

2.2 Der C₄-Dicarbonsäure-Stoffwechsel und die Transporter

Die globale Regulation der Verstoffwechslung von externen C₄-Dicarbonsäuren, in Abhängigkeit von der C-Quelle (via cAMP/CRP), sowie der Anwesenheit von Sauerstoff (via FNR) und der Redoxstatus der Zelle (via ArcB/A) spiegeln die verschiedenen Ebenen, auf welchen die Regulation stattfindet, wider.

C₄-Dicarbonsäuren sind Produkte des pflanzlichen- und bakteriellen Metabolismus und kommen in unterschiedlichen Habitaten vor. Zu den häufig vorkommenden C₄-Dicarbonsäuren gehören Succinat, Fumarat, Malat und Oxalacetat. Die Aufnahme dieser Stoffe wird von unterschiedlichen Transportern gewährleistet. Welcher Transporter und der damit verbundene Stoffwechselweg zu dem Abbau oder der Veratmung von C₄-Dicarbonsäure verwendet wird hängt davon ab, ob Sauerstoff als Elektronenakzeptor vorhanden ist.

Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäure als Dianion im Symport mit 2 - 3 Protonen über die Transporter DctA, DauA, DcuA und SaltP (Abb.: 1A). Dabei ist DctA der bevorzugte Transporter für die Aufnahme von einem breiten Spektrum an C₄-Dicarbonsäuren bei neutralem pH-Wert. DctA ist ein sekundärer Transporter und gehört der DAACS-Familie an. Der Transporter wird auf der Transkriptionsebene sowohl durch Glycose (aerob), als auch durch das ArcBA-System (anaerob) reprimiert und zum anderen durch das DcuSR-System stimuliert (Davies *et al.*, 1999; Uden *et al.*, 2016b). Der zweite wichtige Transporter, DauA, ersetzt bei niedrigem pH-Wert DctA. Diese katalysiert die Aufnahme von Succinat. SaltP transportiert entweder Acetat oder Succinat. Die Aminosäure Aspartat wird sowohl durch DctA als auch durch GltP aufgenommen und über die Aspartase AspA desaminiert. Als Produkt entsteht Fumarat (Wörner, 2017). Nach der Aufnahme der C₄-Dicarbonsäure wird diese in den Citratzyklus eingeschleust und zu CO₂ oxidiert. Energetisch entstehen pro Mol C₄-Dicarbonsäure 14 Reduktionsäquivalenten in Form von NADH und QH₂ (Karinou *et al.*, 2013; Uden *et al.*, 2016b).

Unter anaeroben Bedingungen übernehmen die Antiporter DcuB, DcuA und TtdT die Aufnahme der C₄-Dicarbonsäure im Antiport von Succinat (Abb. 1B). Die Hauptaufgabe

übernehmen DcuA und DcuB, die zu der DcuAB-Transporter-Familie gehören. Die Gene für diese Transporter liegen benachbart auf der DNA und werden mono- bzw. polyzistronisch mit den Genen der Aspartase bzw. Fumarase B co-transkribiert (Six *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998). DcuB wird auf der Transkriptionsebene durch das NarX-NarL-System reprimiert und durch FNR, CRP und das DcuS-DcuR-System stimuliert. Der Citrat/Succinat-Antiporter CitT kann Citrat aufnehmen und durch die Citratlyase zu Oxalacetat und Acetat aufspalten. Nach der Aufnahme der C₄-Dicarbonsäure werden diese über den reduktiven Ast des Citratzyklus zu Fumarat umgewandelt, das als Elektronenakzeptor dient.

Zum Transport der C₄-Dicarbonsäuren ist eine Wahrnehmung dergleichen durch *E. coli* relevant. Transporter und Zweikomponenten-Systeme bilden Sensor-Module, die zusammenarbeiten. In diesen Sensor-Modulen kann der Transporter eine Doppelfunktion als Transporter und als Sensor einnehmen (z.B. In dem Zweikomponenten-System PhoRB und dem PstS-Transporter). Hierbei fehlt dem Zweikomponenten-System ein Strukturbereich für die Signalwahrnehmung. Es ist auf den Transporter angewiesen um die Konzentration an verfügbaren Signalmolekülen (hier Phosphat) zu erkennen (Hsieh & Wanner, 2010; Gardner *et al.*, 2014 Uden *et al.*, 2016b).

Im Falle des C₄-Dicarbonsäure-Metabolismus besitzt *E. coli* drei verschiedene Systeme zur Wahrnehmung und Regulation: den LysR-Typ L-Tartrat-Regulator (TtdR), den D-Malat-Regulator DmlR sowie den C₄-Dicarbonsäure-Sensor DcuS mit dem Antwortregulator DcuR (Scheu *et al.*, 2010). Unter anaeroben Bedingungen und in Gegenwart von nicht-üblichen C₄-Dicarbonsäuren, wie L- oder Meso-Tartrat, stimuliert TtdR die Expression der Schlüsselenzyme für die L-Tartrat-Fermentation. Dies sind der L-Tartrat/Succinat-Antiporter TtdT und die L-Tartrat-Dehydratase TtdAB, die vom *ttdAB-ttdT*-Operon kodiert werden. Ist Sauerstoff vorhanden, aktiviert DmlR den aeroben D-Malat-Katabolismus, in dem DmlR die Expression von DmlA (D-Malat-Dehydrogenase) kontrolliert.

Das Enzym DmlA spaltet Malat zu Pyruvat und CO₂ (Uden *et al.*, 2016). Die Wahrnehmung des breiten Spektrums an C₄-Dicarbonsäuren unter anaeroben und aeroben Bedingungen übernimmt das Zweikomponenten-System DcuS-DcuR.

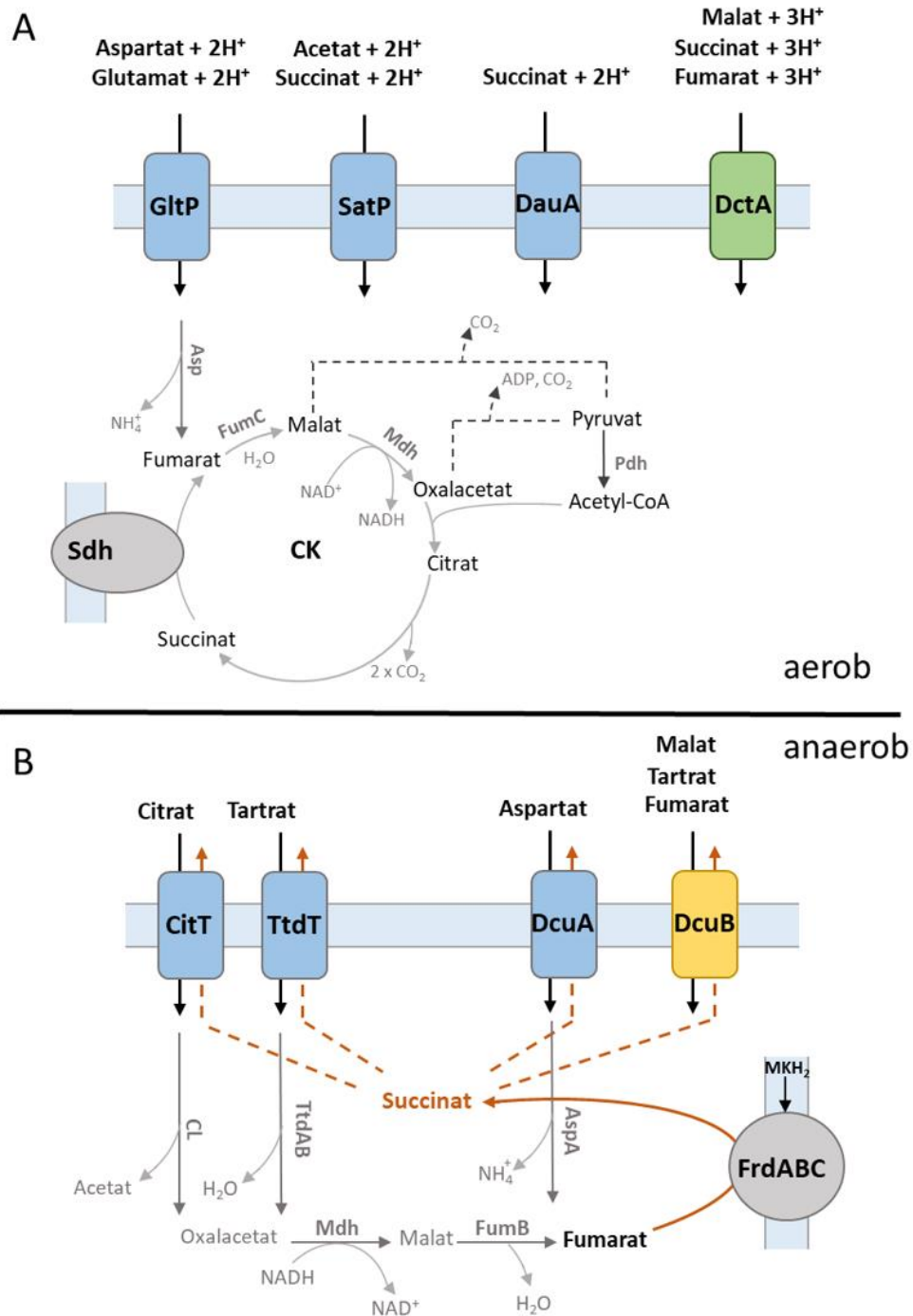


Abb.: 1 Übersicht über den aeroben und anaeroben C₄-Dicarbonsäure-Stoffwechsel in *E. coli*. (A) Unter aeroben Bedingungen sind DctA (pH 7) und DauA (pH 5) wichtige Transporter für die C₄-Dicarbonsäureaufnahme. SatP nimmt Acetat bzw. Succinat und GltP die Aminosäuren Glutamat und Aspartat auf. Die C₄-Dicarbonsäure und die desaminierten Aminosäuren werden in dem Citratzyklus (CZ) eingeschleust und zu CO₂ oxidiert. Abkürzungen: Aspartase (Asp), Sdh (Succinatdehydrogenase, Fumarase C (FumC), Malatdehydrogenase (Mdh) und Pyruvatdehydrogenase (Pdh). (B) Unter anaeroben Bedingungen übernehmen den Haupttransport die zur DcuAB-Familie angehörigen Transporter DcuA und DcuB. Für den Transport von Tartrat wird TtdT verwendet. Citrat wird über CitT aufgenommen und zu Oxalacetat und Acetat gespalten. Fumarat wird über die Fumaratreduktase (FrdABC) zu Succinat reduziert. Abkürzungen: Citratlyase (CL), Tartratdehydratase (TtdAB); Fumarase B (FumB) und Aspartase A (AspA).

2.3 Regulation des C₄-Dicarbonsäure-Stoffwechsels und das Zweikomponenten-System DcuS-DcuR in *E. coli*

2.3.1 Reizerkennung in Bakterien

Alle lebenden Organismen reagieren auf ihre Umwelt durch Wahrnehmung und entsprechenden Anpassung. Bakterien besiedeln unterschiedliche Habitate, von extremen Standorten wie radioaktiven Mülldeponien, Vulkanen, heißen und sauren Geysiren, bis zu den gewöhnlichen Habitaten, wie dem Boden, Saline oder limnische Gewässer. Ihr Leben ist durch Nährstoffwettbewerb und dem Wechsel externer Parameter (z.B. pH-Wert, Osmolarität, Nährstoffquellen, Sauerstoffgehalt) geprägt. Dabei ist die prokaryotische Zelle viel weniger organisiert und die Begrenzung nach außen wird durch die Zellwand (unterschiedliche Dicke) gewährleistet. Unter solchen Bedingungen ist Flexibilität, die Wahrnehmung der Umgebung und eine sofortige Anpassung des Metabolismus überlebensnotwendig (Jordan *et al.*, 2008).

Diese Flexibilität erfordert ein komplexes Netzwerk an Regulationssystemen, welche gleichzeitig extrinsische und intrinsische Reize wahrnehmen können. Solche Systeme zur Signalwahrnehmung, Weiterleitung und gezielter Genexpression sind in großer Anzahl in bakteriellen Genomen kodiert (Salazer & Laub, 2015; Hentschel, 2015; Gencheva, 2016). Dennoch ist die Gesamtzahl der Gene unterschiedlich ausgeprägt, auch unter eng verwandten Mikroorganismen. Die Anzahl an Signalproteinen korreliert oft mit der Genomgröße. Die meisten an der Signalwahrnehmung und Weiterleitung beteiligten Proteine sind Sensorkinasen (SK), Sensorhistidinkinasen (SHK), Ser/Thr-Proteinkinasen (SPK/STK), Methyl-akzeptierende Chemotaxis-Proteine, Adenylatzyklasen und c-di-GMP-spezifische Phosphodiesterasen. Beispiele für an der Genregulation beteiligte Proteine sind Antwortregulatoren (AR) (Galperin *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2017). Einkomponentensysteme und Zweikomponentensysteme sind zwei bekannte Modelle für solche Regulationssysteme.

Einkomponentensystem (EKS)

EKS sind weit verbreitet in Prokaryoten und spielen bei der Wahrnehmung und Regulation von Quorum-Sensing, Zucker- und Stickstoffstoffwechsel, Antibiotikaresistenzen und der morphologischen Entwicklung der Zelle eine entscheidende Rolle. Dieses System besteht aus einem meist zytosolischen Protein, welches sowohl die reizwahrnehmende Sensor-Domäne, als auch die regulatorische DNA-Bindedomäne besitzt. Die zweite Domäne kann N- oder C-Terminal-orientiert sein. Die Klassifizierung der EKS erfolgt anhand der Sequenz (Motive) innerhalb der DNA-Bindedomäne. Bekannte Beispiele sind der Lac-Repressor (LacI) oder TetR, welches verantwortlich für die Tetracyclin-Resistenz in *E. coli* ist (Ulrich et al., 2005; Cuthbertson & Nodwell, 2013). Die Anzahl an EKS und Zweikomponentensystem (ZKS) eines Genoms korreliert mit der Größe des Genoms. Mit einer Erhöhung der Genomgröße geht oft eine Erhöhung der Komplexität der Genregulation einher. Phylogenetische Studien legen nahe, dass EKS die evolutionären Vorläufer von ZKS sind (Ulrich et al., 2005; Alm et al., 2005).

Zweikomponentensystem (ZKS)

Die Diversität an Umwelterkennungssystemen in Bakterien variiert stark zwischen eng verwandten Arten. Das Genom der Bakterien kodiert für unterschiedliche Anzahlen an HPKs. *E. coli* und *Bacillus subtilis* besitzen jeweils 25 Gene für HPKs (Wolanin et al., 2002; West et al., 2001). Die Ausprägung und Anzahl an solchen Systemen einer Art korreliert mit der phylogenetischen Position, dem Lebensstil und der ökologischen Nische. Die Anzahl an signalübertragenden Systemen wird als Maß für die Fähigkeit des Organismus, sich an verändernde Umweltbedingungen anzupassen, angesehen. Dies ist auch als „bakterieller IQ“ bekannt. Das Verhältnis von transmembranen Rezeptoren zu zytoplasmatischen Sensoren definiert, ob Bakterien „extrovertiert“ sind und somit ihre Umgebung aktiv wahrnehmen oder „introvertiert“ und somit mehr auf ihre Homöostase konzentriert sind (Galperin, 2005; Ulrich & Zhulin, 2010; Gencheva, 2016). Es liegt nahe, dass HKs (und AR) in Bakterien ihren Ursprung gefunden haben, obwohl sie in vielen Domänen des Lebens vertreten sind. Bei den Prokaryoten befinden sich die Gene für HKs und deren analogen AR oft zusammen auf dem gleichen Operon und werden co-exprimiert. So wird die funktionale

Beziehung zwischen den beiden Proteinpartnern auf der genetischen Ebene widergespiegelt (Wolanin *et al.*, 2002; Gencheva, 2016). Das Zweikomponentensystem besteht aus einem Sensor und einem Antwortregulator (AR). Im Vergleich zum EKS erfolgt hier zwischen zwei Proteinen eine Arbeitsteilung der Informationsverarbeitung. Dadurch verfügen Organismen über ein komplexes Netzwerk an Regulationssystemen in einer von Reizen überfluteten Umgebung. Mit diesen komplexen Netzwerken kommt die Fähigkeit einher, sich physiologisch an gegebene Umweltbedingungen anzupassen. Diese Anpassung spiegelt sich in der alternierenden Genexpression wider.

2.3.2 Das Zweikomponenten-System DcuS-DcuR von *E. coli*

DcuS-DcuR gehört zu der Familie der CitA/C₄-Dicarbonsäure-Sensoren. Als Zweikomponenten-System besteht es aus der membranständigen C₄-Dicarbonsäure-sensorischen Histidinkinase (DcuS) und dem zytoplasmatischen Responseregulator (DcuR) (Janausch *et al.*, 2002; Scheu *et al.*, 2010).

Charakteristische Aufbau der SHK DcuS

Es gibt viele verschiedene Arten an HKs. Je nachdem wie die sensorische Domäne aufgebaut ist und wo diese liegt, wird zwischen zytoplasmatischen, transmembranen und hybriden HKs unterschieden. Im Detail werden hier transmembrane SHKs besprochen, die die größte Gruppe an SK bilden. Gemeinsam ist diese Gruppe eine extrazytoplasmatische Input- bzw. sensorische Domäne (Mascher *et al.*, 2006).

Die Input-Domäne liegt N-terminal und dient der spezifischen Signalerkennung. Oft ist diese als PAS-Domäne organisiert. Die Signalerkennung erfolgt durch Protein-Protein-Interaktion oder Ligandenbindung von Signalmolekülen. Durch Konformationsänderung der N-terminalen-Input-Domäne und der dadurch resultierenden Aktivierung der zytoplasmatischen Output-Domäne des HPK wird die Information weitergeleitet. Diese zytoplasmatische C-terminale-Output-Domäne, auch als Kinasedomäne bezeichnet, aktiviert die N-terminale Domäne des AR (Mascher *et al.*, 2006; Podgornaia & Laub, 2013). Die Kinasedomäne wird aus dem sogenannten Kern oder ‚Core‘ der Kinase gebildet. In diesem wird zwischen zwei weiteren Funktionseinheiten unterschieden: der Dimerisierungs- und Histidinphospho-Transfer-(DHp) Domäne und der katalytischen und ATP-bindenden

(KA) Domäne. Auf der Basis der Sequenzhomologie innerhalb dieser zwei Domänen, wurden fünf homologe Sequenzbereiche (Boxen) definiert, die in fast allen Histidinkinasen zu finden sind.

Die H-Box liegt in der DHP-Domäne des Kinaserkerns und beherbergt einen His-Rest, an welchem die Autophosphorylierung und die Phosphorylübertragung auf den Antwortregulator stattfindet (Parkinson & Kofoed, 1992). Dieser Bereich der SK ist von wichtiger enzymatischer Aktivität für das gesamte System. Durch die Autokinase- und Phosphotransferase der SK wird die AR phosphoryliert bzw. aktiviert. Die Phosphataseaktivität der SK wird dagegen als negative Regulation bezeichnet, da die AR dadurch dephosphoryliert und deaktiviert wird. Das Verhältnis zwischen positiver und negativer Regulation entscheidet über den Aktivitätszustand des AR, das sich in der Genexpression von Zielgenen zeigt (Marina *et al.*, 2005; Gao & Stock, 2010; Huynh & Stewart, 2011; Salazar & Laub, 2015).

Die übrigen vier homologen Sequenzbereiche (N-, D-, F- und G-Boxen) liegen in der KA-Domäne (Gao & Stock, 2010). Anhand dieser Sequenzhomologien können HKs in Klassen und Familien zusammengefasst werden (Dutta *et al.*, 1996; Wolanin *et al.*, 2002). Anhand der Sequenzhomologie wurden 11 Subfamilien an SHK postuliert (Dutta *et al.*, 1999; Wolanin *et al.*, 2002; Finn *et al.*, 2010).

DcuS ist der SHK 5 Gruppe angehörig. DcuS besitzt zwei Transmembranhelices (TM1, TM2) und eine, zwischen den Beiden sitzende, periplasmatische Per-ARNT-Sim-Domäne (PASp) (Zientz *et al.*, 1998, Golby *et al.*, 1999). Die Substratbindestelle und somit die sensorische Funktion der PASp-Domäne konnte durch NMR und Röntgenkristallographie gezeigt werden (Pappalardo *et al.*, 2003; Cheung & Hendrickson, 2008). PASp bindet ein breites Spektrum an C₄-Dicarbonsäuren, bevorzugt aber Malat und Fumarat (Kneuper, 2005; Wörner *et al.*, 2018). Die Bindung des Substrates führt zur Konformationsänderung in PASp, mit daraus resultierender Kolbenhubbewegung und einer Verschiebung der TM2-Domäne Richtung Zytoplasma um 4 - 6 Å (Monzel & Unden, 2015; Salvi *et al.*, 2017). Über die zytoplasmatisch liegende PASc-Domäne wird das Signal an den Kinasekern weitergeleitet (Monzel *et al.*, 2013). Der Kinasekern katalysiert schließlich, ATP-abhängig, die Autophosphorylierung des Histidinrests 349 in der DHP-Domäne. Die DHP-Domäne erstreckt sich über zwei Helices (α 1 und α 2). An dieser schließt sich über einen kürzeren Linker die KA-Domäne an.

Die Expression von *dcuS* ist autoreguliert. *dcuS* liegt mit *dcuR* in einem Operon, welches zu dem NarL-Regulon gehört. Ist Nitrat vorhanden, wird die Transkription von *dcuS-dcuR* unterdrückt. In der Abwesenheit von Nitrat aktiviert FNR die Expression des *dcuS-dcuR*-Operons anaerob (Goh *et al.*, 2005).

Charakteristischer Aufbau eines AR der Subfamilie NarL/FixJ und DcuR

Das zweite Protein des Zweikomponenten-Systems ist der Antwortregulator. AR werden je nach Aufbau und Funktion der DNA-Bindedomäne in Familien zusammengefasst. Zwei davon, nämlich die OmpR- und NarL-Familie haben HTH (Helix-Turn-Helix)-Motive, die direkt mit der DNA interagieren können und somit die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit dem Promotor beeinflussen (Galpern, 2006).

Im Fall der NarL/FixJ-Subfamilie, zu welcher DcuR gehört, nehmen die der Familie zugehörigen Proteine eine $(\beta\alpha)_5$ -Topologie an. N-terminal liegt die Empfänger-Domäne (REC). Die REC-Domäne besitzt eine hydrophobe ATP-Tasche, die von drei konservierten Asp-Resten und einem Pro-Rest gebildet wird. Die REC-Domäne steuert einen nucleophilen Angriff auf die Phosphoryl-Gruppe der SK und katalysiert deren Übertragen auf sich. Es wurde bereits gezeigt, dass der AR nicht nur durch den analogen SK, sondern auch von kleinen Phosphoryl-übertragenden Molekülen (Carbamoyl- oder Acetyl-Phosphat) phosphoryliert werden können (Bourret, 2010; Noriega *et al.*, 2010). Nachdem die REC-Domäne den Phosphoryl-Rest gebunden hat, zeigt die C-terminal liegende DNA-Bindedomäne mit konservierten Lys- und Pro-Resten eine Konformationsänderung. Oft induziert die Phosphorylierung der REC-Domäne die Dimerisierung des AR. Dieser Dimerisierung findet in der REC-Domäne statt (Galperin, 2006; Gao & Stock, 2010; Bourret, 2010)(Galperin 2010; Gao *et al.*, 2010). Als Antwort auf die Phosphorylierung steuert der AR die entsprechende Zellantwort durch Protein-DNA-Interaktion. Schließlich führt diese Abfolge der Signalweiterleitung zur differenzierten Genexpression der benötigten Gene (Mascher *et al.*, 2006; Podgoraia & Laub, 2013).

Im Fall von DcuR erfolgt die Übertragung der Phosphoryl-Gruppe vom Phospho-Histidin auf Asp56. DcuR-P bindet an den Promotor und induziert die Transkription der Zielgene. Die regulatorische DNA-bindende Domäne von DcuR besitzt ein HTH-Motiv. Die DNA-Bindestellen sind AT-reiche Regionen, die sich 5'-Richtung zu den transkribierenden Genen befinden (z.B. *dcuA*, *dcuB*, *frdABCD*) (Abo-Amer *et al.*, 2004; Janausch *et al.*, 2004). DcuR

besitzt eine intrinsische Phosphataseaktivität, die aber nicht genauer charakterisiert ist (Krämer *et al.*, 2007).

Die Transporter DctA und DcuB als molekulare Schalter für das DcuSR-System

DcuS wird nur in Anwesenheit der Transporter DctA (aerob) oder DcuB (anaerob) in der C₄-Dicarbonsäure sensitiven Zustand versetzt. In Abwesenheit der Transporter ist das DcuS-DcuR-System konstitutiv aktiv und die DcuR abhängige Genexpression findet statt. Diese basale Aktivität gewährleistet eine Basisexpression der Transporter, um den C₄-Stoffwechsel auch bei niedrigen Konzentrationen zu sichern (Kleefeld *et al.*, 2009; Scheu *et al.*, 2014; Uden *et al.* 2016, Surmann *et al.*, 2020). Unter anaeroben Bedingungen und der Anwesenheit von C₄-Dicarbonsäuren wird ein DcuS/DcuB-Sensorkomplex (unter aeroben Bedingungen ein DcuS/DctA-Sensorkomplex) gebildet. Dadurch wird das konstitutiv aktive DcuS in eine C₄-Dicarboxylat-responsive Form überführt. DcuR kann so, entweder durch das komplexierte DcuS oder das freie sich nicht in den DcuS/DcuB-Komplex befindliche DcuS, phosphoryliert werden. DcuR bindet an den Promotor und induziert die Transkription der Zielgene (Janausch *et al.*, 2004; Wörner *et al.*, 2018).

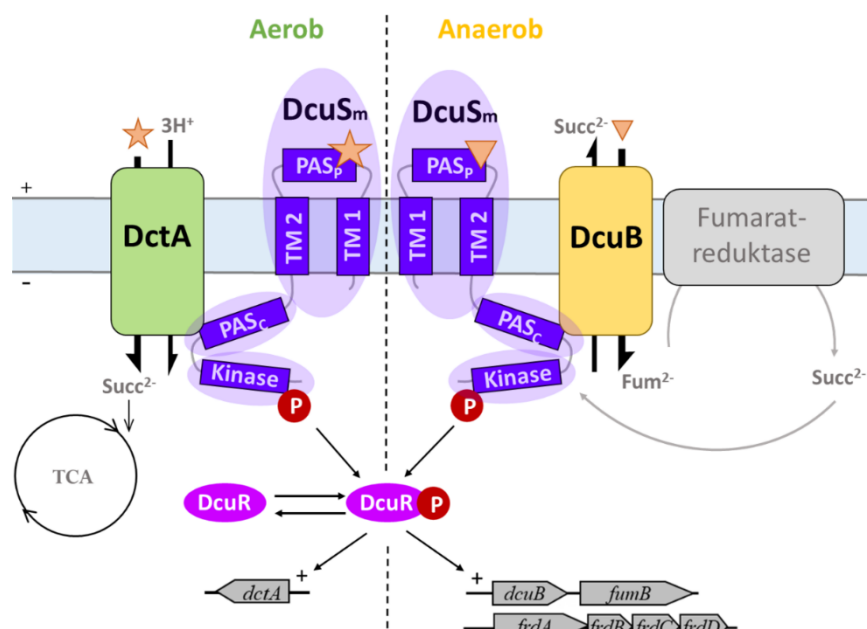


Abb. 2: Modell des C₄-Stoffwechsels durch das ZKS DcuSR. Unter aeroben Bedingungen bildet DcuS mit DctA einen DcuS/DctA-Sensorkomplex. In Anwesenheit von Succinat (Stern) wird dann durch eine Signalkette die Expression des Zielgens *dctA* durch DcuR gesteuert. Unter anaeroben Bedingungen und in der Anwesenheit von Fumarat (Dreieck) induziert das im DcuS/DcuB-Komplex liegende DcuS die Phosphorylierung von DcuR. Daraufhin aktiviert DcuR die Expression von Genen der Fumarat-Atmung (*fumB*, *frdABCD* und *dcuB*).

2.4 Protein-Protein Interaktionen

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) sind allgegenwärtig und dienen meistens der Regulation des dichten Netzwerks an biologischen Prozessen in der Zelle. Diese physikalischen Wechselwirkungen zwischen Domänen unterschiedlicher Proteine führen zur Bildung von Heterokomplexen. Es wird zwischen obligaten und nicht-obligaten Heterokomplexen unterschieden. Obligate Komplexe bestehen aus Protomeren, die nicht unabhängig voneinander existieren können und deren Interaktion für die biologische Lebensdauer der Proteine anhält (De *et al.*, 2005; Perkins *et al.*, 2010). Die Protomeren von nicht-obligaten Heterokomplexen sind eigenständige biologische Einheiten und besitzen oft eigene biologische Funktion, unabhängig von dem Heterokomplex. Innerhalb der nicht-obligaten Heterokomplexen kann zwischen permanenten und transienten Wechselwirkungen unterschieden werden (De *et al.*, 2005; Kundrotas & Alexov, 2006). Permanente Wechselwirkungen sind stark und oft irreversibel. Dagegen sind transiente Wechselwirkungen schwächer als die permanenten, aber dennoch sehr spezifisch (Nooren & Thornton, 2003). Ein nicht-obligaten Heterokomplexen, welcher durch transiente Wechselwirkungen charakterisiert wird, wird auch als transienten Komplex bezeichnet. Die Bildung eines transienten Komplex erfordert oft einen molekularen Auslöser (De *et al.*, 2005; Kundrotas *et al.*, 2006; Zhou & Pang, 2018). Es ist herausfordernd einen nicht-obligaten Komplex eindeutig zu charakterisieren, da ein einziges Protomer als ein Kontinuum von permanenten und transienten Interaktionen zu betrachten ist, dessen Stabilität stark von den physiologischen Bedingungen und der Umgebung abhängt. Eine Interaktion kann *in vivo* hauptsächlich transient sein, wogegen sie *in vitro* unter bestimmten zellulären Bedingungen permanent werden kann. Biochemisch ist die treibende Kraft für die PPI die lokale Konzentration der Komponenten und die freie Energie der Komplexbildung. Die Assoziation von Proteinen zu transienten Komplexen erfordert das Aufeinandertreffen der interagierenden Oberflächen dieser Proteine, was eine Ko-Lokalisation oder Rekrutierung der Komponenten erfordert (Jones *et al.*, 2000; Nooren & Thornton, 2003; Perkins *et al.*, 2010).

Die Oberflächen, die an einer (oder mehreren) PPI beteiligt sind, werden als Schnittstelle betrachtet. Solche Schnittstellen können durch „Alanin-Scanning-Mutagenese“-Experimente (Clackson & Wells, 1995) oder durch bioinformatische Methoden (Aytuna *et*

al., 2005; Tuncbag *et al.*, 2009; Cukuroglu *et al.*, 2014, Lua *et al.*, 2014) nachgewiesen werden. Sie sind das Zentrum der Interaktion und werden „Hot-Spot's“ genannt. Eigenschaften der AS-Seitenketten in diesen „Hot-Spot's“ sind die Schlüsselemente bei der Erkennung, Bindung und Affinität der PPI (Aytuna *et al.*, 2005; Cukuroglu *et al.*, 2014). Allerdings tragen nicht alle AS, die sich in einem „Hot-Spot's“ befinden, gleichermaßen zur Bindung bei. Viele Studien zeigen, dass Trp, Tyr, Asp, Asn und Arg häufig zur Bildung von transienten PPI beitragen und somit zur Komplexbildung. Substitution dieser Aminosäuren (z.B. durch Alanin) verursacht einen Unterschied in der Bindungsenergie (mehr als 1-2 kcal/mol), wodurch der Komplex destabilisiert wird (Orfan & Rost, 2002; Aytuna *et al.*, 2005; De *et al.*, 2005; Nishi *et al.*, 2011; Vishwanath *et al.*, 2017).

Die Fähigkeit von Proteinen zu assoziieren und Komplexe zu bilden hängt unter anderem von den Proteinkonzentrationen, der Ko-Lokalisation der Proteine, der Assoziationskonstante bzw. der Dissoziationskonstante ab. Die Bindungsaffinität einer PPI steht in reziproker Beziehung zu der Dissoziationskonstante (K_d). Permanente Interaktionen besitzen starke Bindungsaffinitäten (K_d im nM-Bereich). Transiente PPI zeigen ein Gleichgewicht von gebundenem zu ungebundenem Zustand mit K_d -Werten im nM- und mM-Bereich (Perkins *et al.*, 2010).

Durch post-transkriptionelle Modifikation, wie z.B. der Protein-Phosphorylierung, kann die Stärke der PPI verändert werden. So kann die dianionische Phosphatgruppe die physikalischen und chemischen Eigenschaften des phosphorylierten Proteins verändern (Nishi *et al.*, 2011). Oft liegt der Phosphorylierungs-Rest im Zentrum der Interaktionsoberfläche des Proteins und kann die Bindungsenergie der Komplexbildung direkt beeinflussen (Perkins *et al.*, 2010; Olivera *et al.*, 2012; Cukuroglu *et al.*, 2014). Die Phosphorylierung führt häufig zu Konformationsänderungen und dadurch allosterischer Regulation der Interaktion. Barford (*et al.*, 1991) zeigten, dass Phosphorylierung der Glykogenphosphorylase zu einer starken Domänen-Reorganisation führt. Andererseits ist es bekannt, dass die Proteinphosphorylierung die Eigenschaften des Proteins verändert, ohne Konformationsänderungen des Proteins zu induzieren. Ein solche Konformations-unabhängige Modulation zeigt die Isocitrat-Dehydrogenase: diese wird durch Phosphorylierung inaktiviert, indem die Phosphorylierung die Substratbindung hemmt (Hurley *et al.*, 1990; Serber & Ferrell, 2007). Experimentelle Studien an dem MAPK-Kaskade-involvierten Ste5-Protein von *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass die Phosphorylierung

die Dissoziationsenergie um etwa 1,5 kcal/mol erhöht (Serber & Ferrell, 2007; Stickfaden et al., 2007; Nishi *et al.*, 2011).

2.5 Protein-DNA Interaktion

Die Bakterienzelle ist eine kleine (0,3 μm bis 750 μm), sehr verdichtete Einheit mit fehlender Kompartimentierung und beinhaltet Proteine, Metabolite, DNA, Plasmide und Moleküle. Dabei nimmt das Nukleoid $\sim 50\%$ des Zellvolumens ein. Die DNA ist in dem Nukleoid als Superhelix organisiert. Zur Genexpression muss die RNA-Polymerase am Promotor der Gene binden. An der Erkennung und -Bindung der RNA-Polymerase am Promotor sind verschiedene Proteine beteiligt. Diese modifizieren die Aktivität und Spezifität der RNA-Polymerase und regulieren dadurch die Genexpression. Zur Kontrolle der Transkription wird die Aktivität der regulatorischen Proteine durch andere Proteine oder Liganden spezifisch reguliert. Der regulatorische Effekt kann, in Bezug auf die Transkription, negativ oder positiv sein, was zur abgeschwächten oder verstärkten Expression der Zielgene führt (Fuchs, 2006). Die Kontrolle der Genexpression setzt ein komplexes Netzwerk an Regulationssystemen voraus (Jordan *et al.*, 2008). Das ZKS ist einer dieser prominenten Modelle solcher Regulationssysteme. Experimentelle und strukturbasierte Daten haben gezeigt, dass die AS Arg, Lys, Tyr und Trp bevorzugt mit den Stickstoffbasen der DNA durch Kation- π Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen einen Protein-DNA Komplex bilden (Wintjens *et al.*, 2000; Gromiha *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2014).

2.6 Ziel dieser Arbeit

Das DcuS-DcuR-Regulationssystem beinhaltet die Interaktion zwischen DcuS-DcuR und den Transportern, sowie zwischen DcuR und der DNA. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Sensorhistidinkinase DcuS einen Komplex mit dem Antwortregulator DcuR bildet und ob die Komplexbildung durch die Phosphorylierung von DcuS oder DcuR beeinflusst wird. Dazu wurden Größenbestimmungen verschiedener Komplexe durch SEC-Chromatographie durchgeführt. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Komplexkomponenten wurde die Dissoziationskonstante des Komplexes durch Microscale Thermophorese (MST) bestimmt.

Für die Untersuchungen wurde das lösliche PASC-Kinase-Konstrukt von DcuS verwendet, da das Vollängenprotein nur in Lipidmembranen aktiv und phosphorylierbar ist.

Die Bindung von DcuR (phosphoryliert und nicht-phosphoryliert) an Promotor-DNA wurde durch Elektrophorese (EMSA) und MST bestimmt. Außerdem wurden erste Untersuchungen zur Identifizierung von Aminosäureresten durchgeführt, die an der Interaktion zwischen DcuS und DcuR beteiligt sein könnten.

3. Material und Methoden

3.1 Zucht von *E. coli*

Standard Übernachtkultur

Die Standardzucht von *E. coli* erfolgte aerob über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Medium auf dem Schüttler bei 220 rpm (Excella E24, New Brunswick Scientific). Unter der Berücksichtigung der Stammresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum in der aufgeführten Konzentration dazugegeben (Anhang Tab.: A10). Diese Zuchtform wurde auch für die genetischen Arbeiten verwendet.

Elektrokompetente Zellen (EKZ)

Die Übernachtkultur von XL1-Blue und XL10-Gold wurde standardmäßig gezüchtet. Danach wurde 200 ml LB-Medium mit 1 %-igem Inokulum aus der Standardzucht beimpft und aerob bei 37 °C (Excella E24, New Brunswick Scientific) in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7 (XL1-Blue) bzw. OD_{578nm} von 0,4-0,5 (XL10-Gold) gezüchtet.

β-Galactosidase Aktivität

Sowohl die Vorkultur (VK) als auch die Hauptkultur (HK) wurden in 96-Deep-Well-Platten gezüchtet nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika.

Die VK wurde semi-anaerob in 1 ml eM9-Medium mit DMSO als Elektronenakzeptor und Glycerin als Kohlenstoffquelle über Nacht (16-20 h) bei 37 °C inkubiert. Um den Einfluss des Effektors Fumarat auf die Aktivität zu testen, wurde jeweils ein Ansatz mit Fumarat und ein Ansatz ohne Fumarat angefertigt. Die HK wurde, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, 1 %-ig (mit Fumarat) oder 5 %-ig (ohne Fumarat) inokuliert. Die Zucht der HK erfolgte ebenfalls in eM9-Medium, mit den oben genannten Zusätzen. Der HK wurde im Anaerobentopf für 15 min der Sauerstoff entzogen. Nach Stickstoffbegasung (1,2 atm; Reinheit 99,999 %; Westfallengas) wurde die HK für 18-22 h bei 37 °C inkubiert.

Überexpression

Als Vorkultur (VK) wurde 50 ml LB-Medium plus Antibiotikum in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen gegeben und mit einzelnen Kolonien angeimpft. Diese VK-Zucht erfolgte aerob bei 30 °C mit Schütteln bei 500 rpm. Darauf folgend wurde die HK mit 2 %-4 % (v/v) Inokulum in 400 ml LB-Medium plus Antibiotikum und 100 mM Glucose beimpft und bei

30 °C im Schüttler bis zu einer OD_{578nm} von 0,5-0,7 inkubiert (90 min). Die Induktion des Plasmides erfolgte mit 1 mM IPTG. Nach 4,5 h und einer OD_{578nm} von 1,2 - 2 wurden die Zellen auf Eis geerntet. Zur Überprüfung der Überproduktion wurden jeweils vor und nach Zugabe von IPTG 500 µl Proben entnommen.

Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System

Für die Untersuchung der Protein-Protein Interaktion mit dem BACTH-System (Abschnitt 3.3.8) wurden die Plasmide in *E. coli* BTH101 kotransformiert und auf LB-Platten mit IPTG und Antibiotika ausplattiert und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Flüssige Vor und Hauptkulturen wurden aerob, in 48-Well-Platten versetzt mit 600 µl LB-Medium und Antibiotikum, bei 30 °C und 1000 rpm (Tritramax 1000, Heidolph Schwabach) gezüchtet. Die Hauptkultur (HK) wurde mit 2 - 4 % Inokulum beimpft, mit 0,5 mM IPTG induziert und bis zu einer OD₅₇₈=0,3-0,6 bei 30 °C gezüchtet und die Kultur wurde für die β-Galaktosidase Test (Abschnitt 3.3.1) eingesetzt.

In vivo Fluoreszenzmikroskopie

Die Plasmide verwendet für die Ko-Lokalisation Studien (Abschnitt 3.4.5) wurden in *E. coli* transformiert oder/ und Ko-Transformiert und auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika selektiert. Vorkulturen wurden aerob in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hauptkultur, 25 ml LB-Medium mit Antibiotikum, wurde mit 2 % Inokulum aus der Vorkultur beimpft und bei 30 °C bis einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 inkubiert. In diesem Absorptionsrahmen wurde die Hauptkultur mit 133 µM L-Arabinose induziert.

Aufnahme in die Stammhaltung

Die Zucht für die Aufnahme in der Stammhaltung erfolgte durch das Animpfen von 5 ml LB-Medium, ergänzt mit den entsprechenden Antibiotika, über Nacht bei 37 °C und 220 rpm. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert und anschließend wurde das Pellet in 1 ml LB-Medium aufgenommen und resuspendiert. Dazu wurde 1 ml 50 %-iges Glycerin beigefügt, gemischt und in zwei Stammhaltungsgefäße je 1ml aufgeteilt. Diese wurden dauerhaft bei -80 °C gelagert.

3.1.1 Stämme, Plasmide und Primer

Die verwendeten Stämme, Plasmide und Primer sind im Anhang Abschnitt 7.1-7.3 aufgelistet.

3.1.2 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Die Puffer, Lösungen und Chemikalien sind im Anhang Abschnitt 7.4 und 7.5 aufgelistet.

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Standardmethoden und gerichtete Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Restriktion und Ligation von DNA-Fragmente erfolgte nach Sambrook und Russel (2001). Genomische DNA wurde mit dem Nucleospin C+T Kit (Marcherey & Nagel) nach Vorgaben isoliert und vorbereitet. Plasmide wurden mit dem GenElute™ HP Plasmid Miniprep-Kit (Sigma-Aldrich) isoliert. Die Reinigung und Aufkonzentrierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem GenElute™ PCRClean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen erfolgte in UV-Mikroküvetten (Brand) mit dem BioPhotometer (Eppendorf).

Die Transformation vom PCR-Produkten, Ligationen, Plasmiden und Co-Transformation von mehreren Plasmiden mit unterschiedlichen Resistenzen und Replikationsursprüngen erfolgte durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988).

Die Hauptkultur zur Herstellung von elektokompetenten Zellen ((EKZ) (Farinha *et al.*, 1988)) wurde aus aerob gezüchteter Standardübernachtskultur beimpft bis zu einer OD_{570nm} von 0,5 - 0,7. Die Ernte der Zellen erfolgte auf Eis, um weiteres Wachstum zu verhindern. Die Zellen wurden mehrfach mit gekühlter Glycerin-MOPS-Lösung (abweichend mit: 5 % (w/v) Glycerin und 1 mM MOPS) gewaschen und abschließend in Glycerin-MOPS-Lösung aufgenommen, aliquotiert und bei - 80 °C aufbewahrt.

DNA-Fragmente wurde mittel PCR vervielfältigt unter der Verwendung von *Pfu*- (Physon; Stratagen) oder *Taq*-Polymerase. Die PCR-Protokolle (Tab. 1) wurden in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase, dem Schmelzpunkt der Primer sowie der erwarteten Produktlänge modifiziert.

Tab.1: PCR-Protokoll und Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für einen PCR-Ansatz mit unterschiedlichen Polymerasen. Das Protokoll ist je nach erwarteter Amplifikatlänge angepasst.

Schritt		Komponenten	Tag	Phy
Initiale Denaturierung	98 °C / 3 min	PCR-Puffer	5 µl Taq-Puffer	5 µl Phy-Puffer
Denaturierung	98 °C / 30 sec	dNTP Mix (10 mM)	je 250 µM	je 250 µM
Annealing	T _m -54 °C-60 °C/ 15 sec	Template DNA	100 ng	50-200 ng
Elongation	72 °C / 30 sek	DMSO	3%	-
Finale Elongation	72 °C / 10 min	MgCl ₂	1,5 mM	
PCR-Zyklen (Schritte 2-4) 30x		Primer (10 µM)	je 0,5 µM	je 0,5 µM
		Polymerase	1 U	1 U
		dest. H ₂ O	ad bis 50 µl	ad bis 50 µl

Gerichtete Mutagenese wurde nach den Vorgaben des „QuickChange Site-Directed Mutagenesis“-Kits (Stratagene). Die DNA-Templates für die Mutagenese sind im Anhang Abschnitt 7.3 aufgeführt. Die Punktmutationen wurden mittels synthetisch hergestellter Primer (Tab. A7) induziert. Die Primer wurden mit Hilfe der Programme „Clone Manager“ und „Oligocalc“ entwickelt und von der Firma Eurofins Genomics oder Sigma Aldrich synthetisiert. Die Punktmutation-enthaltenden Primer wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al*, 1986) in das jeweilige Amplifikat eingebaut. Die PCR-Reaktion wurde in den Thermocyclern „iCycler“ (Bio-Rad) oder „MyCycler“ (Bio-Rad) durchgeführt. Je nach Größe des Plasmides und Schmelzpunktes der verwendeten Primer wurde die PCR-Reaktion angepasst. Die Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für einen PCR-Ansatz von 50 µl sind in Tab.2 aufgeführt.

Nach der PCR-Reaktion wurde mittels Gelelektrophorese das Amplifikat in seiner Größe bestätigt. Die Entfernung der parentalen DNA erfolgte mittels *DpnI*-Endonuklease-Verdau (Fermentas). Alle hergestellten Plasmide wurden durch Sequenzierung (Firma LGC Genomics (Berlin) oder Firma Genterprise (Mainz)) in ihrer Sequenz bestätigt.

Tab. 2: PCR- Reaktion und PCR-Ansatz für Mutagenese. Die Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für einen PCR-Ansatz von 50 µl sind hier aufgeführt. Die Dauer der Elongation berechnet sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (30 Sek pro 1 kb). Das Annealing wurde bei 5 °C unterhalb des T_m -Wertes der Primer durchgeführt.

Schritt		PCR-Ansatz für 50 µl		
1. Initiation	98 °C / 1 Min	PCR-Puffer	10 µl	HF-Puffer (5x)
2. Denaturierung	98 °C / 15 Sek	dNTP Mix (10 mM)	250 µM	
3. Annealing	$T_m - 5$ °C / 30 Sek	Template DNA	1 µl	(50-200 ng)
4. Elongation	72 °C / 30 Sek pro kb	Primer (10 µM)	Je 2,5 µl	(0,5 µM)
5. Elongation	72 °C / 10 Min	<i>Pfu</i> -Polymerase	1 U	
PCR-Zyklen	(Schritte 2-4) 25x	dest. H ₂ O	add bis 50 µl	

3.2.2 Konstruktion von Plasmiden

Für die Klonierung wurde das Insert (Gen von Interesse) entweder von den getragenden Plasmiden oder aus genomischer DNA amplifiziert und mit dem PCR Purification Kit (Abschnitt 3.2.1) gereinigt. Insert-DNA und Vektor-DNA wurden durch die gleichen Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific) geschnitten, wobei die Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) nach dem Verdau, dephosphoryliert wurde. Die Ligation der Vektor-DNA mit der Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase bei 16 °C über Nacht. Die Ligationsansätze wurden direkt für die Transformation in EKZ verwendet. Die Konstrukte wurden nach der Erstellung durch Kontrollverdau und Sequenzierung bestätigt.

DcuR-Strep Konstrukt:

Die Klonierung für DcuR mit C-terminalen Strep-Tag (pMW2529) erfolgte mit dem Primerpaar „DcuR_(*EcoRI*)_for“ und „DcuR_(*HindIII*)_rev“. Dazu wurde aus dem Plasmid pMW266 *dcuR* amplifiziert und in den Strep-Tag tragenden Plasmid pASK-IBA3⁺ über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* ligiert (Abb.: 3 A).

DcuR-T18 Konstrukt:

Das Plasmid DcuR-T18 (pMW2863) wurde für die BACTH-Versuche verwendet. DcuR aus pMW266 wurde mit dem Primer „Pst1_dcuR_for plus *EcoRI*_dcuR_rev“ amplifiziert, mit *PstI* und *EcoRI* restringiert und in pUT18 (C-Terminal liegendes T18-Fragment) ligiert (Abb.: 3 B).

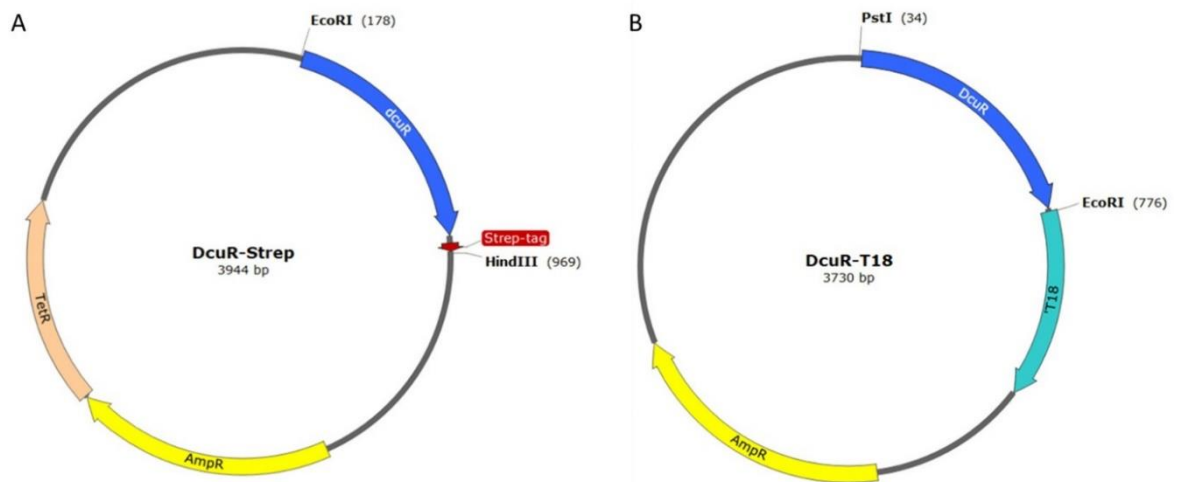


Abb. 3: Expressionsplasmide für DcuR. A: Das Plasmid pMW2529 codiert für DcuR mit C-terminalen Strep-Tag. Dieses Konstrukt wurde für die Überexpression und Aufreinigung über den Strep-Tag verwendet, um anschließend die Transphosphorylierungs- und Dephosphorylierungsversuche durchzuführen. **B:** Das Plasmid pMW2863 codiert für DcuR mit C-terminal liegenden T18-Fragment der Adenylatzyklase und wurde für die BACTH-Studien verwendet.

DcuB-Promotor-Bereich (*dcuBp*):

Für die Interaktionsstudien zur Protein-Bindung an der DNA (Protein-DNA Interaktionsstudien) (MST 3.4.2 und EMSA 3.4.4) mussten vorbereitend große Mengen intergener *dcuR-dcuB*-DNA isoliert werden. Dazu wurden drei DNA-Fragmente konstruiert, die sich in ihrer Länge unterschieden. Alle drei Konstrukte trugen die *dcuB*-Promotorregion, an welche DcuR bindet (Abschnitt 4.3.1, Abb. 23 A). Die DNA-Fragmente wurden aus genomischer DNA des *E. coli* Stamms W3100 amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in pBlueskriptK⁻ ligiert (Abb.: 4 A-C).

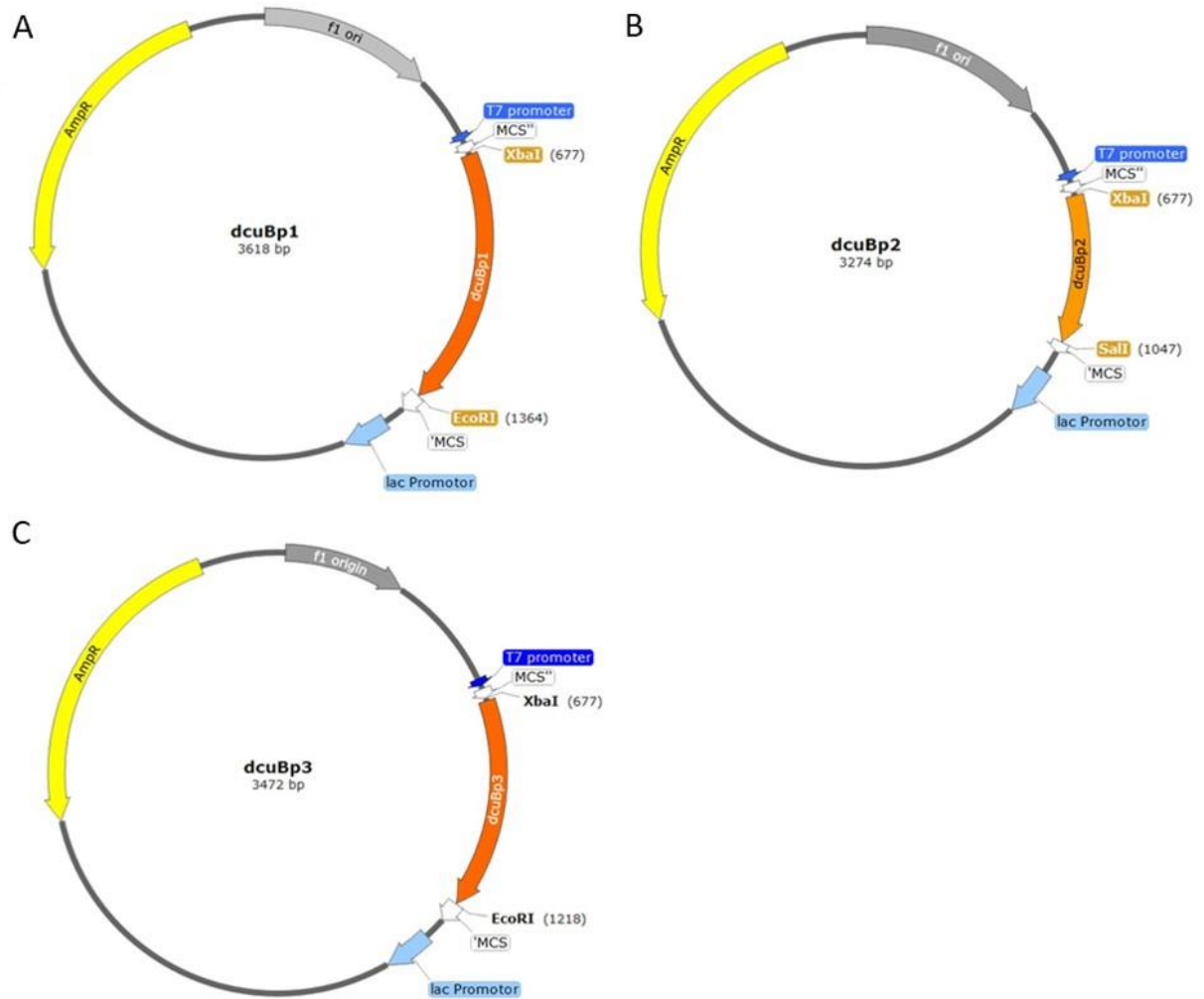


Abb. 4: Plasmide für die DNA-Protein-Interaktion. Die drei intergenen DNA-Fragmente wurden aus genomischer DNA des *E. coli* Stamms W3100 mit den Primern (Anhang 7.3) amplifiziert und entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurden die Inserts in pBluescriptK' ligiert. Es wurden drei Plasmide konstruiert; pMW2926 (trägt das *dcuBp1* Insert mit der Größe von 689 bp), pMW2927 (trägt das *dcuBp2* Insert mit der Größe von 367 bp) und pMW2928 (trägt das *dcuBp3* Insert mit der Größe von 535 bp)

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Zur quantitativen Ermittlung der β -Galaktosidaseaktivität wurde zuerst die Zelldichte der Hauptkultur (HK) bei einer OD_{570nm} bestimmt werden. Dazu wurden 250 μ l HK pro Well in Mikrotiterplatten überführt und mit dem Plattenphotometer (BioTek, EL808-Fotometer) gemessen. Daraufhin wurden aus den Mikrotiterplatten 200 μ l der HK entnommen, in Deep-Well-Platten gegeben und mit 800 μ l β -Galaktosidase-Reaktionspuffer versetzt. In dem Reaktionspuffer wurde als Reduktionsmittel 5-8 mM DTT zugesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren. Vor Testbeginn wurden 150 μ l der aufgeschlossenen Zellen in je vier Mikrotiter-Wells aliquotiert und bei 30 °C für 10 Min äquilibriert. Die *o*-Nitrophenol-Reaktion wurde mit der Zugabe von ONPG gestartet und nach 20 Min mit Natriumcarbonat gestoppt. Falls β -Galaktosidase gebildet wurde, so hydrolysierte dieses das chromogene Substrat ONPG zu dem Monosaccharid Galaktose und dem gelben Farbstoff *o*-Nitrophenol. Die Extinktion von *o*-Nitrophenol konnte dann bei 415 nm gemessen werden. Aus der optische Dichte (OD), der Extinktion (E_{415}), dem eingesetzten Kulturvolumen (V) und der Reaktionszeit (t) wurde die β -Galaktosidaseaktivität mit folgenden Formel in Miller-Units (MU) berechnet (Miller, 1992; Green & Sambrook, 2012).

$$\beta\text{-Galaktosidaseaktivität [MU]} = (\Delta E_{415nm} \cdot 1000) / (\Delta OD_{570nm} \cdot t [\text{Min}] \cdot V [\text{ml}])$$

ΔE_{415nm} = Extinktion bei 415 nm

ΔOD_{570nm} = optische Dichte bei 570 nm

t = Zeit

V = Volumen

Die Varianz der β -Galaktosidaseaktivität für einen Stamm ergibt sich aus dem Mittelwert der drei unabhängigen Transformationsansätze. Die Varianz innerhalb eines Ansatzes ergibt sich wiederum aus der Mittelung der vier Zuchten pro Kolonie.

3.3.2 Überproduktion zytosolischer und transmembraner Proteine

Die Plasmide von DcuR (pMW266, pMW267, pMW1953) sowie das verkürzte PASC-Kinase Konstrukt (pMW2600) wurden in den BL21DE3-Proteinüberproduktionsstamm exprimiert. Volllänge-DcuS (pMW151) wurde in den transmembran-überexpressionstoleranten Stamm C43 (DE3) transformiert (Miroux & Walker 1996). Die Plasmide tragen einen N- oder C-terminalen His₆-Tag oder einen Strep-Tag (Abschnitt 3.3.2).

Die Zuchtbedingungen wurden bereits im Abschnitt 3.1 beschrieben. Die Zellernte erfolgte auf Eis. Jede Zucht wurde in 400 ml Zentrifugenbecher überführt und 20 Min mit 4500 rpm bei 4 °C abzentrifugiert (Beckmann Avanti J-E, Rotor JA-10). Das Pellet wurde in 25 ml Puffer 1 aufgenommen, resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach dem Waschen wurde das Pelletgewicht bestimmt und entweder bei -80 °C über Nacht gelagert oder weiter für den Zellaufschluss verwendet. Das Zellpellet wurde mit 22 ml Puffer 2 versetzt, resuspendiert und dreimal durch Benutzung einer French Press bei einem Druck von 1200 Psi aufgeschlossen. Nach dem Abtrennen der Zelltrümmer per Zentrifugation (FiberLite F21B Rotor, 8000 rpm für 25 Min bei 4 °C) wurde der Überstand im Falle der zytosolischen Proteine direkt für die His₆-Tag- oder Strep-Affinitätschromatographie weiterverwendet.

Um das Transmembranprotein His₆-DcuS zu isolieren wurde der Überstand, welches das Gesamtprotein enthält, nach der French Press in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und bei 45.000 rpm für 65 Min bei 4 °C (Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38) abzentrifugiert. Das Pellet (die Membranfraktion) wurde mit Puffer 2 (15 Min bei 45.000 rpm und 4 °C) gewaschen und im Potter S (Braun, Melsungen) homogenisiert. Zur Solubilisierung wurde 2 % N,N-Dimethyl-N-dodecylglycin-beta (Empigen BB, 30 % in H₂O, Fluka) zu der Membranfraktion gegeben und 30-45 Min auf Eis gerührt. Zur Abtrennung nicht-solubilisierter Membranfragmente erfolgte ein finaler Zentrifugationsschritt (55 Min bei 50.000 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde für die His₆-tag Affinitätschromatographie weiterverwendet (Janausch *et al.*, 2002)

3.3.3 Affinitätschromatographie

Dieser Methode dient der Reinigung biochemischer Moleküle. Die Reinigung erfolgte primär über die N- oder C-terminal liegenden His₆-Tags mittels Ni²⁺-NTA- Chromatographiesäule

(Merck) gemäß Herstellerprotokoll. Abweichend davon wurde Volllänge-DcuS mittels Chromatographie wie folgt aufgereinigt: Zuerst wurde eine Ni²⁺-NTA-Säule mit 20 ml Puffer 2 äquilibriert. Die Probe wurde auf die Säule aufgetragen, geschüttelt und in ein 100 ml Becherglas überführt. Das Becherglas wurde mit Alufolie, um den Luftaustausch zu minimieren, verschlossen und bei 4 °C für 2 Stunden unter ständigem Rühren inkubiert. Das Gemisch aus Ni²⁺-NTA-Agarose und daran gebundenes His₆-DcuS wurde erneut auf die Säule zurück überführt. Die Proteinlösung wurde dann insgesamt zweimal durch die Säule laufen gelassen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Die Agarose wurde viermal mit je 5 ml Puffer 3 gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das gebundene Protein wurde mit 3 ml Puffer 4 eluiert. Alternativ erfolgte die Reinigung der Strep-Tag-tragenden Proteine mittels Strp Tactin®-Chromatographiesäule (Merck) gemäß dem Herstellerprotokoll.

3.3.4 Dialyse

Imidazol wird für die Elution der His₆-Tag-Proteine von der Ni²⁺-NTA-Säule verwendet. Das aromatische Amin setzt die Grenzflächenspannung und stört die Rekonstitution in Liposomen. Um das Detergenz Imidazol zu entfernen wurde die eluierte Proteinfraction dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche aus regenerierter Cellulose (ZelluTrans, Roth) mit einem „Molecular Weight Cut-Off“ von 8-10 kDA dem Herstellerprotokoll folgend vorbereitet und in 1 mM EDTA bei 4 °C gelagert. Vor der Anwendung wurden die Schläuche mit 100 ml dest. H₂O gespült. An einem Ende des Schlauches wurden zwei Knoten gemacht. Unterhalb/oberhalb der Knoten wurde der Schlauch mit einer Klammer verschlossen. Der Schlauch wurde dann mit der Probe befüllt. Das Probenvolumen wurde mit einem zweiten Knotenpaar und einer weiteren Klammer eingeschlossen. Die verschlossenen Schläuche wurden in die Dialyselösung gehängt, wobei die Probe vollständig untergetaucht wurde. Das Volumen der Dialyselösung (Puffer 5, ohne Imidazol) betrug das 100-fache Volumen des Probenvolumens. Es wurde zunächst bei 4 °C, unter Rühren, für 2 Stunden und anschließend mit frischer Lösung über Nacht dialysiert.

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Standardmethode der Photometrie und die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Zuerst wurde eine Kalibrationsgrade mit Hilfe von bekannten Konzentrationen des Standard-Proteins BSA erstellt. Wenn der saure Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Fisher Scientific, Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit) an das BSA-Protein bindet, erfolgt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Anhand der daraus erstellten Regressionsgerade, deren Steigung und dem Schnittpunkt mit der Ordinate, wurde die Konzentration der Proteinlösung errechnet.

Das Volumen der Proben betrug 3-20 μ l, welches jeweils mit Puffer 5 auf 20 μ l aufgefüllt wurde. Zu den 20 μ l wurden in 96-Deep-Well-Platten 780 μ l dest. H₂O und 200 μ l RotiQuant zugegeben. Der Ansatz wurde vermischt, für 10 Min bei RT inkubiert und anschließend in Mikrotiterplatten je 250 μ l überführt. Die Absorptionsmessung am Plattenphotometer (BioTek, EL808-Photometer) erfolgte bei 595 nm.

3.3.6 Rekonstitution von His₆-DcuS und Substitutionen

Um His₆-DcuS in Liposomen zu rekonstituiert, wurden zuerst aus dem Phospholipidgemisch von *E. coli* (Polar Lipid Extract, 20 mg/ml in Chloroform gelöst, Avanti Polar Lipids, USA) Liposomen hergestellt. Die Phospholipide von *E. coli* (200 mg) wurden im Rotationsverdampfer (474 mbar, 60 °C) getrocknet und in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) aufgenommen. Um die Lipide von dem Verdampferkolben zu lösen, wurde das Detergenz N-Octyl- β -D-Glucopyranosid (Gebro) darauf gegeben und 15 Min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Detergenz mittels Dialyse (s. Abschnitt 3.3.4) entfernt. Als Dialyselösung diente 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5). Die erste Dialyse wurde für 2 h durchgeführt. Ein zweiter Dialyseschritt wurde über Nacht durchgeführt, ein dritter für 2 h. Die Liposomensuspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei RT aufgetaut (Krämer, 2008). Aufbewahrt wurden die Liposomen bei - 80 °C.

Nach Rigaud *et al.* kann das effektive Detergenz zu Lipid-Verhältnis berechnet werden, bei welchem die Detergenzsättigung eintritt und die meisten Phospholipide in der Liposomensuspension destabilisiert vorliegen (Rigaud *et al.*, 1995). Bei der His₆-DcuS

Rekonstitution betrug dieses 2,5. Die totale Detergenzkonzentration errechnet sich nachfolgender Formel (Patrenostre *et al.*, 1988):

$$D_T = D_M + R_{\text{eff}} [\text{Lipid}]$$

D_T = totale Detergenzkonzentration ($\epsilon D_T = D_{\text{Wasser}} + R_{\text{eff}} [\text{Lipid}]$)

D_M = Konzentration des monomeren Detergenz in der wässrigen Phase (180 M Triton X-100)

$R_{\text{eff}} = 2,5$ (molares Verhältnis Detergenz zu Lipid ($R_{\text{eff}} = (D_T - D_{\text{Wasser}})/[\text{Lipid}]$)

$[\text{Lipid}]$ = Lipidkonzentration (21 mM)

Als Detergenz wurde Triton X-100 (Gemisch aus p-t-Octylphenyl-polyoxyethylene) zu den Liposomen gegeben, dreimal auf- und abpipettiert und auf dem Taumelschüttler 3 Min bei RT inkubiert. Zu dem Liposomen-Detergenz-Gemisch wurde die Proteinlösung, mit einem Lipid zu Protein-Verhältnis von 20 : 1, gegeben und für weitere 15 Min bei RT auf dem Taumelschüttler inkubiert (Krämer, 2008).

Zur Entfernung von Triton X-100 wurden „Bio-BeadsSM„ (Bio-Rad) verwendet. Diese wurden in 100 % Methanol gewaschen und in 50 mM Tris/HCl (pH 7,7) mit 10 % Glycerin aufgenommen. Anschließend wurde der Sauerstoff für 45 Min entzogen und 15 Sek mit Stickstoff begast. Pro 1 mg Triton X-100 wurden 5 mg Bio-Beads zugegeben (Janausch, 2001). Die Zugabe an Bio-Beads erfolgte bei 4 °C für zwei Stunden, dann wurden erneut die gleiche Menge an Bio-Beads dazugegeben und über Nacht bei leichtem Schütteln unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde erneut die gleiche Menge an Bio-Beads gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Die Bio-Beads wurden anschließend mit einer Pipette entfernt.

Um nicht-rekonstituiertes DcuS von den Proteoliposomen zu trennen wurden die Proben in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben, auf 22 ml mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,7) plus 10 % Glycerin aufgefüllt und für 60 Min bei 4 °C abzentrifugiert (Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38). Es folgte ein Waschschrift mit gleichem Puffer für 25 Min bei 4 °C. Das Pellet wurde in 250-500 µl 50 mM Tris/HCl (pH 7,7) plus 10 % Glycerin aufgenommen und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Die Konzentration an Proteoliposomen wurde nach Bradford bestimmt (Abschnitt 3.5.5). Aufbewahrt wurden die Proteoliposomen bei - 80 °C.

3.3.7 SDS-PAGE und Semi-Dry-Western-Blotting

SDS-PAGE

Der Nachweis von überexprimiertem His₆-DcuS, His₆-PASC-Kinase und DcuR-His₆, sowie der in Proteolioposomen Volllänge-DcuS, erfolgte nach der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Methode. Dabei werden Proteine nach ihrer molekularen Größe unter denaturierenden Bedingungen getrennt.

Dazu wurde ein 12,5 % -iges SDS-Gel verwendet. Die Komponenten des Trenn- und Sammelgels wurden getrennt angesetzt (Abschnitt 7.4.2). Nachdem Glasplatten in dem Fixierständer angebracht wurden, wurde zuerst das Trenngel dazwischen pipettiert und mit 50 µl Isopropanol bedeckt. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel wurde zwischen die Glasplatten gegeben. Es wurde ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen eingesetzt.

Die Proben wurden mit 2x Ladepuffer 1 : 1 gemischt und bei 95 °C für 5 Min im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) inkubiert. Die durch SDS denaturierten und maskierten Proteine wurden dann mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für 55 Min in 1 x SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die SDS-Gele mit dest. H₂O gewaschen und mit Färbelösung über Nacht auf dem Taumelschüttler gefärbt.

Semi-Dry-Western-Blotting

Für die Proben wurde, wie oben beschrieben, eine SDS-PAGE durchgeführt, jedoch wurden die Proben nicht mit der Färbelösung behandelt, sondern direkt auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman, GE Healthcare) übertragen. Für die Übertragung des Proteins aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran wurden zwei Lagen Chromatographiepapier und Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt und auf der Anode platziert. Darauf wurde das SDS-Gel gelegt und von zwei weiteren, zuvor in Transferpuffer getränkten, Chromatographiepapieren bedeckt. Die Kathode des Pierce Fast Semi-Dry Blotters (Thermo Scientific) wurde auf das Konstrukt gelegt. Durch eine konstante Stromstärke von 1,6 mA / cm² Membranfläche für 45 Min wurden die Proben übertragen. Um freie Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran zu sättigen wurde die Membran nach der Proteinübertragung mit 20 ml Blockingpuffer bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Es folgte die Bindung der primären und sekundären Antikörper. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran jeweils für eine Stunde mit den Antikörpern inkubiert und danach dreimal für 5 Min mit Waschpuffer gewaschen. Sichtbar gemacht wurden die Proteine, indem das Immobilon Western HRP Substrat (350 µl; Millipore) mit Peroxidlösung (350 µl) an der „horseradish peroxidase“ des sekundären Antikörpers bindet, wodurch die Probe luminesziert. Die Lumineszenz wurde auf Röntgenfilm mit dem Röntgenfilm-Prozessor SRX-101 A (Konica Minolta) entwickelt.

3.3.8 Das Bacterial Two-Hybrid (BACTH)-System

Das BACTH-System erfolgte nach Karimova (*et al.*, 1998) und basiert auf der Refunktionalisierung der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* im *cya*-negativen Stamm von *E. coli* (BTH101). Die katalytische Domäne der Adenylatzyklase besteht aus zwei komplementären Fragmenten (T18 und T25), die beide zur Bildung eines aktiven Enzyms erforderlich sind. Werden die Fragmente als getrennte Einheiten in *E. coli* exprimiert, können sich diese nicht erkennen, um eine funktionale Adenylatzyklase zu bilden. Wenn die Fragmente mit Proteinen fusioniert wurden, die in der Lage sind, miteinander zu interagieren, führt die Interaktion der Proteine (Heterodimerisierung) zu einer funktionalen Komplementation zwischen den Fragmenten und zur Refunktionalisierung der Zykklase. Somit ist die *in vivo*-Assoziation der interagierenden Proteine an die Produktion des regulatorischen Signalmoleküls cAMP gekoppelt, welches wiederum die Expression des Reportergens (*dcuB-lacZ*) auslöst (Karimova *et al.*, 1998; Karimova *et al.*, 2005). Die Expression der β -Galaktosidase wird deshalb als Maß für die Interaktion der Proteine verwendet.

3.3.9 Phosphorylierung von rekonstituiertem His₆-DcuS, His₆-PASc-Kinase und Substitutionen

Phosphorylierungsversuche mit [γ ³³P]-ATP

Für jeden Phosphorylierungsansatz wurden 6,3 µM an rekonstituiertem (rek.) His₆-DcuS (24 µg) mit Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,7), 20 mM Fumarat, 10 mM

MgCl₂, 1 mM DTT) in einem Endvolumen von 60 µl aufgenommen. Der Ansatz wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Danach wurde die Probe 30-40 Min bei RT inkubiert. Unmittelbar vor dem Reaktionsstart wurden 9,9 µM kaltes ATP zu dem Ansatz gegeben. Die Phosphorylierung von und 12 µM an PASC-Kinase erfolgte in gleichem Puffer, aber ohne den Induktor Fumarat, da dem verkürzten Konstrukt der PASC-Kinase, die Domänen fehlen, welche der Substraterkennung und Signalweiterleitung dienen (PASP, TM1 und TM2). Die Stickstoffbehandlung wurde für PASC-Kinase nicht durchgeführt, da hier keine Rekonstitution benötigt wird.

Die Phosphorylierungsreaktion wurde mit der Zugabe an 0,14 µM [³³P]-ATP (111 TBq/mmol, Hartmann Analytic) gestartet. Nach 45 Min und zu den weiteren angegebenen Zeitpunkten wurden 10 µl oder 20 µl von dem Ansatz (4 µg DcuS) entnommen und zu der Stopp-Lösung (2x SDS-Ladepuffer) gegeben.

Es folgte die Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE für 50 Min bei 200 V. Danach wurden die SDS-Gele auf die Phosphoimagerplatte (FUJIFILM IMAGING BAS-MP 2040) gelegt und für 16-20 Stunden bei 4 °C gelagert. Um eine Kontamination der Imaging-Platte zu verhindern wurde die Platte mit Saran®Wrap luftblasenfrei bedeckt. Nach der Entfernung der Gele von der Imaging-Platte wurden diese mit Coomassie enthaltender Färbelösung gefärbt.

Die Phosphoimagerplatten wurden mit dem Phosphoimager (FLA 7000, FUJIFILM) abgelesen und in ein Autoradiogramm umgerechnet. Die Raten der Phosphorylierung sind dadurch als Schwärzung im Autoradiogramm sichtbar. Die Integrierte Optische Duschte (IOD) wurde mit der Software „Gel-Pro Analyzer™“ 32 (LabWorks Software 4.6 für Windows™), nach Abzug des Hintergrundrauschens, berechnet (Müllner, 2008) oder mit ImageJ 1.52a (National Institute of Health, USA). Das IOD von Volllänge-DcuS wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und in Prozent umgerechnet (100 % = 1127 IOD). Dabei entspricht die intensivste Schwärzung des Volllänge-DcuS, innerhalb eines Versuches, als 100% maximale.

Phosphorylierungsversuche mit ATP

Diese Art der Phosphorylierung wurde für die SEC-, MST-, EMSA- und Prometheus-Versuche verwendet. Hierzu wurde PASC-Kinase für 5-10 Min mit 1 mM ATP in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,7, 10 % Glycerin, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) phosphoryliert.

3.3.10 Phosphorylübertragung von DcuS oder PASC-Kinase auf DcuR

Die Autophosphorylierung mit 0,28 μM [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP wurde mit 4,18 μM kaltes ATP verdünnt (Gesamtes ATP 4,46 μM) und wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben durchgeführt. Das molare Verhältnis von DcuS zu DcuR betrug 1 : 4 (1 = 6,3 μM). Nach 90 Min wurde DcuR zu dem Reaktionsansatz des Volllänge-DcuS gegeben.

Das molekulare Verhältnis PASC-kinase zu DcuR betrug 1 : 1,4 (1 = 12 μM). PASC-Kinase wurde gemeinsam mit DcuR in Phosphorylierungspuffer für 10 Min inkubiert und mit der Zugabe von 4,46 μM ATP (davon 0,28 μM [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP) phosphoryliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μl bis 20 μl aus dem Reaktionsgefäß entnommen und zu der Stopp-Lösung gegeben und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte wie für die Autophosphorylierung (Abschnitt 3.3.9) beschrieben.

3.3.11 Chemische Phosphorylierung von DcuR

Um DcuR chemisch zu phosphorylieren wurden 15 μM DcuR mit Acetyl- oder Carbamoylphosphat in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8), 5 mM MgCl_2 , 10 mM Glycerin) in einem Endvolumen von 30 μl aufgenommen und für 1, 2, oder 24 Stunden bei 4 °C oder 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 μl von den Ansätzen entnommen und in die Stopp-Lösung (2xSDS-Ladepuffer) gegeben.

3.3.12 Phosphat Affinity SDS-PAGE

Chemische Phosphorylierung mittels niedermolekulare Phosphor-Donatoren, wie Carbamoyl-Phosphat (Crb-P; Gemisch aus Carbaminsäure und des Anhydrids des Phosphat-Ions) oder Acetyl-Phosphat (Ac-P; ionisierte Form der Acetylphosphorsäure) spielen bei verschiedenen Stoffwechselwege eine wichtige Rolle. Es sollte zum einem die Spezifität der Bindung von Crb-P oder Ac-P an der Aminosäure Asp-56 von DcuR untersucht werden und zum anderen die Frage beantwortet werden, ob die Dephosphorylierung von DcuR ihm selbst verursacht wird oder durch der Histidinkinase. Die Phosphorylierung konnte über Phosphat Affinity SDS-PAGE mit Mn^{2+} -Phos-tag™ spezifisch nachgewiesen werden. Dabei fungiert das SDS-Gel als molekulares Sieb und zusätzlich bindet der Acrylamide-pendant

Phos-tag™ (Phos-tag™ AAL-107, Wako) die Phosphatgruppe des phosphorylierten Proteins und verändert so das Wanderverhalten des Proteins.

Für diesen Versuch wurden DcuR-His₆ (pMW266) und die Substitution DcuRD56N-His₆ (pMW267) überexprimiert. Über His₆-Tag Affinitätschromatographie wurden die Proteine aufgereinigt (siehe 3.3.3.), und deren Konzentration nach Bradford bestimmt (siehe 3.3.5).

Die Proteine wurden nach der Phosphorylierung mit 50 mM Crb-P oder Ac-P auf 12,5 %igem SDS-PAGE Gel mit Acrylamide-pendant Phos-tag™ (75 µM) und MnCl₂ (150 µM) geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V für 20 Min und weiteren 2 Stunden bei 150 V bei konstanter Spannung und 4 °C. Anschließend wurden die Gele mit Färbelösung inkubiert.

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 Size Exklusion Chromatographie (SEC)

Mittels der Chromatographie können Proteingemische zwischen zwei Phasen in einzelne Proteine aufgetrennt werden. Dies geschieht über den Stoffaustausch zwischen zwei Phasen. Die eine ist stationär und unbeweglich (stark hydratisierten Polymer) und stellt die Matrix dar. Die zweite, mobile Phase strömt an der Matrix vorbei. Die Zugänglichkeit der Poren der Matrix und ihre Größe, sind für die Trennung wesentlich. Die kleinen Proteine in dem Proteingemisch verteilen sich sowohl innerhalb der Matrix, als auch in der mobilen Phase (Abb.:5).

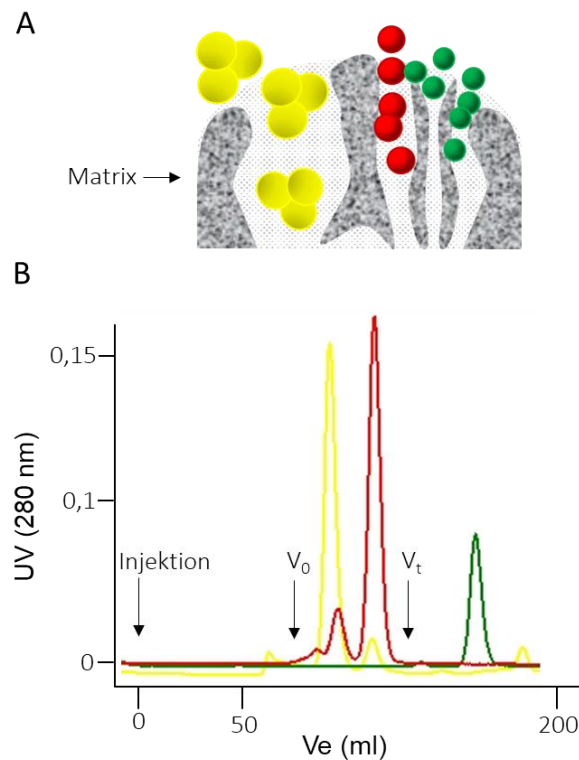


Abb. 5: Schematische Darstellung des Trennungsprinzips und des Elutionprofils der chromatographischen Trennung. (A) Die Komponenten einer Probenmischung werden nach Größenbereichen in Gruppen getrennt. Die Proteine mit niedrigem Molekulargewicht werden in separaten Fraktionen eluiert. (B) Typisches SEC-Laufprofil. Das Elutionsvolumen V_e ist das erforderliche Volumen zur Elution eines Proteins (V_0+V_t).

Dadurch wandern kleine Proteine langsamer durch die Säule und treten später aus der Säule aus (eluiert) als größere. Das Elutionsvolumen V_e ist das benötigte Volumen zur Elution des Proteins. Für globuläre Proteine besteht aufgrund der Beziehung zwischen den STOKES-

Radius und der Molmasse des Teilchens, direkte Korrelation zwischen experimentell bestimmten V_e und der Molmasse der Proteine (Winter & Noll, 1998).

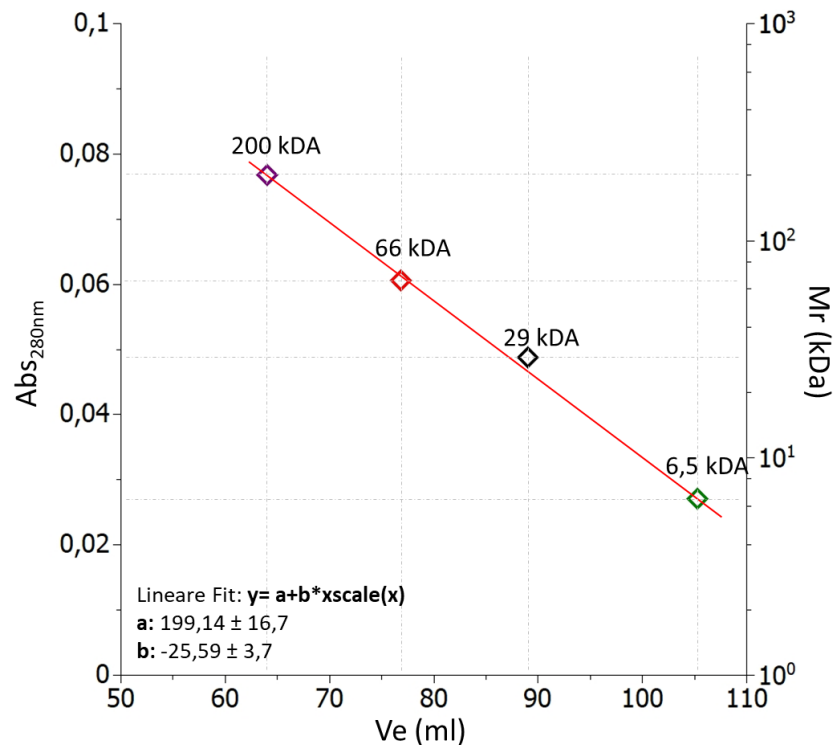


Abb. 6: Korrelation des Elutionsvolumen für die Standard-Proteine auf HiLoad 16/600 Sephadex 200 mit dem Logarithmus der Molmasse der Eichproteine. Das Elutionsvolumen V_e ist das benötigte Volumen zur Elution des Proteins. Für globuläre Proteine besteht aufgrund der Beziehung zwischen dem STOKES-Radius und der Molmasse des Teilchens eine direkte Korrelation zwischen dem experimentell bestimmten V_e und der Molmasse der Proteine. Mit der Hilfe folgender Eichproteine (β -Amylase MW 200 kDa, BSA MW 66 kDa, Carbonic-Amylase MW 29 kDa und Aprotinin 6,5 kDa) wurde mittels lineare Fit $y = A + B \cdot xscale(X)$ ($A = 199 \pm 16$ und $B = -25 \pm 4$ scale= 10^x) die relative Molmasse (M_r) der Proben bestimmt werden

Zur Kalibrierung wurden die folgenden Proteine verwendet: β -Amylase, MW 200 kDa; BSA, MW 66 kDa; Carbonic-Amylase, MW 29 kDa und Aprotinin, MW 6,5 kDa (GE28-4038-42, Merck). Mittels linearer Regression (Anpassung $y = A + B \cdot xscale(X)$ ($A = 199 \pm 16$ und $B = -25 \pm 4$) wurde die relative Molmasse (M_r) der Proben bestimmt (Abb.: 6).

Die Versuche wurden auf Superdex 75 10/300 (Maximaler Druck 420 psi; Säulenvolumen 24 ml; Trennungsgrenze von globuläre Proteinen: $MW = 10^3$ - 10^4 kDa) oder HiLoad 16/600 Sephadex 200 (Maximaler Druck 82 psi; Säulenvolumen 120 ml; Trennungsgrenze von globuläre Proteinen: $MW = 10^3$ - 10^6 kDa) durchgeführt. Es wurden 0,5 ml oder 1 ml Injektionsvolumen, um die Proben zu beladen verwendet. Die

Massenkonzentration der Proteine betrug je nach Versuchsanordnung 1,5-2,5 mg/ml. Die Phosphorylierung von PASC-Kinase erfolgte wie beschrieben (Abschnitt 3.3.9) Es wurden 1 ml oder 2 ml Fraktionen gesammelt und davon 20 µl mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt und in SDS-PAGE aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden ImageJ unterzogen. Die Proteinbanden wurden mittels Druckprofil und anschließender Integration der Fläche analysiert (Hintergrund-Intensität wurde automatisch subtrahiert). Die Gesamtsumme der berechneten Peakfläche (Integrationsergebnisse) entspricht der Gesamtmenge des eluierten Proteins (100 % Konzentration [µM] PASC-Kinase oder DcuR). Das Molverhältnis wurde durch Division des Ergebnisses durch die Molmasse ermittelt.

3.4.2 Microscale Thermophorese (MST)

Theoretischer Hintergrund

Die Aufklärung der Mechanismen, welche bei intermolekularen Wechselwirkungen oder bei der Bildung von Proteinkomplexen beteiligt sind, erfordert oft tiefere Kenntnis der Thermodynamik und Energetik der jeweiligen Interaktionspartner. Mit Hilfe der Microscale Thermophorese können unterschiedliche Parameter der Bindung zwischen zwei oder mehreren Interaktionspartnern quantifiziert werden. Die Methode wird meist verwendet für die Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d . Der Begriff „Thermophorese“ bezieht sich auf die Bewegung von Molekülen im mikroskopischen Temperaturgradienten (T_g). Dabei verursacht der mikroskopische T_g (in Lösung) sowohl Wärmefluss als auch Massenfluss der Substanzen, welcher in der Flüssigkeit gelöst sind. Die Bewegung der Moleküle wird phänomenologisch mit linearer Driftreaktion beschrieben (Ludwig-Soret-Effekt) (Duhr & Braun, 2006; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014). Dabei steht die Geschwindigkeit (v) der gelösten Moleküle in Abhängigkeit vom erzeugten Temperaturgradient (T_g) durch die Proportionalitätskonstante (D_{T_g}) in linearer Beziehung: $v = -D_{T_g} \cdot T_g$. Im Gleichgewicht wird die lineare Drift durch Massendiffusion ausgeglichen. Die Massendiffusion hängt dann von der Molekül-Lösungs-Grenzfläche, der Molekülgröße und der Ladung ab.

In einem typischen MST-Experiment wird einer der Interaktionspartner kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Eine Lösung dieser Moleküle wird in ein transparentes

Kapillarröhrchen beladen und ein Bereich des Röhrchens wird mit einem Infrarot (IR)-Laser bestrahlt. Durch die Bestrahlung wird ein mikroskopischer Tg erzeugt. Aufgrund der Thermophorese bewegen sich die Moleküle dann entlang des Gradienten. Ihre Nettobewegung kann mit einem Fluoreszenzmikroskop, das auf den IR-beleuchteten Bereich fokussiert ist, als Funktion der Zeit beobachtet werden. Dabei werden zwei Effekte erzeugt, die durch ihre Zeitskala getrennt werden. Ein Temperatursprung (T-Sprung), dessen Relaxationszeit rund 50 ms beträgt, sowie die thermophoretische Bewegung der Moleküle mit einer langsameren Diffusionszeitskala (rund 10-30 s). In den meisten Fällen ist die Thermophorese positiv, was bedeutet, dass eine Nettobewegung der Moleküle von der heißeren zur kühleren Stelle der Kapillaren erfolgt. Dies manifestiert sich als Abnahme der beobachteten Fluoreszenz (Jelesarov et al., 199; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014; Salentin *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2015).

Schematische Darstellung des Messprinzips der MST

Bei der Microscale Thermophorese wird polarisiertes Licht einer spezifischen Wellenlänge durch eine Fluoreszenzlichtquelle (Licht emittierende Diode(LED)) in die Probe eingestrahlt (s. Abb 7). In den Fluoreszenzlichtweg ist ein Heißspiegel (*infrarotes* Licht (IR)-Spiegel) eingebaut mit welchem der Heiz IR-Laser in den Fluoreszenzlichtweg gebündelt wird. Dadurch wird der Weg des Fluoreszenzlichts und des IR-Lasers mit dem gleichen Objektiv fokussiert, welches auch für die Fluoreszenzdetektion verwendet wird. Dies ermöglicht die Beobachtung der Thermophorese in dünnen Glaskapillaren. Fluoreszenzmarkierte Moleküle oder Partikel sind zunächst gleichmäßig verteilt und diffundieren frei in Lösung. Wird die Probe, durch das Einschalten des IR-Lasers, punktuell erhitzt unterliegen die Moleküle einer thermophoretischen Kraft im Temperaturgradienten (NT.115 Manual).

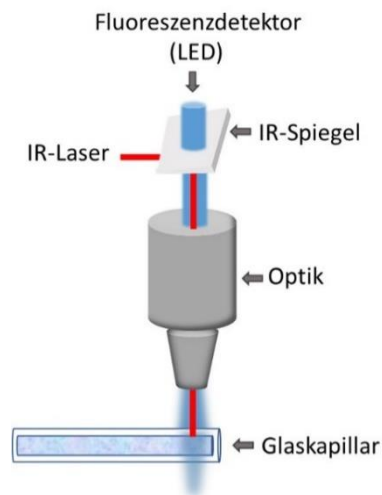


Abb. 7: Schematischer Aufbau eines MST-Systems. Fluoreszenzlichtquelle und Fluoreszenzdetektor sind hinter dem IR-Laser (*Hot-Spot*-Quelle) und dem IR-Spiegel angeordnet. Sowohl die IR-Laser als auch das LED wird gebündelt und mit dem gleichen Objektiv fokussiert, das auch für die Fluoreszenzdetektion verwendet wird.

Versuchsanordnung

Fluoreszenz-markiert wurden DcuR (eYfp-Linker-DcuR) und der Promotor *dcuBp* (Cy5-*dcuBp*). Die Konzentration des fluoreszent-markierten Moleküls wurde konstant gehalten (200 nM oder 300 nM für Cy5-*dcuBp* und 50-100 nM für eYfp-Linker-DcuR) (Kretschy *et al.*, 2016). Es wurde darauf geachtet, bei Fluoreszenzintensitäten zu messen, die deutlich über dem Hintergrund des Signals liegen. Es wurde eine 200 µl Stammlösung des fluoreszent-markierten Moleküls in der doppelten Konzentration in MST-Puffer vorbereitet. Dieser wurde bis zum Gebrauch auf Eis und lichtgeschützt aufbewahrt. Es wurden 16 Mikro-Reaktionsröhrchen (100 µl PCR-Reaktionsgefäße) mit einer Verdünnungsreihe des Bindungspartners vorbereitet. Nach Zugabe des fluoreszent markierten Partners zu der Verdünnungsreihe wurden die Proben dunkel für 30-60 Min inkubiert und vor dem Beladen in einer NanoTemper Standard-behandelten Kapillare (NanoTemper-Technologien K002) für 3 Min bei 10.000 × g abzentrifugiert. Die Anregung der Kapillare über den IR-Laser erfolgte mit 10 %, 20 % oder 40 % der Leistung. Für die Anregung und die Detektion des Signals wurde 50 % bis 70 % der LED-Range (blau oder rot) verwendet. Mit der "IR-Laser On Time" kann die Zeit definiert werden, während der das MST-Signal beobachtet wurde. In allen Versuchen wurde der "IR-Laser On Time" für 30 Sek. definiert und "IR-Laser Off Time" für 5 Sek. Die Versuche wurden mit einem Monolith NT.115 [NT.115Pico] Instrument

(NanoTemper Technologies) bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C gemessen. Alle anderen Schritte wurden nach den MST Starting Guide (Monolith NT.115) und dem User Manual durchgeführt. Für die Kurvenanpassung wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet und der Kd-Fit (Integriert in dem MO.Affinity Analysis Software).

Um die richtige Konzentration an Fluoreszenz-markiertem Protein zu bestimmen, welcher sich unter dem Sättigungswert des Detektors befinden soll (Maximalwert betragende Fluoreszenz= 2500 Counts) wurde ein Kapillarscan durchgeführt (Abb.: 8 A). Die Fluoreszenz der Proben steigt oder sinkt mit zunehmender Konzentration des Bindungspartners und durch die Interaktion der Moleküle. Zusätzlich wurde die Kapillarform der Proben vor und nach der Durchführung der Thermophorese durchgeführt, um experimentelle Artefakte zu erkennen, die durch Proteinadsorption an der Glaskapillare oder durch Proteinaggregate verursacht werden zu erkennen (Abb.: 8 B) (User Manual Monolith NT.115). Diese macht sich anhand von gezackter oder unregelmäßiger Form erkennbar.

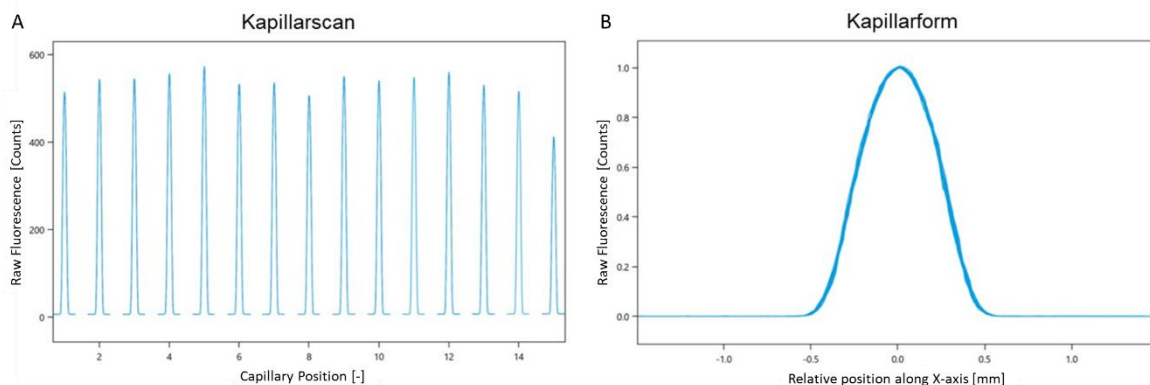


Abb. 8: MTS Qualitätscheck und Kapillarscan von 15 Kapillare. Die Kapillare mit der höchsten Konzentration an eYfp-Linker-DcuR hat Position 1. Beide Tests werden vor jedem Experiment durchgeführt, (A) um die spezifische und korrekte Konzentration an Fluoreszenz-markiertem Stoff zu bestimmen und (B) ob vor und nach dem Versuch Proteinadsorption an der Glaskapillare oder Proteinaggregate aufgetreten sind. Alle 15 Kapillarformen wurden übereinandergelegt.

Das vom MST-Gerät erhaltene Signal widerspiegelt mehrere aufeinanderfolgende Prozesse, die durch ihre Zeitskala und die IR-Laser-Wärmequelle getrennt zu betrachten sind (Abb.: 9). Die Ereignisse werden definiert als „Initiale Fluoreszenz“ (Fluoreszenz der Probe bei Umgebungstemperatur vor der Erwärmung mit dem IR-Laser (α)), „T-Jump“ (Temperatursprung; Fluoreszenzänderung, die durch die Probenerwärmung induziert wird, bevor der thermophoretische Molekültransport einsetzt (TJ)), „Thermophorese“ (Fluoreszenzänderung, die durch thermophoretische Bewegung induziert wird (T)) und

„Rückdiffusion“ (Fluoreszenzerholung, die durch reine Massendiffusion nach Abschalten des Lasers ausgelöst wird (β)) (Baaske *et al.*, 2010; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2015). Damit enthält jede einzelne Phase der thermophoretischen Analyse Informationen über die Affinität und den Mechanismus des Bindungsereignisses.

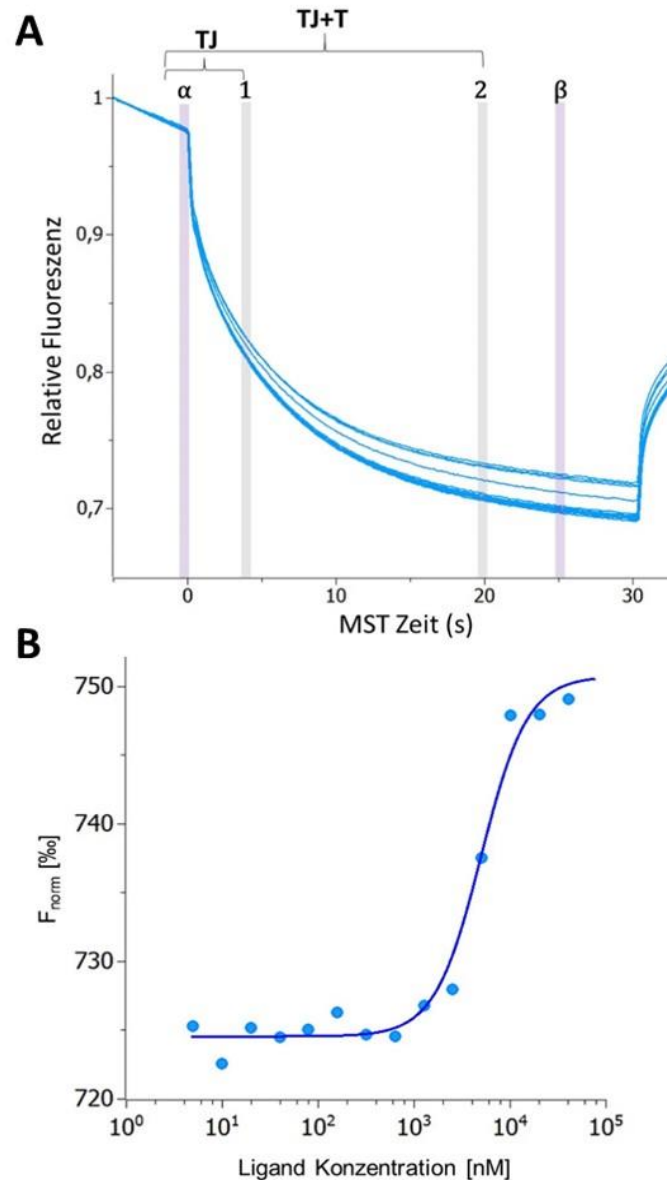


Abb. 9: Beispiel wie ein MST-Signals aussieht. Dargestellt sind MST-Daten und die Bindungskurve für die Wechselwirkung von yfp-Linker-DcuR mit *cy5-dcuBp*. **(A)** Das normierte MST-Fluoreszenzsignal zeigt den typischen Verlauf mit aufeinander folgenden Prozessen, bedingt durch das punktuelle Erhitzen der Proben. Die α -Zone (lila) repräsentiert die Initiale Fluoreszenz, die Zeitspanne kurz bevor der IR-Laser angeschaltet wird. Auf dieser folgt der Bereich zwischen der α -Zone und der ersten grauen Zone und ist durch den Temperatursprung (TJ), dessen Relaxationszeit schnell ist (≈ 50 ms) gekennzeichnet. Der Bereich 5 Sek - 20 Sek (ersten und zweiten Grauen-Zone) nach der Aktivierung des IR-Laser stellt die thermophoretische Bewegung der Moleküle (T) auf der langsameren Diffusionszeitskala (≈ 5 -30 Sek) dar. **(B)** Die unterschiedlichen Zonen wurde zur Berechnung der normalisierten Fluoreszenz (F_n oder F_{norm}) verwendet, welcher die Menge an Thermophorese widerspiegelt ($F_n = (F_h/F_a)$). In diesem Versuch wurde TJ+T als Modalität der Auswertung gewählt. F_a ist die anfangs Fluoreszenz bevor IR-Aktivität und F_h die Fluoreszenz nach der Aktivierung des IR-Laser. In das MST-Signal ist die Bindung von *cy5-dcuBp* an eYfp-Linker-DcuR durch eine Quantifizierung der Änderung der normalisierten Fluoreszenz (d.h. der Amplitude des MST-Signals) detektiert. Durch die Bezeichnung x des Anteils an markierten Molekülen (eYfp-Linker-DcuR), die an ihre Targets gebunden sind, wird die Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Konzentration des Targets durch: $F_n = (1-x)F_{a, norm} + xF_{h, norm}$ gegeben.

3.4.3 Thermische Entfaltung mit Prometheus NT.48

Theoretischer Hintergrund

Proteine, die physiologisch und biochemisch aktiv sind, werden meistens durch einen nativen (gefalteten) Zustand mit einer definierten Konformation und dreidimensionaler Struktur assoziiert. Dagegen wird der denaturierte (ungefaltete) Zustand mit einem Verlust dieser biochemischen Aktivität verknüpft. Diese beiden Zustände unterscheiden sich hinsichtlich der Enthalpie und Entropie stark voneinander und die thermodynamische Stabilität wird durch die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Zuständen beschrieben (Plum *et al.*, 1990; Bullock *et al.*, 1997; Keranisanoou *et al.*, 2006; Kastritis *et al.*, 2013). Die Bindung von Liganden an Proteine sowie die unterschiedlichen Protein-Protein Interaktionen zeigen unterschiedlichen Einflüssen auf die Funktion und Stabilität der interagierenden Partner und der damit verbundenen dreidimensionalen Struktur.

Mit nanoDSF (miniaturized differential scanning fluorimetry) kann über die thermische Entfaltung eines Proteins, Entfaltungprofile erzeugt werden, welcher Rückschlüsse über die Stabilität des Proteins und den möglichen Einfluss von Liganden an diesem Prozess, gezogen werden können. Dabei sind Schmelzpunkte (melting point (T_m)) und Wendepunkte (Inflection Point (IP)) wichtige Parameter zur Beurteilung der Proteinstabilität. Der T_m ist der Punkt, an dem 50 % des Proteins (oder der Domäne) entfaltet vorliegen und beschreibt einen reversiblen Denaturierungsprozess eines Experiments im Gleichgewicht. Dieser Parameter wird über einen mathematischen Fit aus Messdaten abgeleitet. Der IP wird direkt aus den Messdaten berechnet und mathematisch gesehen ist dieser ein Punkt an welchem die Kurve ihre Tangente kreuzt. Beide Begriffe werden austauschbar verwendet und die erhaltene Werte sind sehr ähnlich, sogar identisch in manchen Fällen (PR. Thermal stability). Das Prometheus NT.48-Gerät (NanoTemper) ermöglicht die Erzeugung von thermischen Profilen durch Messung der Veränderungen in der intrinsischen Fluoreszenz von Aminosäuren (AS). Die Seitenketten der AS Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr) enthalten aromatische Gruppen und sind natürliche Fluorophore. Die Spektrenformen dieser AS ist von der Umgebung abhängig. Trp-Fluoreszenz wird bei 280 nm angeregt und die Emission von Trp erfolgt bei 330 nm (in nicht-polarer Umgebung) und bei 350 nm (in polarer Umgebung) (Ghisaidoobe *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2020). Während der kontinuierlichen Temperaturerhöhung (2 °C/Min), werden die hydrophoben Oberflächen der

Polypeptidkette (Trp und Tyr) der wässrigen Umgebung ausgesetzt. Die Moleküle des Wassers bilden ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, was deren Entropie und Enthalpie vermindert (Plum *et al.*, 1990; Royer, 2006; Brader *et al.*, 2015). Dies verursacht eine Verschiebung der Fluoreszenzemission insbesondere von Trp, die als Verhältnis zwischen 350 nm und 330 nm in einem Diagramm aufgetragen werden.

Versuchsordnung

Die 40 µl der Gipfelfractionen, welcher bei der Size Exklusion Chromatographie gesammelt wurden, wurde bei der nanoDSF weiterverwendet. Vor der Beladung in den Kapillaren wurden die Proben bei 10.000 × g für 5 Min abzentrifugiert. 20 µl der Proben verwendet für MST Untersuchung wurden auch für die nanoDSF-Profilierung verwendet. Fluoreszenzbasierte thermische Entfaltungsexperimente wurden mit dem Prometheus NT.48-Gerät durchgeführt. Standard-Kapillaren (10 µl) wurden in das Prometheus-Gerät eingeführt, die Temperatur wurde pro Minute um 2 °C von 20 °C auf 90 °C erhöht. Die Fluoreszenz wurde bei Emissionswellenlängen von 330 nm und 350 nm gemessen.

3.4.4 DNA-Bindungsstudien (EMSA)

Der elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA) basiert auf Unterschieden in der Mobilität zwischen freier, nicht gebundener DNA und dem stabilen Protein-DNA-Komplex. Dieser Mobilitätsunterschied äußert sich als Gel-Shift und wird mit dem SYBR Green (Invitrogen) EMSA-Farbstoff (dieser Färbt die DNA) nachgewiesen. (Jing *et al.*, 2003). Für die Bindung von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem DcuR an den Promotorbereich von *dcuB* (p1,p2,p3) wurden 5 µg DcuR (6 µM) mit 2,5 nM *dcuBp* in BP-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 5,5 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mg/ml salmon sperm DNA) für 30 Min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde zu den Ansätzen nativer DNA-Auftragspuffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerin) gegeben und dieses wurde in nicht-denaturierenden 5 %-igem Polyacrylamidgel in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgetrennt (Sambrook und Russell, 2001). Das DNA-Gel wurde mit SYBR-Green in 20 ml TBE-Puffer 1 : 1000 verdünnt und für 20 Min gefärbt. Die Protein-DNA-Banden wurden unter UV-Licht detektiert. Die Gele wurden mit ImageJ analysiert und als 100%

wurde der relative Gehalt freien Promotors von *dcuBp* gesetzt (aufgetragen wurden 2,5 nM).

3.4.5 Ko-Lokalisation-Ermittlung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen wie in 3.1 beschrieben gezüchtet. Der Flüssigkultur wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und abzentrifugiert. Anschließend wurde die Zucht zweimal mit jeweils 1 ml PBS-Puffer gewaschen und zuletzt in 500 µl PBS-Puffer resuspendiert. Für die Mikroskopie wurden Objektträger, mit 1 %-iger Agarose in PBS-Puffer, nach Skinner (*et al*, 2013) beschichtet. Als Mikroskop wurde das Leica DMI8 mit HC PL APO 100 x/1.40 OIL Objektiv und Kamera Leica-DFC9000GT-VSC09483 verwendet. Zur Auswertung der Mikroskopiebilder wurde das Programm LAS X von Leica benutzt.

3.5 Bioinformatische Methoden

Datenbanken & Recherche

- EcoCyc: <http://www.ecocyc.org> (Keseler *et al.*, 2017)
- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- Uniprot: <http://www.uniprot.org>
- NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Sequenzvergleich/Alignment

- UGENE: <http://ugene.net/>
- BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- ClustalOmega: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

3D-Struktur Darstellung und Bearbeitung

- Chimera v1.9: <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (Pettersen *et al.*, 2004)
- I-TASSER: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Yang *et al.*, 2015a)
(Yang *et al.*, 2015b)
(Zhang 2008)
(Roy *et al.*, 2010)
- InterPro: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>

Sonstige Programme

- NEBuilder: <https://nebuilder.neb.com/#!/>
- Clone Manager: <http://www.scied.com/index.htm>
- FinchTV: <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>
- Oligo Calc: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
- LAS X v3.6.0: <https://webshare.leica-microsystems.com/latest/core/>
- QtiPlot: <https://www.qtiplot.com/>
- ImageJ: <https://imagej.nih.gov/ij/>

4. Ergebnisse

4.1 Komplexbildung zwischen DcuS (PASC-Kinase) und DcuR sowie die Rolle der Phosphorylierung

Transporter, Zweikomponenten-Systeme und die DNA zeigen oft komplexe physikalische Interaktionen, deren biophysikalischen und biochemischen Grundlagen und Zusammenhänge noch nicht gänzlich verstanden sind. Um solch eine Komplexität an Wechselwirkungen zu untersuchen, wird oft die spezifische Interaktion auf die unterschiedlichen Interaktionsebenen reduziert und untersucht, um schließlich die Komplexität dieses Netzwerkes zu einem Gesamtbild zu vereinen. Protein-Protein Interaktionen (PPI) und Protein-DNA Interaktionen (PDI), die leicht gebildet und gebrochen werden, spielen für solche Interaktome eine entscheidende Rolle (Perkins *et al.*, 2010; Goncarenco *et al.*, 2014). Für das DcuSR-Regulon konnte gezeigt werden, dass die Transporter DctA (aerobe Bedingungen) und DcuB (anaerobe Bedingungen) Sensorkomplexe mit der Sensorhistidinkinase (SHK) DcuS bilden (Witan *et al.*, 2012; Scheu *et al.*, 2014). Die Transporter wirken gemeinsam mit DcuS als C₄-DC sensitive Einheit auf der Ebene der Signalwahrnehmung und Weiterleitung (Janausch *et al.*, 2002; Kleefeld *et al.*, 2009; Wörner *et al.*, 2018). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Interaktion innerhalb von Zweikomponenten-Systemen und der Interaktion von Zweikomponenten-Systemen mit der DNA, d.h. der spezifischen Interaktion zwischen a) der SHK und dem AR und b) der DNA. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Interaktion zwischen der SHK und dem AR. Um die Frage nach der Art der Interaktion und der Spezifität zu beantworten, wurde zuerst untersucht, ob die Sensorhistidinkinase DcuS einen Komplex mit dem Antwortregulator DcuR bildet. Dazu wurden unterschiedliche Methoden verwendet.

4.1.1 Chromatographie von PASC-Kinase, DcuR und das DcuS x R Komplex

Die Untersuchung der Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR erfolgte zuerst durch Gelpermeationschromatographie (Abschnitt 3.4.1). Dies ist eine Form der Flüssigkeitschromatographie, mit deren Hilfe Moleküle nach ihrer relativen molekularen Größe getrennt werden. Wird ein stabiler Komplex zwischen zwei Proteinen gebildet, dann

wird ein großer Teil der Proteine gemeinsam durch die Chromatographie-Säule migrieren (ko-migrieren) und eluieren (ko-eluieren). Die Bildung des heterooligomeren Komplexes ist mit Veränderung der Molekülmasse verbunden und dies verändert die Wanderungsgeschwindigkeit und das Wanderungsprofil (Laufprofil) im Vergleich zu den einzelnen Proteinen. Die Korrelation zwischen Laufprofil und der Art der Proteine unter einem Gipfel im Graph wird durch das Auftrennen der Proteine einzelner Eluats-Fractionen mittels SDS-PAGE bestimmt (Abschnitt 3.3.7).

DcuS ist ein transmembranes Protein und als Volllängenprotein nur als SHK aktiv, wenn es in der Membran integriert ist. Aus diesem Grund muss das gereinigte und mit Detergenz solubilisierete DcuS in *E. coli* Liposomen rekonstituiert werden, was seine Verwendung zur Größenbestimmung durch SEC-Chromatographie verhindert (Janausch *et al.*, 2002). Folglich wurde das lösliche PASC-Kinase-Konstrukt für die Untersuchungen verwendet. Dieses Konstrukt hat als Monomer eine relative Molmasse (M_r) von 42 kDa. Es umfasst die Aminosäuren 212-543 und beinhaltet alle zytoplasmatischen Domänen und einen N-terminalen His₆-Tag für die Proteinreinigung (Abschnitt 3.3.3). In Abb. 10 sind die Laufprofile von PASC-Kinase (violett) und von phosphorylierter PASC-Kinase (pink) in einem Plot dargestellt. Unter dem Plot befinden sich die SDS-Gele der Fraktionierung. Das Laufprofil von PASC-Kinase erstreckte sich im Eluat von 70 ml bis 86 ml, der Elutionsgipfel liegt bei Ve 76 ml. Dies entspricht einem Homodimer mit der Masse von M_r 84 kDa. Im Vergleich dazu eluierte phosphoryliertes PASC-Kinase (phosphoryliert wurde mit 1 mM ATP) bei Ve 74 ml. Dies entspricht einem M_r von 100 kDa und die letzte PASC-Kinase enthaltende Fraktion wurde bei 80 ml gesammelt. Der apparente Massenanstieg von PASC-Kinase durch die Phosphorylierung um 16 kDa ist signifikant, was auf Konformationsänderungen oder Ladungseffekte zurückzuführen sein könnte, nicht aber auf die Massenzunahme durch die Phosphatgruppe.

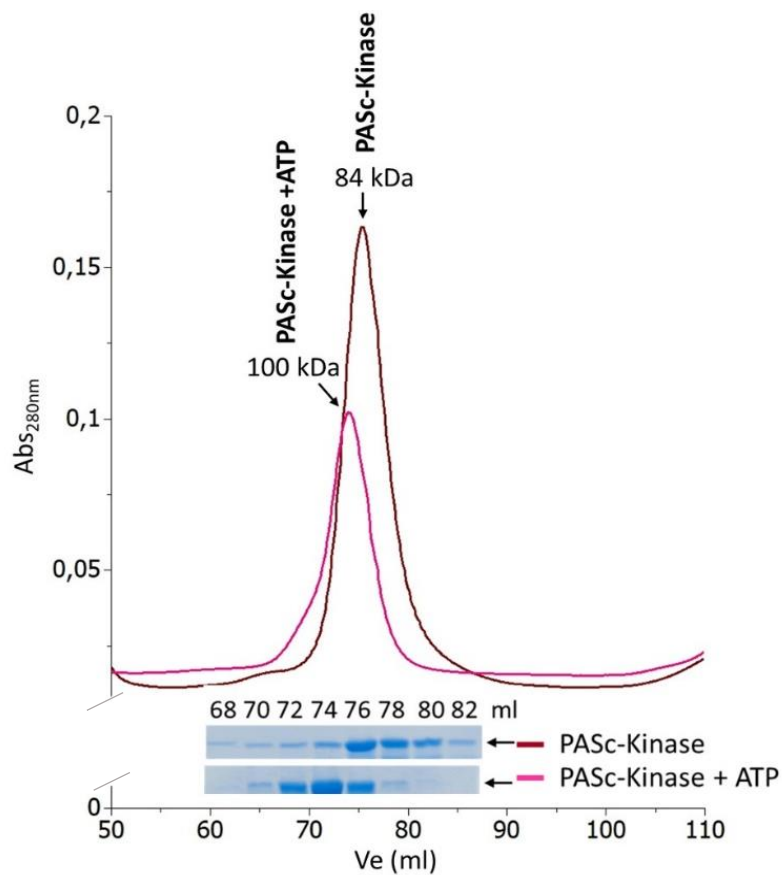


Abb. 10: SEC-Profil von PASC-Kinase und PASC-Kinase + ATP. Die Stoffmenge an injizierter PASC-Kinase betrug 52 nmol. Die Phosphorylierung von PASC-Kinase erfolgte 10 Min mit dem Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,7, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP). Die Gelpermeation wurde in SEC-Puffer durchgeführt. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und 20 µl wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Laufprofile sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten SEC-Versuchen.

Der zytosolische Responsregulator DcuR hat ein Molekulargewicht von 29 kDa. Für die Ermittlung der SEC-Profile von nicht-phosphoryliertem und phosphoryliertem DcuR wurden 69 nmol des Proteins auf die Chromatographiesäule aufgetragen (Abb.: 11). Die Laufprofile zeigten keinen Unterschied für DcuR und phosphoryliertes DcuR. Der Elutionsgipfel liegt bei V_e 90 ml, entsprechend einer Masse von 23,5 kDa (blaue Linie) und monomerem DcuR. Die Elutionsstrecke erstreckte sich von 87 ml bis 97 ml. Dies lässt keine Dimerisierung von DcuR durch Phosphorylierung erkennen. Eine Änderung des Elutionsprofils durch Phosphorylierung von einer app. Molmasse von 29 kDa zu 66 kDa, mit einer Änderung des Elutionsprofils von 9 ml zu 7,5 ml wurde von Abo-Amer *et al.* beschrieben (Abo-Amer *et al.*, 2004).

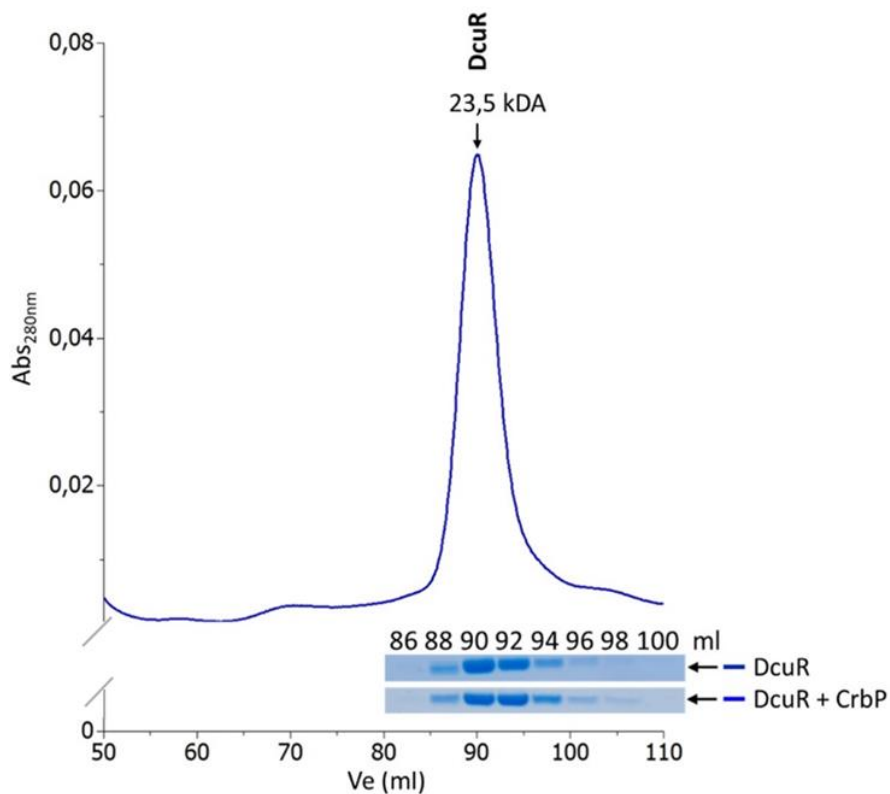


Abb. 11: SEC-Profil von DcuR und DcuR + CrbP. Die Konzentration an injiziertem DcuR betrug 69 nmol. Die Phosphorylierung von DcuR erfolgte mit 50 mM CrbP für 1 h bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH7,7, 1 mM DTT und 5 mM MgCl₂). Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und 20 µl wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Laufprofile sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten SEC-Experimenten.

Abb. 12 zeigt die Ko-Chromatographie von PASC-Kinase mit DcuR. Hierfür wurden die Proteine in einem molaren Verhältnis von 1:2 (mit $1 \pm 42,6 \mu\text{M}$ PASC-Kinase) gemischt und für 10-20 Min bei 25 °C inkubiert. Die Gipfelfraktion für die PASC-Kinase in dem Gemisch

eluierte bei 74 ml \cong 111 kDa und die von DcuR bei 89 ml, entsprechend 24 kDa. Die Elutionsstrecke veränderte sich für beide Proteine. DcuR eluiert gemeinsam mit PASC-Kinase bereits bei 71 ml, wie es in dem SDS-Gel zu sehen ist und erstreckt sich bis 99 ml. Die SDS-Gele spiegeln den SEC-Lauf des Proteingemisches wider. Beide Proteine ko-migrieren und ko-eluieren.

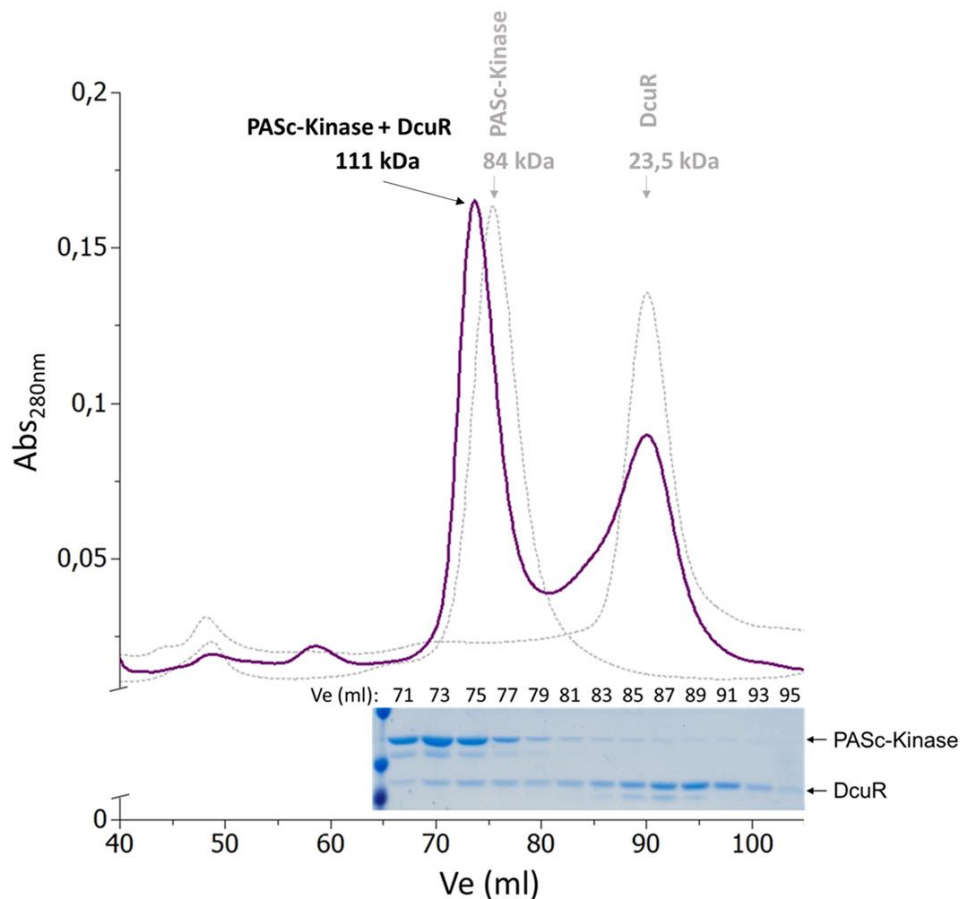


Abb. 12: SEC-Profil von PASC-Kinase mit DcuR. Die Massenkonzentration an injiziertem DcuR und PASC-Kinase betragen mindestens 2-2,5 mg/ml (Stoffmengenanteil 1:2, wobei 1 = 42,64 μ M). Beide Proteine wurden zu den Komplexpuffer (50 mM TrisHCl pH7,7, 1 mM DTT, 50 mM KCl und 5 mM MgCl₂ gegeben und bei 25 °C für 10 Min inkubiert. Die Laufprofile sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängig durchgeführten Gelpermeationsläufen. Die gesammelten Fraktionen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden wurden mit Coomassie Blau gefärbt. Die Intensität der gefärbten Banden wurden für die Berechnung der molaren Verhältnisse der beiden Proteine verwendet.

Dies erklärt den Massenanstieg von 27 kDa für PASC-Kinase und illustriert, dass vermutlich ein DcuR-Monomer an ein PASC-Kinase-Homodimer gebunden vorliegt. Die Auswertung der SDS-Gele ergab einen deutlichen Gehalt an DcuR (0,1 mol DcuR/mol PASC-Kinase), welcher sich unter dem PASC-Kinase-Gipfel befindet. Das sub-stöchiometrische Verhältnis zwischen

der PASC-Kinase und DcuR zeigt, dass der Komplex während der 2-stündigen Chromatographie nicht stabil ist und in die Proteinkomponenten zerfällt.

Die Kommunikation zwischen beiden Proteinen erfolgt durch das Übertragen des Phosphoryl-Restes von der Histidinkinase auf den Responseregulator. Dies legt nahe, dass die Phosphorylierung einen Einfluss auf den Komplex und dessen Stabilität haben kann. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden SEC-Profile von phosphorylierter PASC-Kinase mit DcuR erstellt (Abb.: 13). Dazu wurde PASC-Kinase mit 1 mM ATP phosphoryliert und anschließend mit einem Überschuss an DcuR in einem 1:2 molaren Verhältnis (mit $1 \cong 42,6 \mu\text{M}$ PASC-Kinase) für 15 Min bei 25 °C inkubiert. Der gesamte Anteil an PASC-Kinase eluierte als breite Bande mit einem Gipfel in der Position, die einem Molekulargewicht von $M_r = 133 \text{ kDa}$ entspricht. Die Gipfelfraktion enthielt $0,8 \pm 0,3 \text{ mol DcuR/mol PASC-Kinase}$, wie aus den Gehalten der Proteine in die SDS-Gele ermittelt werden konnte. Überschüssiges DcuR bewegte sich als ein Protein von $M_r 24 \text{ kDa}$ wie in den anderen Experimenten. Die Daten deuten darauf hin, dass PASC-Kinase-P einen 1:1-Komplex mit DcuR bildet, und dass der Komplex mit $M_r = 133 \text{ kDa}$ aus einer homo-dimeren PASC-Kinase-P ($M_r 85 \text{ kDa}$) und ein homo-dimeren DcuR besteht. Der Komplex ist stabil und dissoziiert nicht während der 2-stündigen Fraktionierung.

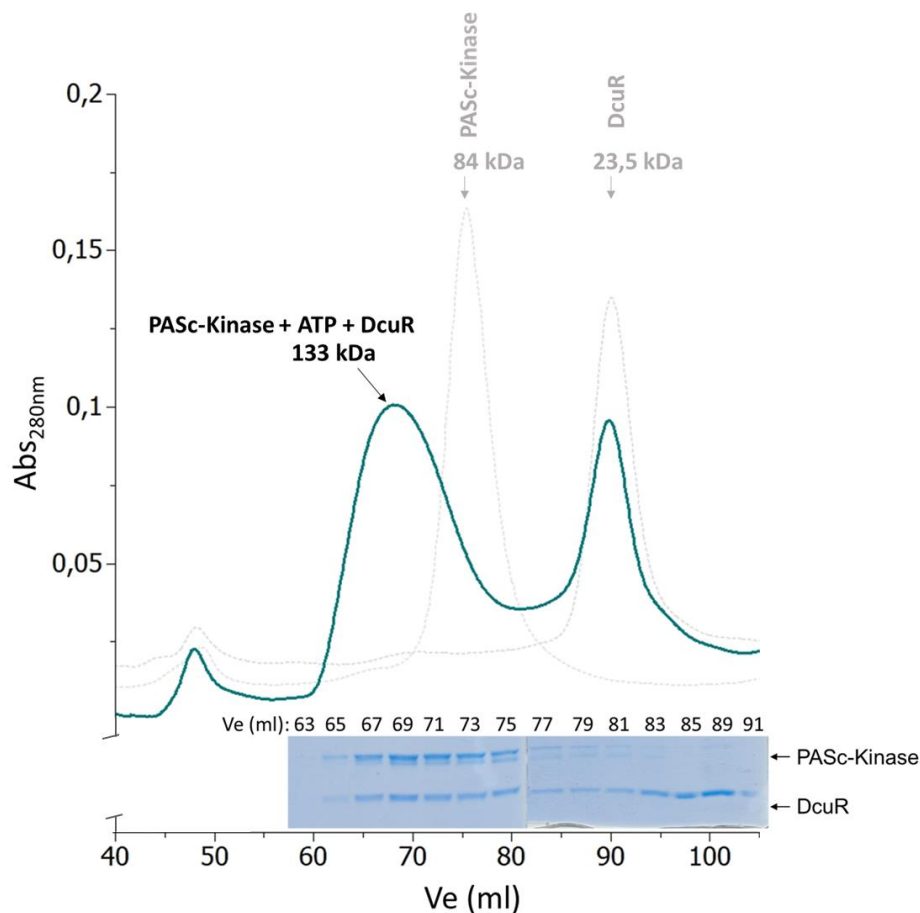


Abb. 13: SEC-Profil des Komplexes von phosphorylierter PASC-Kinase und DcuR. Die Phosphorylierung von PASC-Kinase erfolgte 10 Min mit 1 mM ATP in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,7, 1 mM DTT, 50 mM KCl und 10 mM MgCl₂). Anschließend wurde DcuR dazu gegeben und bei 25 °C für 15 Min inkubiert. Die Massenkonzentration an injiziertem DcuR und PASC-Kinase betragen mindestens 2-2,5 mg/ml (Stoffmengenanteil 1:2). Die Laufprofile sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Läufen. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und per SDS-PAGE aufgetrennt.

Darüber hinaus wurde die Komplexstöchiometrie zwischen phosphorylierter PASC-Kinase und DcuR analysiert (Abb.: 14). Beide Proteine wurden in unterschiedlichen molaren Verhältnissen zueinander gegeben (HK:RR;1:5, 1:10, und 5:1; 1 entspricht einer Konzentration von 22 µM). Wird zu phosphorylierter PASC-Kinase DcuR im Überschuss zugegeben, so verschwindet der individuelle PASC-Kinase Fraktionsgipfel zugunsten eines breiten, dem hetero-tetramer Komplex entsprechenden Gipfels (app. Mr = 133 kDa). Das überschüssige DcuR bewegte sich als ein Protein von Mr = 24 kDa wie in den anderen Experimenten.

Liegt PASC-Kinase phosphoryliert in fünffachem Überschuss vor, so verschwinden beide individuellen Fraktionsgipfel zugunsten des Gipfels, der dem hetero-tetramer Komplex

entspricht (app. Mr = 133 kDa) und des Gipfels, der dem hetero-trimer Komplex entspricht (Mr = 111 kDa). DcuR eluiert gemeinsam mit PASC-Kinase bereits bei 58 ml und seine Elutionsstrecke ist stark verkürzt. Nach Färbung und Quantifizierung der im SDS-Gel gefärbten Proteinbanden wurde ein konstanter Quotient HK/RR von etwa 1:1 ($0,8 \pm 0,4$ mol DcuR/mol PASC-Kinase) in allen Mischungsverhältnissen in dem Komplex von PASC-Kinase mit DcuR beobachtet.

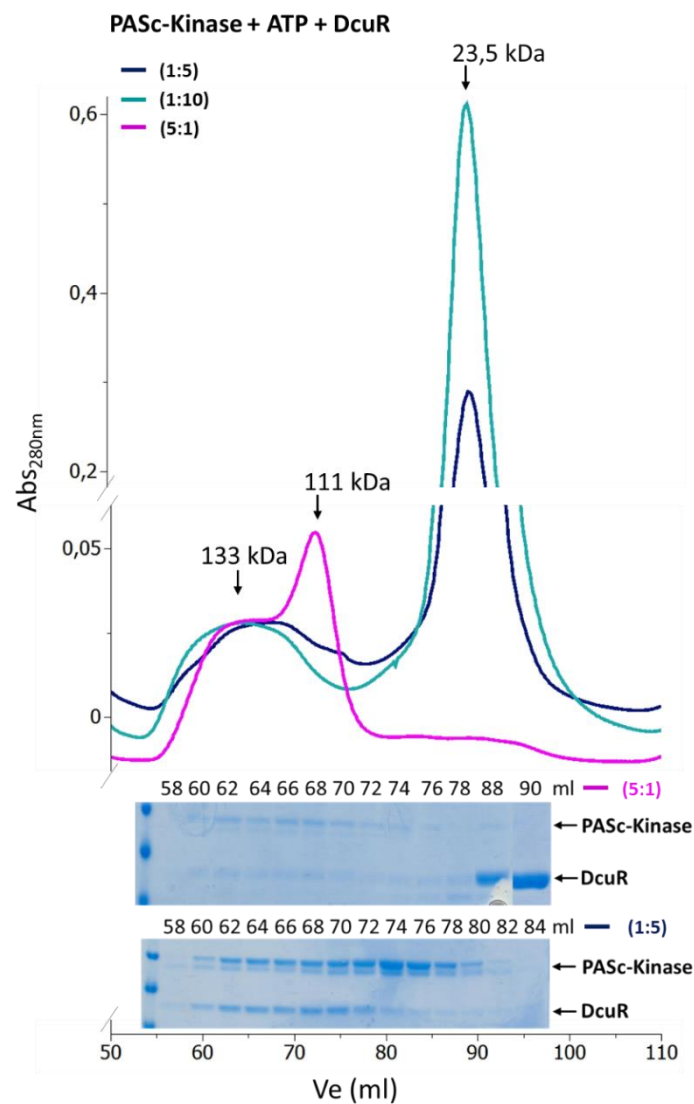


Abb. 14: SEC-Profile variabler Stöchiometrie zwischen phosphorylierter PASC-Kinase und DcuR. Um die elektrophoretische Analyse der Komplexbildung durchzuführen, wurden Proben von PASC-Kinase mit DcuR in einem Komplexpuffer (50 mM TrisHCl pH7,7, 1 mM DTT, 50 mM KCl und 10 mM MgCl₂) in verschiedenen molaren Verhältnissen (HK:RR; 1:5, 1:10, oder 5:1; 1 entspricht einer Konzentration von 22 μM) gemischt und bei 25 °C 10 Min lang inkubiert. Danach wurden die Proben mittel SDS-Page getrennt. Die Banden, die den freien Proteinen in dem Elutionsprofil entsprachen, wurden durch Coomassie-Blau sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Banden erfolgte, wie im Material und Methoden Teil beschrieben.

In einem weiteren Experiment wurde DcuR mit einem Überschuss an CrbP phosphoryliert. Anschließend wurde DcuR-P mit PASC-Kinase in einem Molverhältnis von 1,4 mol DcuR-P/mol PASC-Kinase gemischt und der SEC unterzogen (Abb 15). Das SEC-Profil zeigt, dass die Gipfelfraktion für PASC-Kinase dieses Gemisches bei 74 ml \cong 111 kDa liegt und dass der größte Teil der DcuR mit PASC-Kinase in dieser breiten Bande ko-migriert. Nur geringe Mengen freier, nicht-komplexierter DcuR mit der Mobilität von 24 kDa ist noch vorhanden. Die Korrelation zwischen Laufprofil und Proteingehalt mittels SDS-PAGE konnte nicht durchgeführt werden.

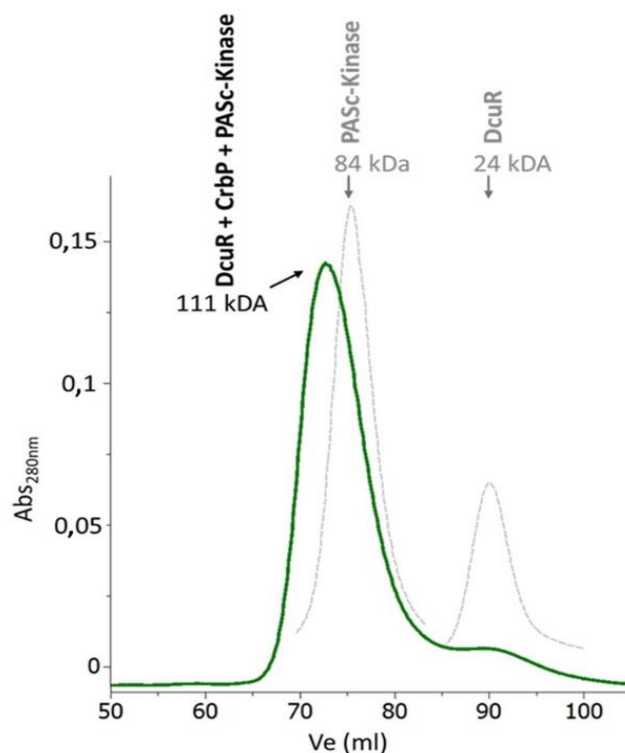


Abb. 15: SEC-Profil von phosphoryliertem DcuR mit PASC-Kinase. Die Phosphorylierung von DcuR erfolgte 1 Stunde mit 50 mM CrbP in Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH7,7, 1 mM DTT, 50 mM KCl und 10 mM MgCl₂). Anschließend wurde PASC-Kinase dazu gegeben und bei 25 °C für 10 Min inkubiert. Die Massenkonzentration an injiziertem DcuR und PASC-Kinase hatte ein Stoffmengenanteil von 1 : 1,4 (1 entspricht 42,6 μ M).

4.1.2 Thermische Stabilität von PASC-Kinase, DcuR und deren Komplexe

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der Proteine und des Effekts der Phosphorylierung und Komplexbildung auf diese Stabilität wurden thermischen Entfaltungsprofile aufgenommen. Dabei wurde in dem nanoDSF (Prometheus NT.48) die Änderung der Trp-Fluoreszenz bei steigender Temperatur fluorimetrisch bestimmt (Abschnitt 3.4.3). Da Tryptophan eine hydrophobe Aminosäure ist, befindet sich diese meist im hydrophoben Kern des Proteins. Proteine befinden sich in thermodynamischem Gleichgewicht zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand (Ghisaidoobe *et al.*, 2014; Weigand *et al.*, 2016;). Die thermische Entfaltung ist energetisch betrachtet ein Zusammenspiel enthalpischer und entropischer Beiträge. Im entfalteten Zustand werden die hydrophoben Oberflächen der Polypeptidkette exponiert und bilden mit Molekülen des Lösungsmittels ein Netzwerk von Wechselwirkungen, was deren Energiezustand und die Trp-Fluoreszenz verändert (Winter & Noll, 1998; Henzler-Wildman & Kern, 2007) . Anhand der erstellten Entfaltungsprofile werden Rückschlüsse über die Stabilität und den möglichen Einfluss von Liganden an diesem Prozess gezogen. Wichtig dabei ist wie viele natürliche fluoreszierenden Aminosäuren ein Protein besitzt, wo sich diese in der Struktur befinden und ob das Proteine aus einer oder mehrere Domänen besteht (Goncarenco *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2020).

DcuS ist ein Multidomänen Protein und besitzt elf Tyr- und fünf Trp-Reste. Zwei der Trp-Reste liegen in TM2, eins in PASC-Domäne und die restlichen zwei in der Kinase-Domäne. Somit enthält PASC-Kin drei Trp-Reste. In Abb. 16 ist die 3D-Strukturvorhersage von PASC-Kinase zu sehen. Das Modell von PASC-Kinase wurde über den Server SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006) auf Grundlage der Struktur der Domäne von CitA_{Gt} von *Geobacillus thermodenitrificans* erstellt. Gemäß des Strukturmodells befinden sich zwei der drei Trp-Reste (Trp468 und Trp536) bereits an der Oberfläche des Proteins. Trp273, liegend in der PASC-Domäne, ist nach innen zum Kern gerichtet. Sechs der elf Tyr-Reste liegen in PASC-Kinase und entsprechend dem Modell sind alle diese Reste oberflächenexponiert. Die Entfaltungsprofile von nicht-phosphorylierter und phosphorylierter PASC-Kinase sind in Abb. 17 zu sehen. Es wurde die intrinsische Fluoreszenz von Tryptophan bei zwei Wellenlängen (330 nm und 350 nm) gemessen und der Inflection Point (IP) wurde aus der ersten Ableitung des Verhältnisses dieser Messwerte ermittelt (PR.ThermalControl Software, Nano Temper).

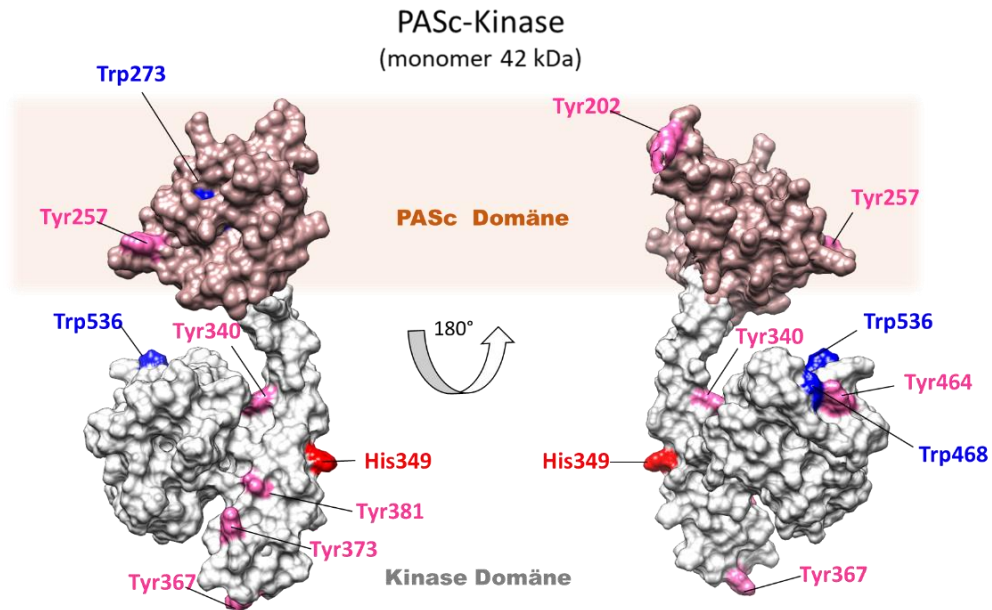


Abb. 16: 3D-Strukturvorhersage von PASc-Kinase basierend auf der Struktur von PASc von CitA_{Gt}. Die Strukturvorhersage erfolgte durch SWISS-MODEL und erstreckte sich über die DcuS Aminosäuren 201-543. Abgebildet sind Trp- (blau) und Tyr- (pink) Reste und deren relative Position im Protein. An dem konservierte His349 (rot) erfolgt die Phosphorylierung.

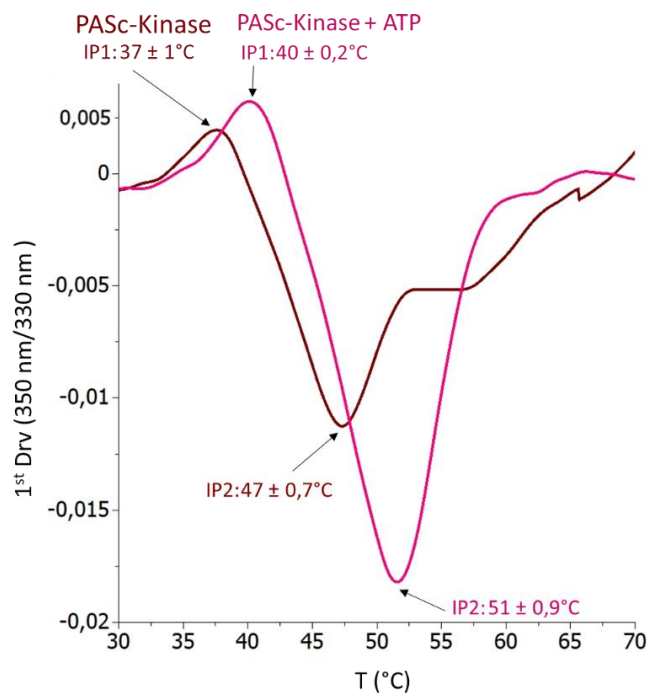


Abb. 17: Entfaltungprofile von PASc-Kinase und PASc-Kinase-P. Die Konzentration an PASc-Kinase betrug 24 μM . Die Phosphorylierung von PASc-Kinase erfolgte über 5 Min mit dem Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH7,7, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂ + 1 mM ATP) und die thermische Entfaltung wurde mit einer Heizrate von 2 °C/min von 20 °C bis 90 °C gemessen. Die Fluoreszenz des thermischen Denaturierungsprofil wird als die erste Ableitung der 350/330 nm Kurve dargestellt. Die beiden DSF-Kurven PASc-Kinase (dunkelrot) und PASc-Kinase-P (pink) weisen zwei Übergänge auf: einer ist Aufwärts, der zweite ist Abwärts. Die Unterschiede in den Übergängen werden durch Δ IP angegeben.

Die Daten wurden mit QutiPlot grafisch dargestellt. Die thermischen Profile zeigen eine umgekehrte sigmoidale Form (S-Shape) mit zwei Wendepunkten.

Der erste Übergang zeichnet sich durch eine geringe Zunahme der Emission bei dem ersten Wendepunkt (IP1) mit einer Differenz von $\Delta IP1 2,5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ zwischen PASC-Kinase und PASC-Kinase-P aus. Der zweite Wendepunkt ist durch Verschiebung nach rechts von $47 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$ (IP2) für die PASC-Kinase auf $51,2 \pm 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (IP2) für die PASC-Kinase-P ausgezeichnet. Durch die Phosphorylierung wird die PASC-Kinase demzufolge stabilisiert; das biphasische Entfaltungsprofil korreliert mit der Anzahl an Domänen.

Es wurden Entfaltungsprofile für DcuR und für phosphoryliertes DcuR erstellt. In Abb. 18 ist die 3D-Strukturvorhersage von DcuR basierend auf der Struktur von SpoF_{Bs} von *Bacillus subtilis* dargestellt. Die Strukturvorhersage erfolgte über den Server SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006). Allgemein besitzt der Antwortregulator drei Trp-Reste und 13 Tyr-Reste. DcuR hat zwei Domänen. Die REC Domäne, welche an der Interaktion mit der Histidinkinase beteiligt ist und in welcher die Kommunikation über die Phosphorylübertragung stattfindet, besitzt einen zum Kern gerichteten Trp-Rest (Trp120) und acht Tyr-Reste. Anschließend liegt die DNA-Bindedomäne mit zwei der Oberfläche zugewandten Trp-Resten (Trp120 und Trp170).

Die Entfaltungsprofile von DcuR zeigen allgemein eine Zunahme in der Fluoreszenz (Abb.: 19). Dennoch ist das Entfaltungsprofil von DcuR deutlich von dem Entfaltungsprofil von DcuR-P zu unterscheiden. DcuR hat nur einen Wendepunkt IP bei $49,3 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Wird DcuR phosphoryliert wird das Emissionssignal biphasisch mit IP1 bei $45 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ und IP2 bei $52 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Dies zeigt, dass DcuR und DcuR-P unter verschiedenen Bedingungen denaturieren. Es wird angenommen, dass die meisten Proteine als Komponenten von Komplexen fungieren, um gezielt ein Netzwerk aus biologischen Einheiten zu bilden, die Prozesse und molekulare Interaktionen ausführen und steuern. Dabei kann jedes Protein an mehreren Komplexen beteiligt sein, von denen jeder eine diskrete Funktion hat (Cusick *et al.*, 2005). Prometheus wurde zur Analyse der Thermochemie der interagierender Proteine PASC-Kinase und DcuR verwendet, unter der Annahme, dass die Bindung und Interaktion zwischen beiden Proteinen in den thermischen Entfaltungsprofilen zu sehen sein werden. Vereinfacht dargestellt, wird aus den Edukten PASC-Kinase (S) und DcuR (R) ein Komplex (SR); dann

werden die Wärmekapazität und Enthalpie jeder Komponente (S und R) und der Komplex zwischen ihnen (SR) zum thermodynamischen System beitragen Formel (1).



Die Beiträge der einzelnen Komponenten S und R, sowie des Komplexes, hängen von den Gleichgewichtskonzentrationen während der Temperaturerhöhung ab.

Mit Prometheus wird nicht direkt die Wärmekapazität oder die Enthalpie gemessen (ITC oder DSC können diese Parameter über einen direkten Weg bestimmen), sondern indirekt. Indirekt, weil während des Erhitzens des Komplexes genau diese Parameter eine wichtige Rolle spielen und diese haben eine direkte Auswirkung auf die Entfaltung und die Umgebung der intrinsisch fluoreszierenden Aminosäuren. Ist der Komplex stabil, dann wird mehr Energie (bzw. Wärme) gebraucht, um die Entfaltung zu induzieren. Wie zuvor beschrieben, sind die meisten Trp Reste von der PASC-Kinase und DcuR an der Oberfläche und somit zum Puffer gerichtet exponiert. Werden diese Reste durch die Interaktion bzw. Komplexbildung umorientiert, so ist eine starke Veränderung des thermischen Profils zu erwarten. Sind durch die Komplexbildung die hydrophoben Reste zum Kern des Komplexes gerichtet, führt dieses zu entropischer Stabilisierung.

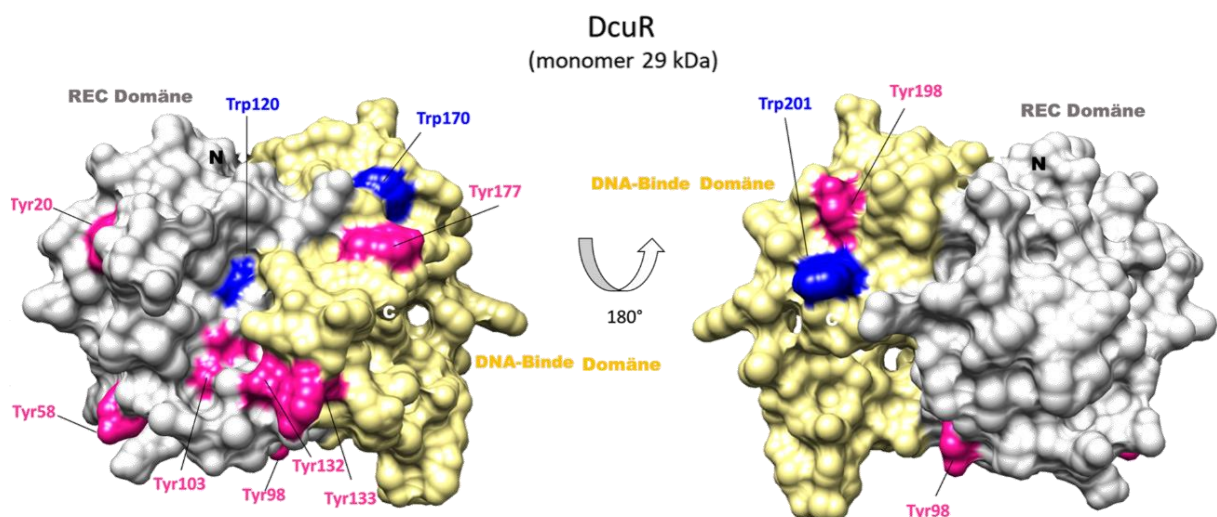


Abb. 18: 3D-Strukturvorhersage von DcuR basierend auf SpofBs. Die Strukturvorhersage erfolgte durch SWISS-MODEL und erstreckte sich über die gesamte Länge von DcuR. Abgebildet sind Trp- (blau) und Tyr- (pink) Reste und deren relative Position im Protein.

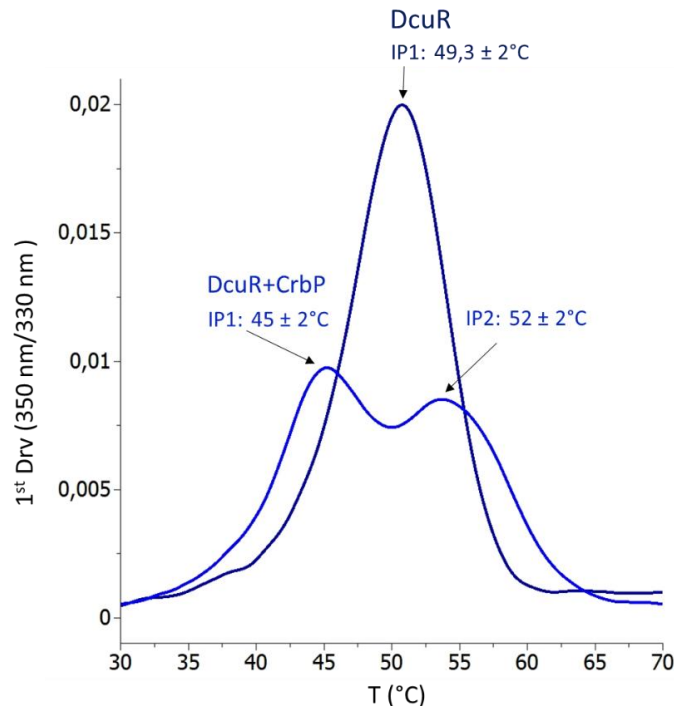


Abb. 19: Entfaltungprofil von DcuR und DcuR-P. Die Stoffmenge an DcuR betrug 30 μ M. Die Phosphorylierung von DcuR erfolgte 1 Stunde mit 50 mM CrbP in dem Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH7,7, 1 mM DTT und 10 mM MgCl₂) und die thermische Entfaltung wurde mit einer Heizrate von 2 °C/min von 20 °C bis 90 °C durchgeführt. Die Fluoreszenz des thermischen Denaturierungsprofil wird als die erste Ableitung der 350/330 nm Kurve dargestellt. Die DSF-Kurve von DcuR (dunkelblau) zeigt einen Phasenübergang wogegen nach Phosphorylierung von DcuR mit CrbP (hellblau) zwei Übergänge zu sehen sind.

Kation- π -Interaktionen sind für die Wechselwirkung über lange Distanzen wichtig. Es ist bekannt, dass Kation- π Interaktionen, zwischen Arg und Tyr die stärkste Interaktion zwischen zwei Proteinen in einem Komplex ausbilden können. Die kationische Gruppe (Arg) ist zusätzlich an intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, und somit ist Arg an multiplen Interaktionen beteiligt und stellt einen Interaktionsmechanismus für die Protein-Proteinspezifität bereit. Kation- π -Interaktionen zwischen Lys-Tyr oder Lys-Trp bevorzugen es, an der Bindung von Protein-DNA-Interaktion beteiligt zu sein und verantworten die Komplexbildung (Gromiha *et al.*, 2004; Crowley *et al.*, 2005). Da die thermische Entfaltung über die intrinsische Fluoreszenz der Trp- und Tyr-Reste detektiert wird, hat eine solche Kation- π -Bindung direkten Einfluss auf das thermische Profil.

In Abb. 20 sind die thermischen Profile des nicht-phosphorylierten Komplexes (A) und des phosphorylierten Komplexes (B), gegenüber den einzelnen Proteinen dargestellt. Die Entfaltung des Komplexes ist durch drei Wendepunkte IPs gekennzeichnet. Die erste Transition macht sich durch eine Abnahme in der Fluoreszenz bemerkbar, mit einem Maximum bei IP 32,5 \pm 0,6 °C für den nicht-phosphorylierten Komplex PASC-Kinase x R und

bei $IP2$ $37,2 \pm 0,3$ °C für den phosphorylierten Komplex PAsc-Kinase-P x R. Die Phosphorylierung verursacht ein ΔIP $5,3$ °C und somit die Stabilisierung dieser Position im Komplex. Der zweite Wendepunkt ist durch die Zunahme an Fluoreszenz detektierbar und durch ein Maximum bei $IP2$ 46 ± 1 °C für DcuS x R und bei $IP2$ $45 \pm 0,7$ °C für PAsc-Kinase-P x R. Der Unterschied um 1 °C ist vernachlässigbar und somit bewirkt die Phosphorylierung an dieser Stelle keinen Unterschied. Der Unterschied an Fluoreszenzintensität ist im nicht phosphoryliertem Zustand 3-fach stärker. Die dritte Transition weist negative Fluoreszenz auf mit einem Maximum bei $IP3$ $52,5 \pm 1$ °C für PAsc-Kinase x R und bei $IP3$ $51,5 \pm 0,5$ °C für PAsc-Kinase-P x R. Wie für die Position $IP2$ beschrieben wirkt sich die Phosphorylierung stärker auf die Intensität der Fluoreszenz als auf die Stabilität aus.

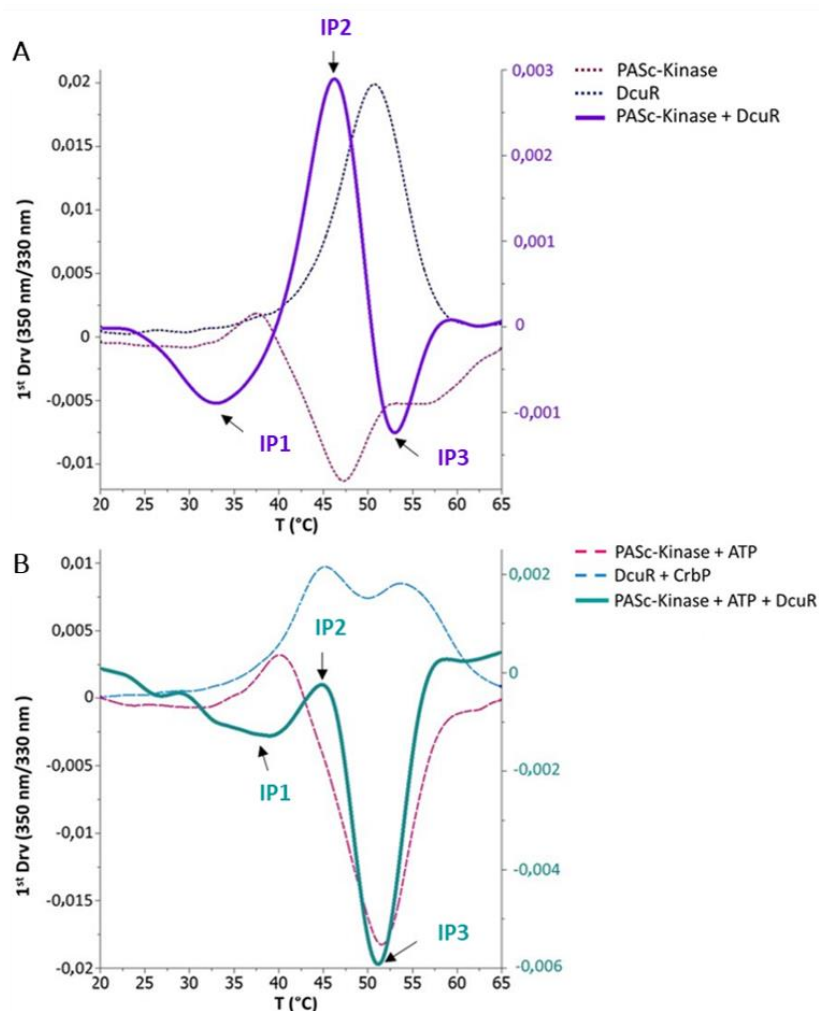
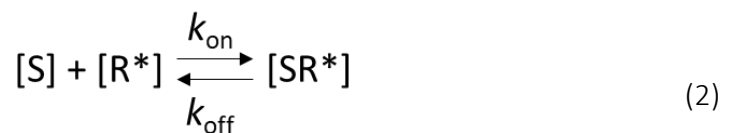


Abb. 20: Entfaltungprofil des DcuS x R Komplexes. Thermische Profile des nicht-phosphorylierten (A) und des phosphorylierten Komplexes (B), gegenüber den einzelnen Profilen von PAsc-Kinase und von DcuR. Die Entfaltung des Komplexes ist durch drei Wendepunkte (Transition (t)) gekennzeichnet.

4.1.3 Komplex-Stabilität gemessen an dessen Kd-Wert

Das MST-Gleichgewichtsexperiment zur Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen der PASC-Kinase und DcuR wurde als Titrationsexperiment angelegt. Dabei wurde die Konzentration des fluoreszenzmarkierten eYfp-Linker-DcuR Proteins bei 200 nM konstant gehalten, während die nicht-markierte PASC-Kinase in Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^4 nM dazu titriert wurde. Das MST-Signal ergibt sich durch die Quantifizierung der normalisierten Fluoreszenz von freiem, nicht gebundenem eYfp-Linker-DcuR (R^*) und der Änderung der Fluoreszenz durch die Bildung des Komplexes PASC-Kinase x R-Komplex (SR^*) (Abschnitt 3.4.3). Für das Bindungsmodell wurde angenommen, dass die PASC-Kinase und DcuR in 1:1 Bindungsstöchiometrie gebunden werden Formel (1) (Abschnitt 4.1.2). Wird die Formel detaillierter ausgeführt Formel (2), so sind $[S]$ und $[R^*]$ die Konzentration an freiem nicht-gebundenes Protein und $[SR^*]$ ist die Konzentration des Komplexes.



k_{on} ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Hinreaktion ($M^{-1}s^{-1}$) und k_{off} ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Rückreaktion (s^{-1}). Darauf folgend, kann die Dissoziationskonstante K_d im Gleichgewicht wie folgt beschrieben werden Formel (3):

$$K_d = \frac{[S][R^*]}{[SR^*]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (3)$$

Die Dissoziationskonstante gibt an, auf welcher Seite der Reaktion das Gleichgewicht liegt und somit ist diese ein Maß für die Stabilität des Komplexes. Ist der K_d -Wert klein, desto weiter liegt das Gleichgewicht bei dem assoziierten Komplex. Die Dissoziationsreaktion kann auch physikalisch beschrieben werden, mittel der Gibbs'schen freie Dissoziationsenergie (ΔG_d) und ihrer Abhängigkeit von der Konzentration, die dem Standardzustand entspricht. ΔG_d ist gegeben durch Formel (4):

$$\Delta G_d = -RT \ln \frac{K_d}{c_0} \quad (4)$$

mit $c_0 = 1 \text{ mol/l}$, R ist die Gaskonstante ($8,3144 \text{ J/K} \cdot \text{mol}$) und T ist die absolute Temperatur in Kelvin (K). Damit die Komplexbildung stattfinden kann, muss der Wert von ΔG_d positiv sein.

Die Änderung des Fluoreszenzsignals von eYfp-Linker-DcuR in Abhängigkeit von der Konzentration der PASC-Kinase und der Phosphorylierung ist in Abb. 21 zu sehen. In der Auswertung wurde der Signalbereich des thermophoretischen Temperatursprungs (Temperatur-Jump (TJ)) verwendet. In der gebundenen Form, das heißt wenn eYfp-Linker-DcuR einen Komplex mit der PASC-Kinase (SR^*) bildet, wird die Intensität der Fluoreszenz verringert. In freier, nicht gebundener Form ist die Fluoreszenz von DcuR (R^*) deutlich höher. Das Fluorophor eYfp wurde gemeinsam mit einem Linker N-terminal kloniert, also vor der REC-Domäne von DcuR. Diese Domäne ist der Ort der Interaktion mit PASC-Kinase.

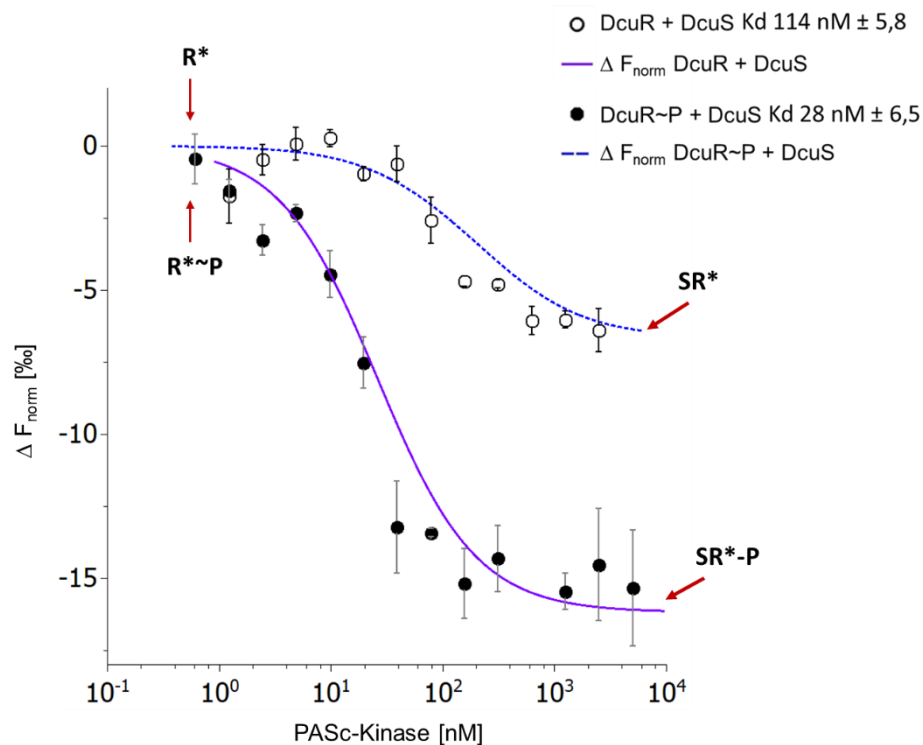


Abb. 21: Protein-Protein-Interaktion in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands von DcuR. Als Modalität wurde TJ verwendet und für die Kurvenanpassung wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet. Alle Werte wurden mit dem Faktor 1000 multipliziert und ergeben einen Unterschied in der Fluoreszenz (ΔF_{norm}) pro Tausend [%]). Dies wurde durch die NT ANALYSIS SOFTWARE (NanoTemper) durchgeführt. Zu dem konstant gehaltenen eYfp-Linker-DcuR (offene Kreise) und eYfp-Linker-DcuR-P (geschlossene Kreise) wurde von 10^{-1} bis 10^4 nM PASC-Kinase dazu titriert. Die Proteine wurden bei 25°C für 10 Min inkubiert. Das Signal für die Komplexbildung zwischen PASC-Kinase x R ist gekennzeichnet durch die Abnahme der Fluoreszenz von DcuR in der gebundenen Form.

Die Affinität von eYfp-Linker-DcuR für PASC-Kinase beträgt $114 \pm 5,8$ nM ($n = 2$, $x = 12$) und ΔG_d $39,5$ kJ \cdot mol⁻¹. Die Phosphorylierung von eYfp-Linker-DcuR erhöht die Komplexstabilität $28 \pm 6,5$ nM ($n = 2$, $x = 13$) und die Gibbs'sche freie Dissoziationsenergie beträgt $43,1$ kJ \cdot mol⁻¹. Somit hat die Komplexbildung eine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität und die Phosphorylierung auf die Affinität und die Fluoreszenzintensität.

4.1.4 *In vitro* Autophosphorylierung von DcuS und PASC-Kinase

Die Aufgabe der SHK ist es, den außerhalb der Zelle wahrgenommenen Reiz in ein Signal umzuwandeln und dieses an den Antwortregulator weiterzuleiten. Die Signalweitergabe übernimmt der Kinasekern der SHK. Dieser Kinasekern ist aus der DHp-Domäne und der Kinase-Domäne aufgebaut und ist nur als Homodimer aktiv. Die Dimerisierung sollte in der DHp Domäne stattfinden, in welcher auch die H-Box liegt. Den SHK werden zwei enzymatischen Funktionen zugesprochen. Die eine Funktion beinhaltet die Autokinase- und Phosphotransferaktivität und wird als positive Regulation auf dem AR definiert. Diese Funktion sollte mittels radioaktiv markiertem ATP für das rekonstituierte Volllängen-DcuS und für das verkürzte Konstrukt PASC-Kinase untersucht werden.

Für die Autophosphorylierung von DcuS wurde dieses erst in Liposomen rekonstituiert. Rekonstituierte Transmembranproteine orientieren sich häufig mit der kleinen, sensorischen PAsp-Domäne nach innen und die lösliche Kinase Domäne zur Außenseite der Liposomen; somit ist diese für ATP zugänglich (Janausch *et al.*, 2002; Paternostre *et al.*, 1998; Rigaud *et al.*, 1995). Für die Rekonstitution wurde DcuS in Liposomen rekonstituiert (Abschnitt 3.3.6) und mit Phosphorylierungspuffer dreimal in Flüssigstickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Durch diesen Vorgang werden die Liposomen vergrößert und der Puffer gleichmäßig im inneren der Liposomen verteilt. Dieser Vorgang ist für PASC-Kinase nicht nötig. Nach 45-minütiger (DcuS) bzw. 15-minütiger (PASC-Kinase) Inkubation wurde die Autophosphorylierungsreaktion durch die Zugabe an $10 \mu\text{M}$ [³³P]-ATP gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt. Nach Trennung des Proteins im SDS-PAGE wurde die DcuS-assoziierte Radioaktivität durch Phosphoimaging bestimmt (Abb.: 22), wie bei Janausch (*et al.*, 2002) beschrieben.

Die relative Anfangsgeschwindigkeit (rV_0) für Volllänge-DcuS beträgt $rV_0 = 2,45 \% \cdot \text{Min}^{-1}$ und ist durch eine Halbsättigung bei $t_{50} = 45 \text{ Min}$ gekennzeichnet. PASC-Kinase hat eine Anfangsgeschwindigkeit von $rV_0 = 218 \% \cdot \text{Min}^{-1}$. Somit ist die Autophosphorylierung der PASC-Kinase sehr effizient und übertrifft die des Volllänge-DcuS um den Faktor 89 in der Anfangsgeschwindigkeit und um den Faktor 30 in der Umsatzgeschwindigkeit.

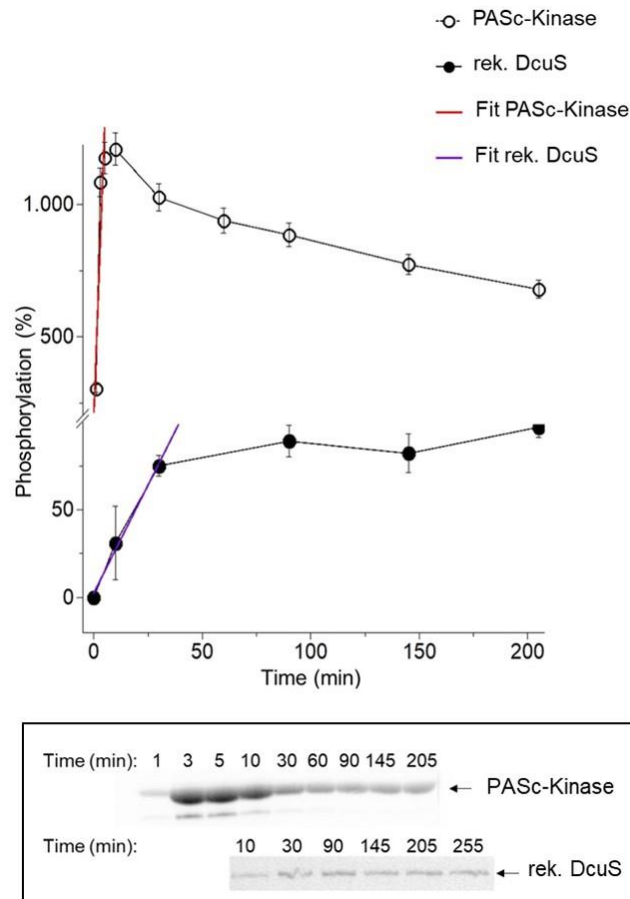


Abb. 22: Kinetik der relativen Autophosphorylierung von Volllänge-DcuS und der PASC-Kinase. DcuS ($6 \mu\text{M}$) und PASC-Kinase ($12 \mu\text{M}$) wurden in Phosphorylierungspuffer ($50 \text{ mM TrisHCl pH}7,7$, 1 mM DTT und 10 mM MgCl_2) für 45 Min bzw. 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Autophosphorylierungsreaktion wurde mit der Zugabe an $10 \mu\text{M } [\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden $20 \mu\text{l}$ Probe von dem Reaktionsgefäß entnommen, zu der Stopp-Lösung ($2\times \text{SDS-Ladepuffer}$, $0,2 \text{ M DTT}$) gegeben und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die relative Phosphorylierung wurde aus Mittelwerten von vier unabhängigen Durchführungen errechnet. Das radioaktive Signal (IOD) von Volllänge-DcuS wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und in Prozent umgerechnet. Für Volllänge-DcuS entsprechen $100 \% = 782 \text{ IOD} \pm 361$ ($n = 5$). Die intensivste Phosphorylierung (Schwärzung) für PASC-Kinase ($\text{IOD} = 19089 \pm 5114$ ($n = 4$)) liegt um den Faktor 24 höher als DcuS.

Als nächstes wurde die Phosphoryl-Übertragung auf DcuR untersucht. Im Falle von Volllänge-DcuS wurde dieses wie oben beschrieben für 90 Min mit $4,46 \mu\text{M ATP}$ (davon $0,28 \mu\text{M } [\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$) phosphoryliert. Bei Minute 90 wurde DcuR zu dem Ansatz gegeben. Abb. 23 (A) zeigt das Phosphorylierungssignal in Abhängigkeit von der Zeit für Volllänge-

DcuS mit DcuR. Die Autophosphorylierung dauert mit 90 min am längsten (1), die Phosphoryl-Übertragung auf DcuR (2) erfolgt rasch und nach 3 min wird das Maximum an phosphorylierter DcuR erreicht. Dieser Wert ist doppelt so hoch wie der Wert für 100 % phosphoryliertes Volllänge-DcuS. Unmittelbar danach findet die Dephosphorylierung (3) statt. Nach 120 Min liegen beide Proteine zur Hälfte phosphoryliert vor. In Abb. 23 (B) ist die Reaktion der Autophosphorylierung und Phosphoryl-Übertragung für PASC-Kinase und DcuR dargestellt. Abgeleitet von den Autophosphorylierungsergebnissen für die PASC-Kinase darf diese nicht wie das rekonstituierte DcuS phosphoryliert werden, da die Anfangsgeschwindigkeit und die Rate der Phosphorylierung sich stark unterscheiden.

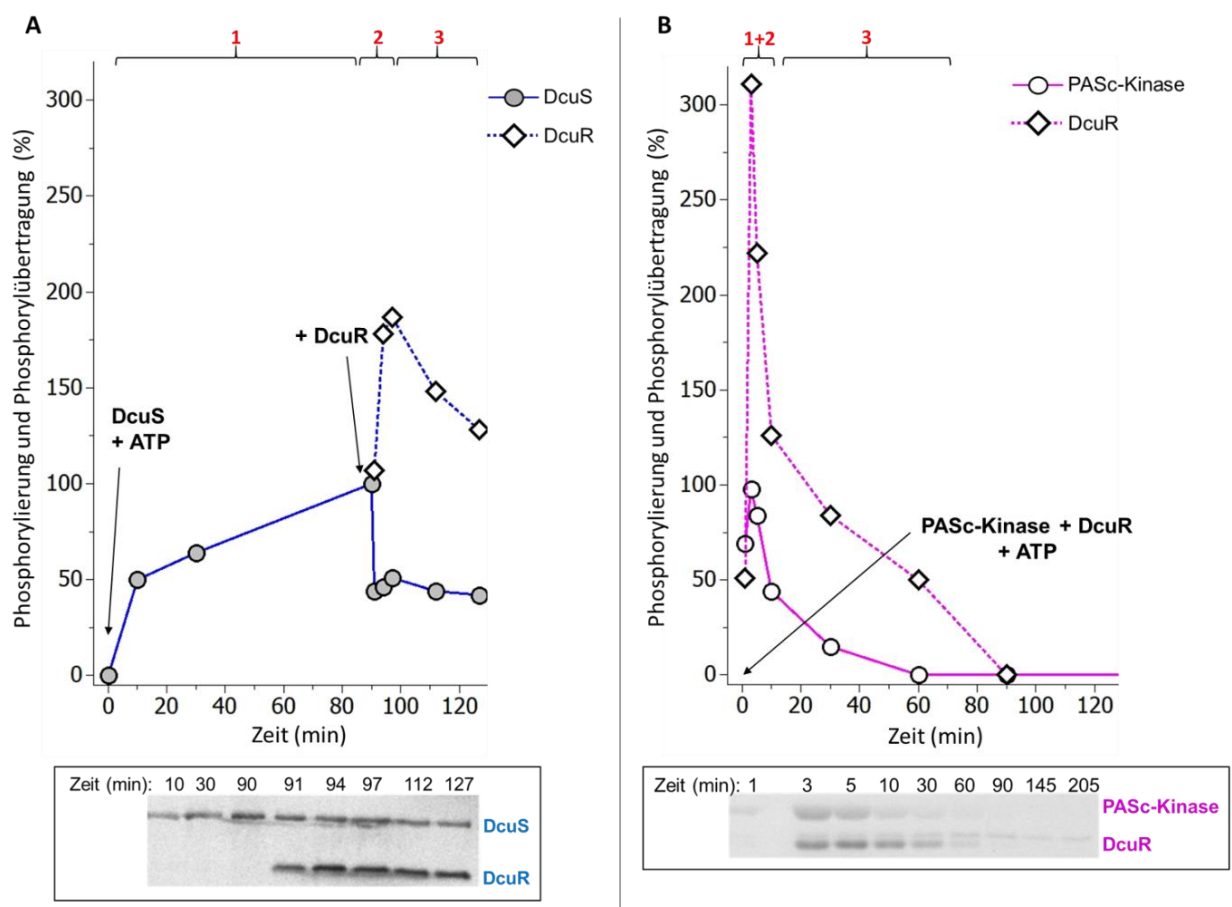


Abb. 23: Autophosphorylierung und Phosphoryl-Übertragung auf DcuR als Funktion der Zeit von volllänge Volllänge-DcuS und das verkürzte Konstrukt PASC-Kinase. (A) Die Autophosphorylierung wurde, wie bereits oben beschrieben durchgeführt. Für die Phosphoryl-Übertragung von Volllänge-DcuS (grauer Kreis) auf DcuR (offene Raute) wurde bei Minute 90 DcuR zu dem Reaktionsansatz gegeben. **(B)** Autophosphorylierung und Phosphoryl-Übertragung von PASC-Kinase (offener Kreis) auf DcuR (offene Raute). PASC-Kinase und DcuR wurden in Phosphorylierungspuffer 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde, in der Anwesenheit beider Proteine, durch der Zugabe an $[\gamma^{33}\text{P}]$ -markiertem ATP begonnen.

Aus diesem Grund wurden beide Proteine gemeinsam in Phosphorylierungspuffer für 10 Min inkubiert, bevor die 4,46 μM ATP (davon 0,28 μM [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP) dazugegeben wurde. Die Phosphorylierung und Phosphoryl-Übertragung erfolgen rasch (<2 min) und nach 80 min liegen beide Proteine nicht-phosphoryliert vor. Es sind große Unterschiede im zeitlichen Verlauf der einzelnen Reaktionsschritte festzustellen. So verlaufen die Reaktionsschritte der Autophosphorylierung und der Phosphoryl-Übertragung gleichzeitig und bei einem gewissen Betrag an phosphoryliertem DcuR setzt die Dephosphorylierung auch deutlich früher und rascher an. PASC-Kinase und DcuR liegen nach 10 Min nur noch zur Hälfte phosphoryliert vor. In der direkten Anwesenheit von DcuR wird PASC-Kinase zu 100 % phosphoryliert und in beiden Fällen liegt der Phosphorylierungsbetrag von DcuR deutlich über dem der HKs (für Volllänge-DcuS das 2-fache und für die PASC-Kinase das 3-fache).

4.1.5 Interaktion zwischen DcuS und DcuR *in vivo*: BACTH-Messungen

Die Interaktionsstelle der SK für den AR liegt am C-terminal in der Kinase-Domäne und die Interaktionsstelle des AR mit der SK am N-terminal in der REC-Domäne. Vorangegangene Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass DcuS und DcuR miteinander spezifisch interagieren (Janausch, 2002; Witan, 2012). Im Hinblick auf nachfolgende Versuche, welche die möglichen Interaktionsreste in DcuS und in DcuR bestimmen sollen, wurde die Interaktion zwischen DcuS und DcuR mit dem BACTH-Verfahren getestet. Mit diesem Test kann die Stärke der Interaktion gemessen werden, da nur interagierende Proteine eine funktionale Komplementation der klonierten Fragmente erzielen.

Es wurden unterschiedlichen Fusionskombinationen untersucht, welche die Interaktion widerspiegeln. Das N-terminal-fusionierte T25-DcuR-Konstrukt zeigt eine deutliche Interaktion mit C-terminal-fusioniertem DcuS-T18 (Volllängen-DcuS) und PASC-Kinase-T18 (Aminosäure 212-543) (Abb.: 24). Dagegen weist DcuS mit C-terminal liegenden T18 Fragment von T15-DcuR kaum Interaktion auf.

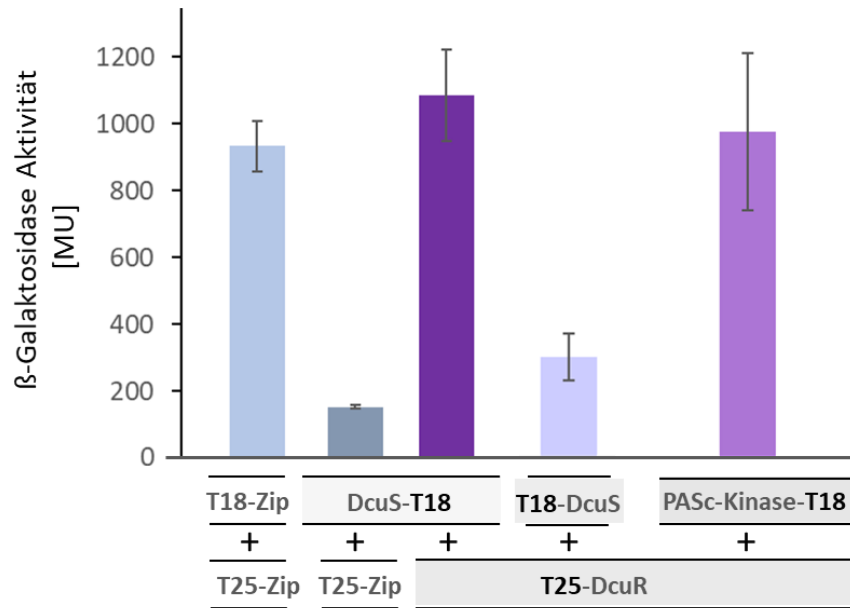


Abb. 24: Interaktion zwischen DcuS oder PASC-Kinase mit DcuR. N-terminal-fusioniertes DcuR (T25-DcuR, pMW427) wurde mit C-terminal-fusioniertem DcuS (DcuS-T18, pMW428) und PASC-Kinase (PASC-Kinase-T18, pMW1076) sowie mit N-terminal-fusioniertem DcuS (T18-DcuS, pMW429) kombiniert.

4.2 Identifizierung von DcuS und DcuR Interaktionsstellen für die Komplexbildung

Die Zweikomponenten-Systeme stellen eine hervorragende Ganzheit zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen (PPI) und deren biophysikalischen und biochemischen Spezifität dar. Diese Spezifität zeigt sich in der Fähigkeit von HKs *in vitro* eine große kinetische Präferenz für ihren *in vivo* Antwortregulator aufzuzeigen, im Vergleich zu allen anderen Antwortregulatoren in der Zelle (Goulian & Batchelor, 2007; Laub & Salazar, 2015). Dies bedeutet, dass HKs und RR eine intrinsische Fähigkeit besitzen, sich gegenseitig gezielt zu erkennen und gegenüber anderen Proteinen zu bevorzugen (Skerker *et al.*, 2008; Schug *et al.*, 2010; Vishwanath *et al.*, 2017). Die intrinsische Fähigkeit der molekularen Erkennung, liegt in der Interaktionsoberfläche und der daran beteiligten AS-Reste. Es gibt kritische Reste in PPIs, die den größten Beitrag zur Bindungsenergie und dadurch zur Stabilität und Spezifität leisten (Clackson & Wells, 1995; Nooren & Thornton, 2003). Solche Reste können durch Alanin-Scanning-Mutagenese gezielt bestimmt werden (Clackson & Wells, 1995).

4.2.1 Alignment und Auswahl von Substitutionen in DcuS beteiligt an der Komplexbildung

In folgendem Abschnitt wurden die an der spezifischen Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR beteiligten AS auf Seiten der SHK ermittelt. Dazu wurde ein Multiple Sequenz Alignment (MSA) mit UniproUGENE durchgeführt.

Die Interaktionsschnittstellen sowie die Struktur von HK-RR Komplexe, wurden bereits für die Zweikomponenten-Systeme HK853-RR468 von *Thermotoga maritima*, Spo0B-Spo0F von *Bacillus subtilis*, PhoR-PhoB und EnvZ-OmpR von *E. coli* beschrieben (Zapf *et al.*, 2000; Skerker *et al.*, 2008; Casino *et al.*, 2009; Podgornaia *et al.*, 2013). Für diese PPI sind die Interaktionsreste bekannt und deshalb wurden die Sequenzen dieser Proteine zum Vergleich herangezogen (Abb.: 25 A). Die HKs HK853 und EnvZ sind Vertreter der Histidin Protein Kinasen (HPK) 2 Gruppe. Dagegen gehört DcuS zu der HPK 5 Gruppe und Spo0B zu den HisKA-like Proteine (Wolanin *et al.*, 2002; Schug *et al.*, 2010). Die Eingruppierung der HPK basiert auf konservierten Motiven (H-, N-, D-, F- und G-Box) welche in der DHp- und Kinase-Domäne liegen (Wolanin *et al.*, 2002). Um die Sequenz- und Motivkonservierung

innerhalb der HPK5 Gruppe zu untersuchen, wurde auch ein MSA für DcuS gegen DcuS homologe durchgeführt (Abb.: 25 B).

Der α 1-Helix der DHP Domäne von HK853 (gelbe Zylinder) ist 11 AS länger als der α 1-Helix von DcuS (grauer Zylinder); Crosslink Versuche zeigen, dass der α 1-helix von DcuS bereits bei I358 endet (Eckelmann, 2020) und laut den Modell von Casino *et al.*, (2009) spielt der α 1-Helix (Reste T267 und Y272; rote Boxen in dem Alignment) und der α 2-Helix der DHP-Domäne die entscheidende Rolle für die Komplexbildung mit RR468. In dem Sequenzvergleich zwischen DcuS mit Vertreter des HisKA Stamm (HK853, EnvZ und Spo0B) zeigen sich N353, L355, I358, G360 und L362 als stark konservierte Reste (>80 %). Innerhalb der DcuS homologen der HPK5 sind 24 % der Reste stark konservierte Reste (>100 %) z. B: N353, G360, L361 und L362 und 64 % besitzen eine über 60%-ige Ähnlichkeit in der Sequenz. Auf der Grundlage dieses Sequenzvergleichs wurden 18 Alanin Mutationen mittels gerichtete Mutagenese eingeführt, um diese in *dcuB-lacZ* Expression zu testen und so die Wirkung der Substitution in DcuS auf der DcuS-DcuR Komplex abhängigen Gen Expression zu testen.

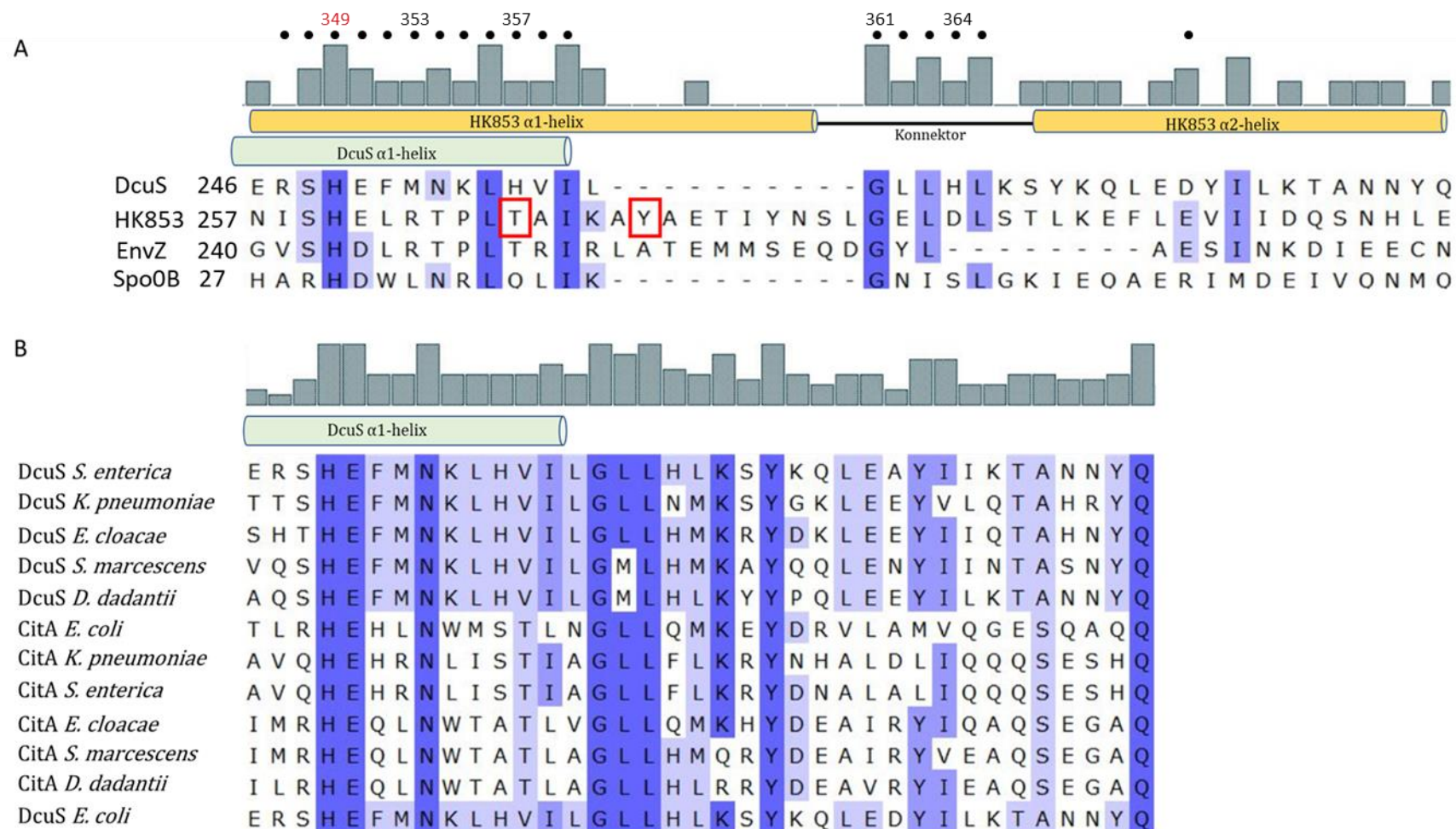


Abb. 25: Multiples Sequenz Alignment (MSA) der DHP-Domäne von DcuS mit anderen Vertretern der HisKA Familie und der HPK5 Gruppe. Das MSA wurde mit dem Programm Unipro UGENE erstellt. Als Algorithmus wurde MUSCLE verwendet. **A:** Die MSA wurde mit HK durchgeführt, dessen Protein-Protein Interaktion und Komplexbildung bereits bekannt sind. **B:** MSA mit DcuS homologe in den jeweiligen Taxa durchgeführt. Oberhalb des Alignments sind AS markiert, welche mit Alanin-Scanning-Mutagenese und in *dcuB-lacZ* Expression untersucht wurden (schwarze Punkte; die Zahl über den Punkten gibt die AS-Position in DcuS an). (Schwellenwerte: hellblau >60 %, blau >80 % und dunkelblau 100 %).

4.2.2 Auswirkung der DcuS-Substitutionen auf die *dcuB-lacZ* Expression

Die Expression des anaeroben Transporters DcuB wird durch das DcuSR-System reguliert und durch C₄-Dicarbonsäuren induziert. Die Deletion von DcuSR führt zu einer Inaktivierung der *dcuB*-Genexpression (Golby *et al.*, 1999; Zientz *et al.*, 1998). Dieser Zusammenhang der DcuSR abhängigen *dcuB* Expression wurde zur Vorauswahl von AS-Resten verwendet, die an der Komplexbildung zwischen beide Proteinen beteiligt sein können, um diese anschließend im BACTH-Interaktionstest weitergehend zu untersuchen. Werden AS, beteiligt an der Komplexbildung, durch Substitution ersetzt, sollte sich diese auf die Komplexbildung und somit auf die Expression von *dcuB* auswirken. Als Folge wird entweder einer positiver (Hochregulierung) oder negativer (Inaktivierung) Effekt auf die Expression erwartet, die sich in on- bzw. off-Phänotypen unterscheiden lassen.

On-Phänotypen zeichnen sich durch Hochregulierung aus, so dass sie, trotz der Abwesenheit des Substrates Fumarat, das *dcuB-lacZ* Reporter gen stark exprimieren. Off-Phänotypen hingegen führen zur Nichtexpression des Reporter gens, unabhängig von der Anwesenheit von Fumarat.

Zur Identifizierung der unterschiedlichen Phänotypen erfolgte die Zucht in angereichertem M9-Medium, anaerob mit Glycerin, DMSO und in An- bzw. Abwesenheit des Effektors Fumarat. Die Zellen wurden bei OD₅₇₈ 0,5-0,8 mit ONPG induziert und bei OD₄₁₅ wurde die β-Galaktosidaseaktivität ermittelt. Die Expression des Reporter gens wurde in MU umgerechnet. Als *E. coli* Ausgangsstamm wurde IMW260 (Δ *dcuS*) verwendet, welcher die Reporter genfusion *dcuB-lacZ* trägt. Das in dem IMW260-Stamm chromosomal inaktivierte *dcuS* wurde mit einem low-copy *dcuS* tragenden Plasmid (pMW181) bzw. dessen Derivate (s. Abschnitt [8.2](#)) komplementiert. Unter anaeroben Bedingungen, mit und ohne Fumarat, zeigt dieser Stamm minimale Expression an *dcuB-lacZ* (100 MU \pm 25) (Abb.: 26). Wird IMW260 mit dem *dcuS* tragenden Plasmid komplementiert, ist die Expression, sowohl mit Fumarat als auch ohne Fumarat, vorhanden. Wobei mit Fumarat einer Steigerung der Aktivierung, um den Faktor 4 zu beobachten ist (400 MU \pm 50).

Es wurden insgesamt 18 AS-Substitutionen, welche in der DHP-Domäne (α 1- und α 2-Helix) von DcuS liegen, eingeführt. Diese zeigten in der MSA einerseits eine Konservierung bezüglich der Position innerhalb des HisKA Stamm und andererseits einer Konservierung der Reste innerhalb der HPK5-Gruppe. Von den 18 getesteten AS, zeigten die Substitutionen R3447, S348, F351,

M352, L356, H357, V358, I359, H364, L365 und D377 ähnliche β -Galaktosidaseaktivitäten wie der Wildtyp von DcuS (400 MU \pm 100; Daten nicht gezeigt).

Die Substitutionen H349A, E350A, K354A und G360A zeigten sowohl mit als auch ohne Fumarat schwache β -Galactosidaseaktivitäten (100 MU \pm 50) und stellen somit den off-Phänotyp dar.

Die Substitutionen N353A, L361A und L362A haben sowohl mit als auch ohne Fumarat die am höchsten gemessenen β -Galactosidaseaktivitäten mit über 600 MU. Somit handelt es sich bei diesen Substitutionen um on-Phänotypen.

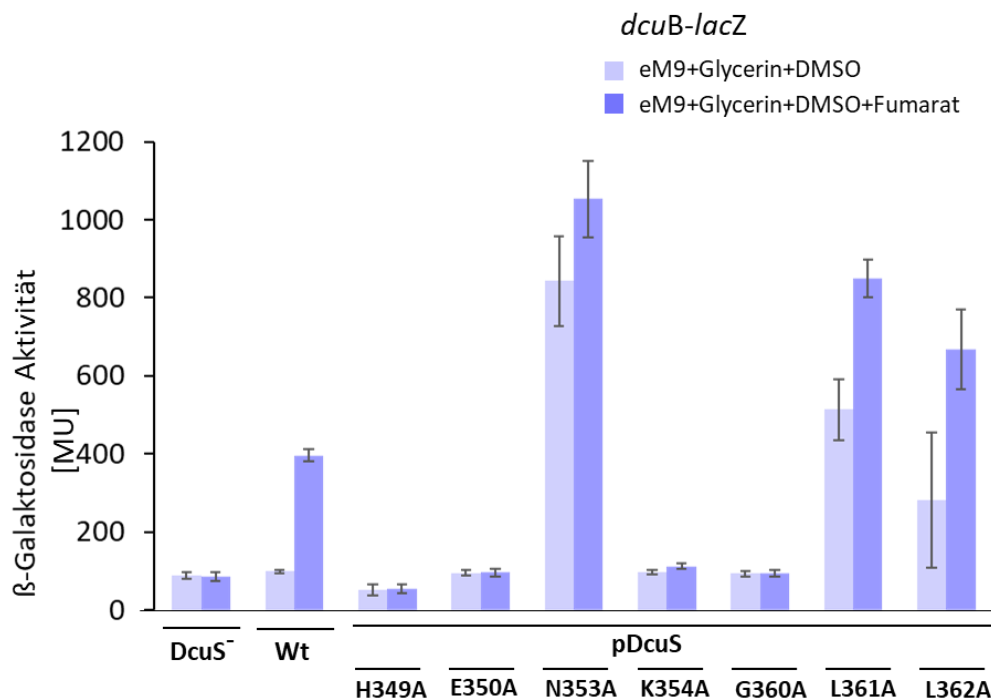


Abb. 26: Expression des Reportergens *dcuB-lacZ* in Anwesenheit von DcuS-Substitutionen. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (Δ *dcuS*) mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW181), bzw. dessen Substitutionen komplementiert. Die Zucht erfolgte aerob in eM9-Medium mit 50 mM Glycerin, 20 mM DMSO und mit bzw. ohne den Effektor Fumarat (20 mM). Die β -Galactosidaseaktivität wurde mit Bakterien bei OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,8 gemessen. Die Daten sind Mittelwerte von Zuchten aus acht unterschiedlichen Kolonien, von denen jeweils vier Aktivitätsmessungen durchgeführt wurden.

4.2.3 Auswirkung der DcuS-Substitutionen auf der DcuS-DcuR-Interaktion untersucht mittels BACTH

Die Komplexbildung sowie die dazugehörigen PPIs zwischen DcuS und DcuR wurde mittels des BACTH-Systems (Abschnitt 3.3.8) untersucht. Diese Methode beruht auf die funktionale Rekonstitution einer bakteriellen Adenylatzyklase von *B. pertussis* in einem Adenylatzyklase negativen *E. coli* Stamm BTH101 (Karimova *et al.*, 1998). Die T25- und T18-Fragmente der Adenylatzyklase wurden an N- oder C-terminalen Ende der Proteine fusioniert, die eine cAMP produzierende Einheit bilden, wenn diese spezifisch miteinander interagieren und Heterodimere bilden (Karimova *et al.*, 1999). DcuS interagiert mit DcuR, mit der C-terminal liegenden Kinase Domäne. Deshalb wurden die T18- bzw. T25-Fragmente C-terminal gewählt. DcuR interagiert mit DcuS, mit der N-terminal liegenden REC-Domäne. Aus diesem Grund wurden Konstrukte verwendet, die T18- bzw. T25-Fragmente tragen. Die Spezifität der Interaktion wurde mit verschiedenen Kontrollen nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente die Kombination eines Leucin Zipperpaars (T25-Zip/T18-Zip), das bekanntermaßen eine starke Interaktion aufweist (1000 MU; vgl. Abb.: 24 S.67). Als Negativkontrolle wurden T25- und T18-Zip mit den verwendeten Konstrukten kombiniert. Diese unspezifische Hintergrundinteraktion erreichte nicht mehr als 200 MU.

Das verkürzte DcuS Konstrukt PASC-Kinase-T18 (pMW1076) und dessen Substitutionen wurden mit T25-DcuR (pMW427) tragenden Plasmid in BTH101 ko-exprimiert (Abb.: 27). Die Interaktionswerte für Wt PASC-Kinase betragen $1000 \text{ MU} \pm 200$ und die Substitutionen H349A, E350A und K354A zeigten, im Vergleich zum Wt, ähnliche hohe Interaktionswerte. Für die Substitutionen N353A und G360A, konnten im Vergleich zum Wt, verminderte Interaktionswerte verzeichnet werden. Die Substitutionen L361A und L362A hatten einen weitgehenden Ausfall der Interaktion zur Folge.

Das verkürzte PASC-Kinase Konstrukt ist zytoplasmatisch lokalisiert. Dagegen ist das Volllänge DcuS Protein transmembran lokalisiert und sitzt in Clustern angeordnet an den Zellpolen. Es sollte die spezifische Interaktion von PASC-Kinase bzw. Substitutionen mit DcuR und Volllänge-DcuS bzw. Substitutionen mit DcuR untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde auch BACTH-Interaktionsstudien mit dem Volllängenkonstrukt DcuS-T18 (pMW428) und DcuR-T25 durchgeführt (Abb.: 28). Die Interaktionsstudien zeigten, dass die Substitutionen N353A, G360A, L361A und L362A im Vergleich zum Wt eine verminderte Interaktion hatten. Die Substitutionen H349A, E350A und K354A wiesen spezifische wildtypähnliche Interaktionswerte

auf. Somit spiegeln sich in dieser Interaktionsmessung tendenziell die Interaktionswerte aus dem BACTH-Test des verkürzten DcuS Konstruktes PASC-Kinase-T18 wider.

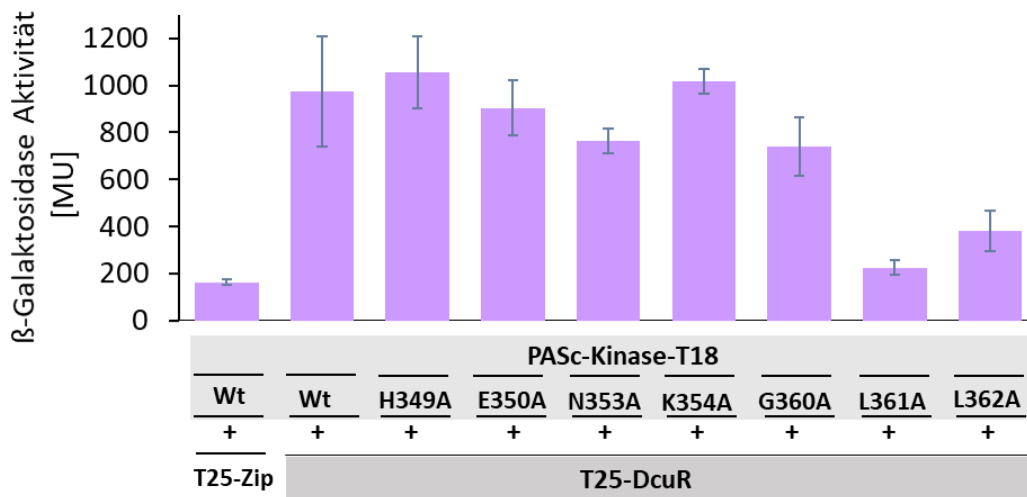


Abb. 27: Interaktion von PASC-Kinase-T18 mit T25-DcuR im BACTH-Test. Die Plasmide pMW1076 (PASC-Kinase-T18) und pMW427 (T25-DcuR) wurden in BTH101 ko-transformiert. Die Mutationen von PASC-Kinase wurden in pMW1076 eingefügt. Die Zucht erfolgte aerob in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG. Als Negativkontrollen diente T25-Zip + PASC-Kinase-T18. Die Daten sind Mittelwerte von Zuchten aus acht unterschiedlichen Kolonien, von denen jeweils vier Aktivitätsmessungen durchgeführt wurde.

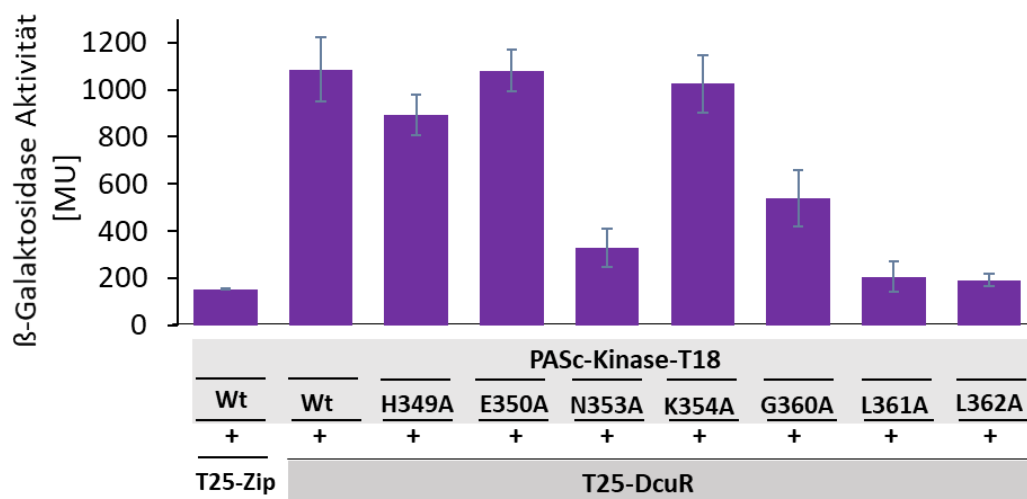


Abb. 28: Interaktion von DcuS-T18 Mutanten mit T25-DcuR im BACTH-Test. *E.coli* BTH101 wurde mit den Plasmiden pMW428 (DcuS-T18) und pMW427 (T25-DcuR) ko-transformiert. Die DcuS Mutationen in pMW428 eingefügt. Als Negativkontrolle diente T25-Zip + DcuS-T18.

4.2.4 *In vivo* Ko-Lokalisation von DcuS-Substitutionen mit DcuR

Die Hks DcuS befindet sich an den Zellpolen oder in transienten Clustern in der Zellmembran der Bakterienzelle. Der AR DcuR dagegen liegt in dem Zytoplasma homogen verteilt vor. Nur in der Anwesenheit von DcuS, ko-lokalisiert DcuR mit DcuS-Clustern an der Membran (Scheu *et al.*, 2014). Die im BACTH-Test getesteten DcuS-Substitutionen H349A, E350A, N353A, K354A, G360A, L361A und L362A, sollten mit *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie in Hinblick auf der Ko-Lokalisation mit DcuR untersucht werden.

Zuerst wurde überprüft, ob die in DcuS-Yfp (pMW407) eingeführten Substitutionen eine Abweichung in der Lokalisation von DcuS zeigen würden. Die Tests wurden in den *E. coli* Stamm IMW262, welcher eine DcuS Deletion trägt, durchgeführt. Die Lokalisation der DcuS-eYfp Substitutionen lag in 96 – 100 % der Zellen, in der Membran als Cluster oder pollokalisiert vor, vergleichbar mit der Lokalisation von Wt DcuS-Yfp. Eine zytoplasmatische Verteilung von DcuS-Yfp konnte in den Kontrollversuchen bei maximal 9 % der Zellen (DcuS-Yfp wildtypisch) beobachtet werden.

Für die Ko-Lokalisation von DcuS bzw. die DcuS-Substitutionen mit eYfp-Linker-DcuR (Abb. 29), wurden zuerst die Substitutionen in das His₆-DcuS Expressionsplasmid (pMW1390) mittels gerichteter Mutagenese-PCR eingefügt. Das plasmidcodierte DcuS, bzw. dessen Substitutionen, wurde jeweils mit dem eYfp-Linker-DcuR tragenden Plasmid (pMW1953) in IMW262 ko-transformiert und ko-exprimiert. Es wurden pro Substitution, zwei unabhängige Kulturen aus zwei verschiedenen Kolonien angeimpft und jeweils (pro Kultur) 200 Zellen ausgewertet. Die Expression von eYfp-Linker-DcuR in IMW262, ohne die Komplementation durch DcuS, ergab eine cytosolische Verteilung bei 100 % der ausgewerteten Zellen. DcuR ko-lokalisiert mit Wt DcuS in 72,5 % der Bakterienzellen. Auch die Ko-Lokalisation von DcuR mit den DcuS-Substitutionen E350A (85 %) und K354A (80 %) hatten wildtypischen Werte. Dagegen zeigen die DcuS-Substitutionen G360A mit 39 % und L361A mit 35 %, im Vergleich zum Wildtyp, eine Reduzierung und die Substitutionen H349A mit 9 % und N353A mit 4 % ein Verlust der Ko-Lokalisation mit eYfp-Linker-DcuR.

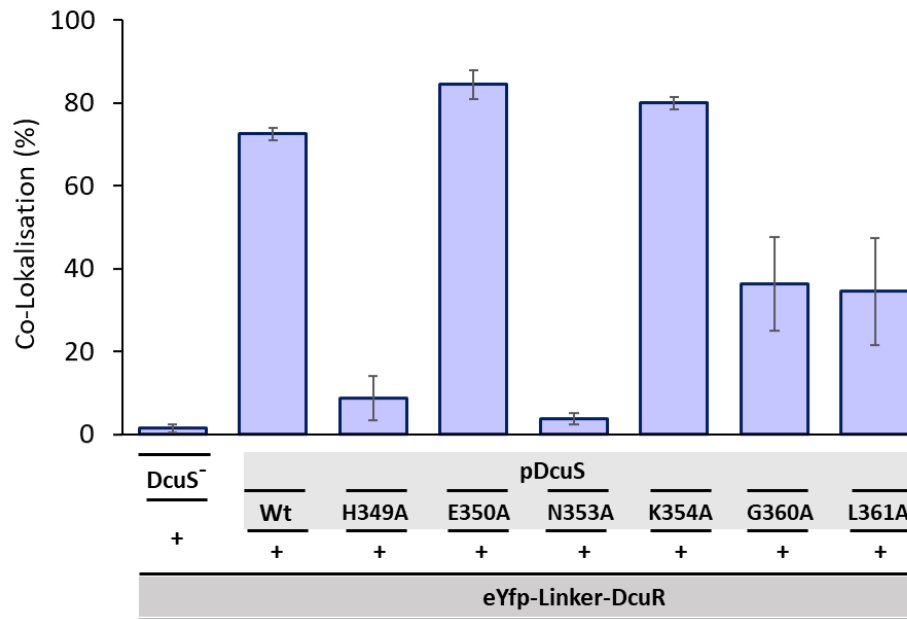


Abb. 29: Ko-Lokalisation von eYfp-linker-DcuR mit DcuS-Substitutionen in *E.coli*. Für die Ko-Lokalisation wurde das plasmidcodierte DcuS (pMW1390), bzw. dessen Substitutionen und die plasmidcodierte eYfp-linker-DcuR (pMW1953) in *E. coli* IMW 262 ($\Delta dcuS$) ko-exprimiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 30 °C. Ab einer OD₅₇₈ von 0,8 wurden die Bakterien für 1 h mit 133 μ M L-Arabinose inkubiert. Pro DcuS Substitutionen wurden von 2 Kolonien Zellen gezüchtet, von denen jeweils 200 Zellen ausgewertet wurden. Als Kontrolle wurde IMW 262 ($\Delta dcuS$) nur mit pMW1953 transformiert.

4.2.5 Alignment und Auswahl von Substitutionen in DcuR für die Komplexbildung mit DcuS

Die Funktion von AR ist das Weiterleiten des über Phosphorylierung übermittelten Signals und die Regulation der Genexpression auf der Transkriptions-, Posttranskriptions- oder Posttranslationsebene. Die REC-Domäne, (N- oder C-terminal liegend), ist beteiligt an dem Übermitteln des Signals und ist für alle AR charakteristisch. Diese Domäne ist eine kompakte, autonom faltende und evolutionär stabile Struktureinheit, die nach Phosphorylierung eine Konformationsänderung erfährt (Galperin, 2006). Die Output-Domäne, verantwortlich für die Regulation, unterscheidet sich in Architektur und Funktion (Galperin, 2010; Bourret, 2010). In folgendem Abschnitt wurden Reste in DcuR, beteiligt an der spezifischen Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR, ermittelt. Dazu wurde ein Multiple Sequenz Alignment (MSA) mit UniproUGENE durchgeführt. DcuR gehört zu den NarL-like AR mit eine N-terminal liegenden REC-Domäne und eine C-terminal liegenden HTH-Domäne Architektur. Die REC-Domäne (AS 2-121) ist CheY-like resiever, mit der typischen $(\alpha\beta)_5$ -Topologie. Zentral der REC-Domäne befinden sich fünf parallele β -Faltblätter. Für anderen AR ist bekannt, dass der Ort der PPI in der REC-Domäne liegt. Nach dem Strukturmodell wird der $\alpha 1$ -Helix von DcuR von den Aminosäuren 11-23 gebildet. Diese könnte nach der von Casino *et al.* publizierten Kristallstruktur des HK853-RR468 Komplexes für die spezifische Interaktion von Bedeutung sein (Casino *et al.*, 2009).

Für die Bestimmung der Aminosäuren, die an der PPI zwischen DcuS und DcuR beteiligt sind, wurde ein MSA von DcuR mit anderen AR durchgeführt (Abb.: 30). Für diese AR sind die AS-Reste bereits bekannt und in der orangenen Box markiert (Skerker *et al.*, 2008; Casino *et al.*, 2009; Laub *et al.*, 2013). Für das Alignment wurde die Sequenz für die Vollängen Proteine der jeweiligen Taxa verwendet. Oberhalb des Alignments sind Aminosäureaustausche markiert, welche im BACTH-Interaktionstest untersucht wurden.

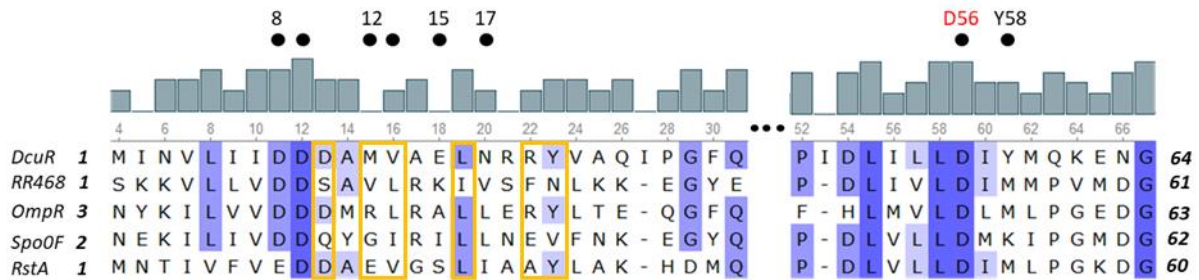


Abb. 30: Multiples Sequenz Alignment (MSA) von DcuR mit verschiedenen Responseregulatoren. Das MSA wurde mit dem Programm Unipro UGENE erstellt. Als Algorithmus wurde MUSCLE in den Default Einstellung verwendet. Das MSA wurde in der Sequenz der Vollängen Proteine der jeweiligen Taxa durchgeführt. Dargestellt sind Abschnitte aus der REC-Domäne. Oberhalb des Alignments sind Aminosäureaustausche markiert und deren Position, welche im BACTH-Interaktionstest untersucht wurden. Die Schwellenwerte für die farbliche Darstellung der AS-Konservierung sind: hellblau 50 %, blau >60% und dunkelblau > 80 %.

4.2.6 Auswirkung der DcuR Substitutionen auf die DcuS-DcuR Interaktion untersucht mittels BACTH

Durch die Experimente zur DcuS-T18 Interaktion mit T25-DcuR, konnte gezeigt werden, dass die DcuS bzw. Substitutionen mit DcuR eine spezifische Interaktion mit DcuR aufweist und Substitutionen N353A, G360A, L361A und L362A im Vergleich zum Wt eine verminderte Interaktion hatten. Um einen Überblick über mögliche, für die Interaktion wichtige, Reste auf der Seite von dem AR zu erhalten, wurden Punktmutationen in T25-DcuR (pMW427) eingefügt und mit DcuS-T18 (pMW428) getestet (Abb.: 31). Die Interaktion zwischen DcuS-T18 und T25-DcuR Substitutionen: D9A, E15A, D56N und L96A näherten sich hierbei dem Wildtyp Interaktionswert an. Die T25-DcuR Substitutionen D8A (16 %), M12A (16 %), D56A (15 %) und I81A (20%) zeigten einen nahezu kompletten Verlust der Interaktion der beiden Proteine. Die Substitutionen V13A (58 %), N17A (49 %) und K106A (49 %) wiesen reduzierte Interaktionswerte mit relativ hoher Standardabweichung auf.

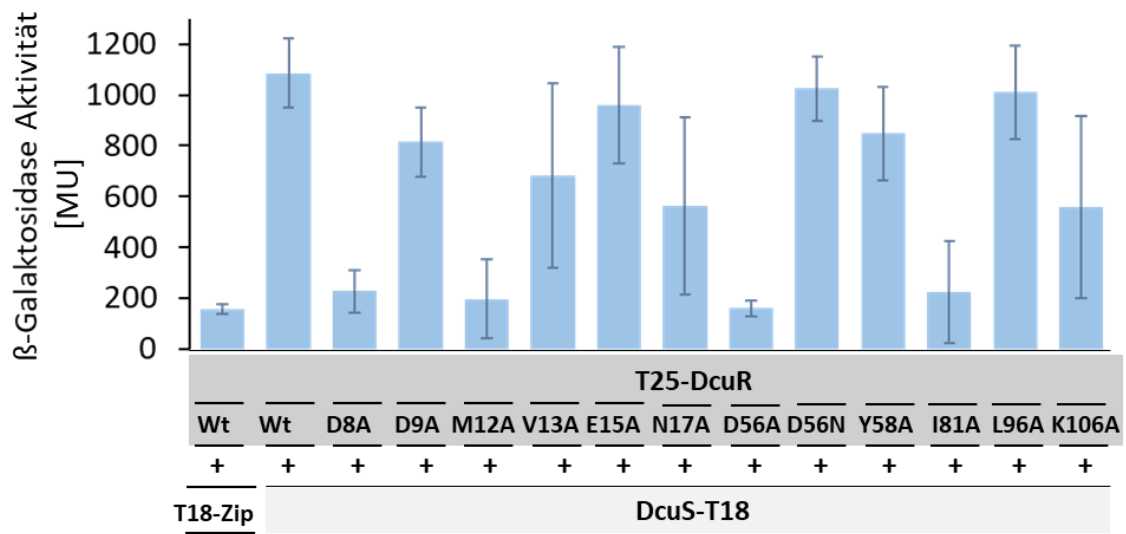


Abb. 31: Interaktion von T25-DcuR Mutanten mit DcuS-T18 im BACTH-Test. Die Plasmide T25-DcuR(pMW427) und DcuS-T18 (pMW428) wurden in BTH101 ko-transformiert. Die Zucht der Bakterien erfolgte aerob in LB-Medium, unter Zusatz von IPTG (0,5 mM). Als Negativkontrolle diente T18-Zip + T25-DcuR. Die Daten sind Mittelwerte von Zuchten aus acht unterschiedlichen Kolonien, von denen jeweils vier Aktivitätsmessungen durchgeführt wurden.

4.3 Das Zusammenspiel der PASC-Kinase x R-Komplexes mit der DNA

Der Antwortregulator DcuR muss zur Genregulation spezifisch an den Promotor regulierter Gene, z.B. *dctA*, *dcuB* oder *frdABC* binden. Bisher hatte man für DcuS und DcuR und andere Zweikomponenten-Systeme angenommen, dass die Interaktion zwischen Sensorkinase und Antwortregulator kurzlebig ist und nur während der Phosphoryl-Übertragung besteht. Die vorhergehenden Versuche (Abschnitt 4.1) hatten gezeigt, dass eine stabile PASC-Kinase x R-Komplex, unabhängig vom Phosphorylierungszustand gebildet wird. Es wird angenommen, dass dieser Komplex auch in Volllänge-DcuS mit DcuR gebildet wird. Wie ist es dann möglich, dass DcuR im Komplex mit dem membranständigen DcuS an die DNA bindet? Bleibt der DcuS x R-Komplex auch bei der Genregulation bestehen? Um dieser Fragen zu beantworten wurden verschiedene Methoden (EMSA, MST und zelluläre Ko-Lokalisation) eingesetzt.

4.3.1 DNA-Bindungsstudien

Es wurde bereits gezeigt, dass das Zweikomponenten-System DcuSR die Expression von mehr als 39 Genen kontrolliert (Yamamoto *et al.*, 2005) und dass DcuR spezifisch an den Promotorbereich von *dctA*, *frdABC*, *dcuB* und *fumB* bindet (Janausch *et al.*, 2004; Abo-Amer *et al.*, 2004;). Die Bindung von DcuR an den *dcuB*-Promotor ist gut untersucht. Das *dcuB* Gen hat zwei Promotorregionen, der erste Promotorbereich (p1) liegt im Bereich + 24 bis – 327 bp und wird durch NarL, Fnr und Crp reguliert. Vorgeschaltet liegt p2 (- 518 bis – 318 bp), an welchem DcuR spezifisch bindet. Der gesamte intergene Bereich zwischen *dcuR* und *dcuB* ist schematisch in Abb. 32 A dargestellt (EcoCyc; Abo-Amer *et al.*, 2004). Es wurden drei unterschiedlich lange Bereiche dieser Intergenregion amplifiziert, um zu testen, welcher sich am besten für die Bindungsstudien eignet. Alle drei Fragmente beinhalten den p2 *dcuB* Promotor Bereich (in dem Schema grün markiert mit der annotierten Tandem-Sequenz) an welchem DcuR spezifisch bindet (Janausch *et al.*, 2004; Abo-Amer *et al.*, 2004). Um die Bindung von DcuR an den drei Promotorbereichen zu testen, wurden diese in Plasmiden kloniert (Abschnitt 3.2.2), mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. DcuR (6 µM) wurde mit 50 mM Carbamoylphosphat für 1 Stunde phosphoryliert und dann mit 2,5 nM Promotor-DNA inkubiert (Abb.: 32 B). Das Gemisch wurde in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgetrennt. Die Trennung erfolgt anhand der DNA-Größe und DNA-Ladung. Die DNA-Gele wurden mit SYBR-Green gefärbt und die DNA-Banden wurden mit UV-Licht detektiert.

Zuerst sollte die Bindung von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem DcuR an *dcuBp1* (links), *dcuBp2* (mittig) und *dcuBp3* (rechts) untersucht werden (Abb.: 33). Die drei freien, nicht-gebundenen DNA-Fragmente (*dcuBp1*, *dcuBp2* und *dcuBp3*) wanderten in den Polyacrylamidgel mit ~100 bp höher als in 1 %-igen Agarosegelen. Der Anteil an nicht-gebundenem, freiem Promotor unterscheidet sich zwischen DcuR und DcuR-P und den unterschiedlichen Promotor-Kombinationen. So bindet DcuR und DcuR-P fast alles des *dcuBp1* Promotors (2,4 nM) in drei verschiedenen Retentionsformen.

Die Bindung von DcuR an *dcuBp1* in den Polyacrylamidgele war am deutlichsten zu sehen. Sowohl der DcuR-*dcuBp2* als auch der DcuR-*dcuBp3* Komplex sind zu erkennen, dennoch sind starke Verschmierungen zu erkennen, was die Auswertung und Aussage erschwerten. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente *dcuBp1* verwendet. Das Protein-DNA (DcuR-*dcuBp1*) Komplex weist drei unterschiedlichen Retentionsgrößen auf.

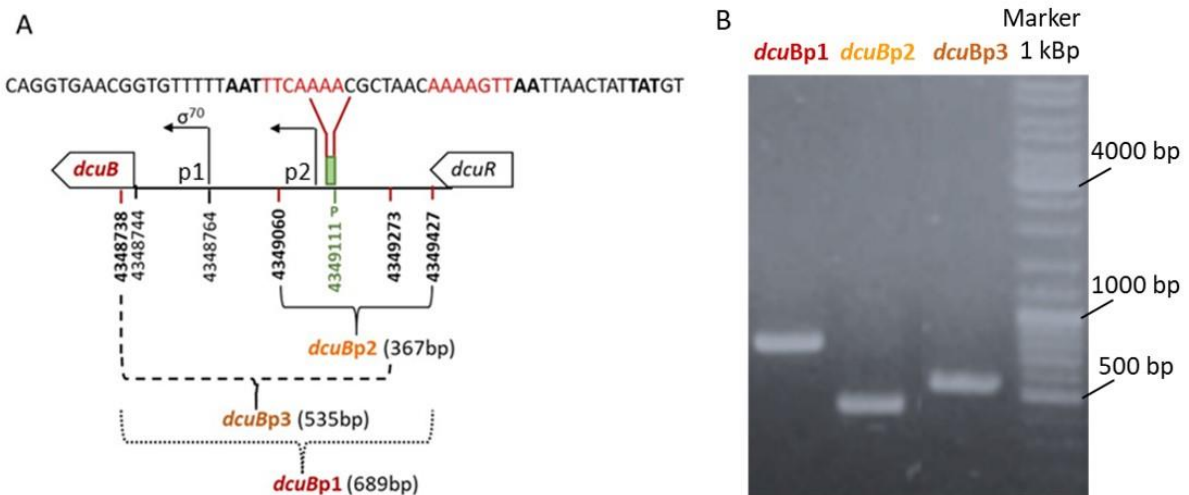


Abb. 32: Schematischer Aufbau des Intergene *dcuR*-*dcuB* DNA-Bereich und Kontroll-PCR der erstellten Plasmide. (A) Schematischer Aufbau des intergenen Bereiches zwischen *dcuR* und *dcuB*. Alle drei Fragmente beinhalten den *dcuB*-Promotor-Bereich (grün markiert mit annotierten Tandem-Sequenz oberhalb im Bild) an welchem DcuR spezifisch bindet (Janausch *et al.*, 2004; Abo-Amer *et al.*, 2004). Die zwei Promotor-Bereiche von *dcuB* (p1 und p2) sowie die Position in Genom (siebenstellige Zahl) sind angegeben. (B) Kontroll-PCR der drei konstruierten Plasmide. Nach der PCR wurden die Proben in 1 %-igem Agarose Gel beladen und mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt: pMW2926 (trägt den *dcuBp1* Insert mit der Größe von 689 bp), pMW2927 (trägt den *dcuBp2* Insert mit der Größe von 367 bp) und pMW2928 (trägt den *dcuBp3* Insert mit der Größe von 535 bp).

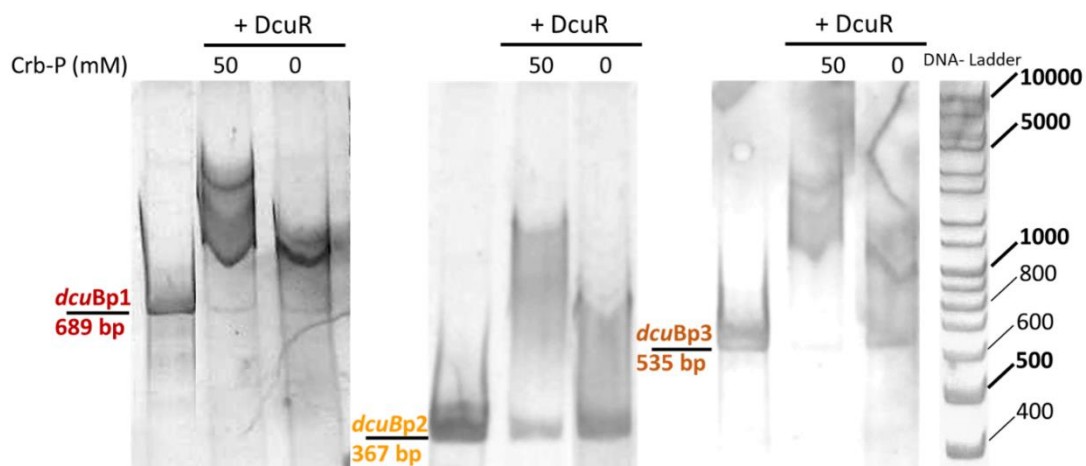


Abb. 33: DNA-Gelmobilität Studie zwischen DcuR und den Promotoren *dcuBp1*, *dcuBp2* und *dcuBp3*. Vor dem Test wurden DcuR (6 μ M) mit 50 mM Crb-P in Phosphorylierungspuffer für 1 Stunde phosphoryliert. Anschließend wurde sowohl DcuR als auch DcuR-P mit 2,5 nM *dcuBp* in 1-fachem BP-Puffer für 30 Min bei 25 °C inkubiert. Die Proben wurden in nicht-denaturierenden 5 %-igem Polyacrylamidgel in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgetrennt. Die Protein-DNA-Banden wurden mit -UV-Licht detektiert und in ImageJ analysiert. Die Bindung von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem DcuR an *dcuBp1* (links), *dcuBp2* (mitten) und *dcuBp3* (rechts). Als Laufstandards wurden der 1 kbp DNA-Ladder und der Page Ruler™ Prestained (#SM0671) verwendet.

Die Bildung von DcuR-dcuBp1-Komplexen

Phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes DcuR binden an *dcuBp1* und bilden Protein-DNA Retentionskomplexe (C1-C3) (Abb.: 34). Der erste DcuR-*dcuBp1*-Komplex (C1) hat die höchste Mobilität und somit die kleinste Größe. Der Komplex wandert mit der Mobilität entsprechend 1500 bp (DNA). Der zweite Komplex (C2) ist durch eine unscharfe, breite Bande zu erkennen bei einer Mobilität mit der Größe von 2000-2500 bp. Der dritte DcuR-*dcuBp1* Komplex (C3) hat die kleinste Migrationsstrecke mit einer Retentionsgröße von 3000 bp. Die Phosphorylierung hat einen Einfluss auf dem Anteil an die Bildung der verschiedenen Komplexe. So weist phosphoryliertes DcuR mit *dcuBp1* alle drei Retentionskomplexe in unterschiedlichen Verhältnissen auf. Im Vergleich dazu bildet nicht-phosphoryliertes DcuR vorwiegend einen DcuR-*dcuBp1*-Komplex mit der größten Mobilität als C1- und etwa C2-Komplex, aber keinen C3 Komplex. Sowohl das nicht-phosphorylierte als auch das phosphoryliertes DcuR komplexieren nicht vollständig den Promotor, sodass freies, nicht-gebundenes *dcuBp1* zu sehen ist. Abo-Amer (*et al.*, 2004) konnte zeigen, dass die Konzentration an DcuR ausschlaggebend ist, um den Promotor komplett in ein Protein-DNA Komplex zu komplexieren (4 μM an DcuR-P und 16 μM an DcuR reichen aus um 1 nM an den Promotor vollständig zu binden).

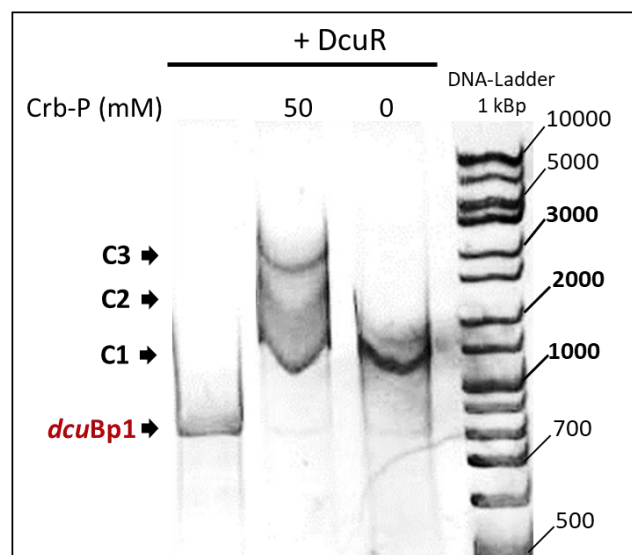


Abb. 34: DNA-Gelmobilität und quantitative Analyse der Komplexbildung zwischen DcuR und DcuR-P mit *dcuBp1*. Die Bindung von DcuR-P an *dcuBp1* wurde bereits durch Abo-Amer (*et al.*, 2004) und Janausch (*et al.*, 2004) nachgewiesen und sowohl DcuR-P (6 μM) als auch DcuR (6 μM) zeigen unterschiedlichen Mobilitätsshifts, die als Protein-DNA-Komplex (C1-C3) zu betrachten sind. Der meiste Anteil an gebundenen *dcuBp1* liegt mit DcuR-P in Komplex C3 und mit DcuR in Komplex C1.

Einfluss der PASC-Kinase auf die Bindung von DcuR an *dcuBp1*

Falls die Bindung von PASC-Kinase an DcuR-*dcuBp1*-Komplexe stattfindet, wird erwartet, dass diese dreifache Interaktion sich in einer Retentionskomplex mit sehr niedriger Mobilität widerspiegeln wird.

Für die Untersuchung wurde 8 μM DcuR (mit oder ohne Acetylphosphat zur Phosphorylierung) mit 4 μM PASC-Kinase (mit und ohne ATP) in Phosphorylierungspuffer inkubiert (Abb.: 35). Anschließend wurde 2,5 nM *dcuBp1* zugesetzt und zur nativen Elektrophorese eingesetzt. Mit nicht-phosphoryliertem DcuR bildet sich vor allem der C2-Komplex; dagegen bildet DcuR-P einen (DcuR-*dcuBp1*)-P-Komplex mit der kleinste Migrationsstrecke (C3). Zusätzliche Anwesenheit der PASC-Kinase führt im Fall von nicht-phosphoryliertem DcuR zu keinen größeren Änderungen, d.h. C2 ist weiterhin der Hauptkomplex, während PASC-Kinase den C3-Komplex der [DcuR-*dcuBp1*]-P-Interaktion verschwinden lässt und im wesentlichen C2 gebildet wird. Phosphorylierte PASC-Kinase verursacht, ähnlich wie nicht-phosphorylierte PASC-Kinase, ein Verschwinden von C3 und eine Bildung von C2. In keinem Fall treten aber größere Mengen an freiem Promotor *dcuBp1* auf.

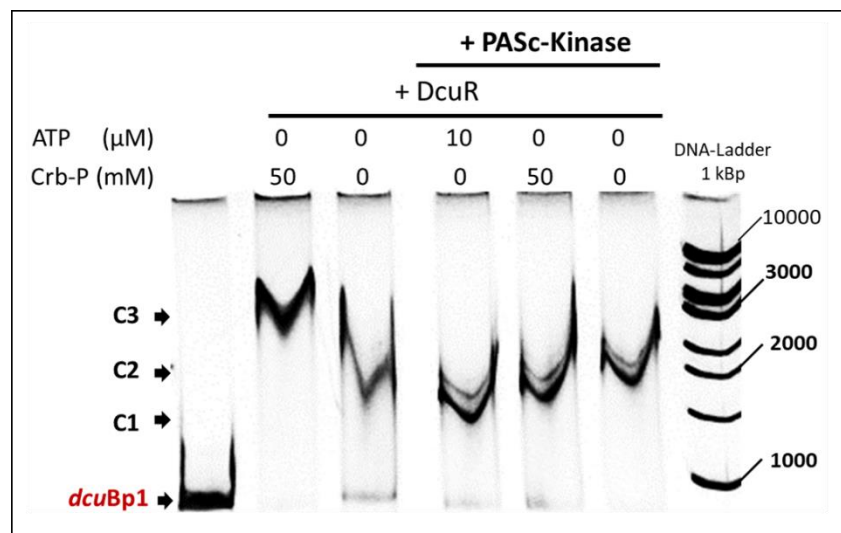


Abb. 35: DNA-Gelmobilität: Einfluss von PASC-Kinase auf die Bildung von DcuR-*dcuBp1* Komplexen. Zu 8 μM DcuR (\pm CrbP) wurde 4 μM PASC-Kinase (\pm ATP) dazugegeben und für 10 Min bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde 2,5 nM *dcuBp1* und BP-Puffer zugesetzt und für weiteren 30 Min bei 37 °C inkubiert. Die Bindung von DcuR an der DNA, bewirkt die Retention des C2 Komplexes und es verbleibt kleine Menge an nicht gebundener Promotor. Wird DcuR-P zu der DNA gegeben, so wird die gesamte DNA in C3 geshiftet. Die Anwesenheit von PASC-Kinase verändert die Retentionsanteile der DcuR-*dcuBp1*-Komplexe.

In einem weiteren Experiment wurde die PASC-Kinase zu dem DcuR-*dcuBp1*- und (DcuR-*dcuBp1*)-P-Komplex in steigende Konzentration zugesetzt (Abb.: 36 A und B). Wie bereits gezeigt, bildet nicht-phosphoryliertes DcuR mit *dcuBp1* vorwiegend den C2-Retentionskomplex. Wird PASC-Kinase in 1:2 Überschuss zum nicht-phosphoryliertem DcuR dazugegeben, wird ein Komplex mit dem Laufverhalten wie C2-Komplex, der dennoch etwas höher liegt, beobachtet. Mit abnehmender Konzentration an PASC-Kinase wird zunehmend der C1-Komplex gebildet. Die bisherigen Versuche wurden mit 8 μM bzw. 6 μM an DcuR durchgeführt. Diese Konzentration reicht aus, um den gesamten 2,5 nM-Promotor *dcuBp1* vollständig in Komplex zu binden. In dem folgenden Versuch wurde die Hälfte, 3 μM DcuR verwendet, was nach der Phosphorylierung zur unvollständigen Bindung von *dcuBp1* in dem Komplex geführt hat. Weniger als die Hälfte von *dcuBp1* migriert als C3-Komplex. Wird PASC-Kinase dazu titriert, verschwindet der C3-Komplex und es wird bis zu einer Konzentration von 0,1 μM an PASC-Kinase vorwiegend der C2-Komplex gebildet. Mit abnehmender Konzentration an PASC-Kinase wird der Anteil an nicht-gebundenem Promotor geringer und bei einer Konzentration an 0,01 μM PASC-Kinase liegt *dcuBp1* vollständig in dem C3 [DcuR-*dcuBp1*]-P-Komplex vor.

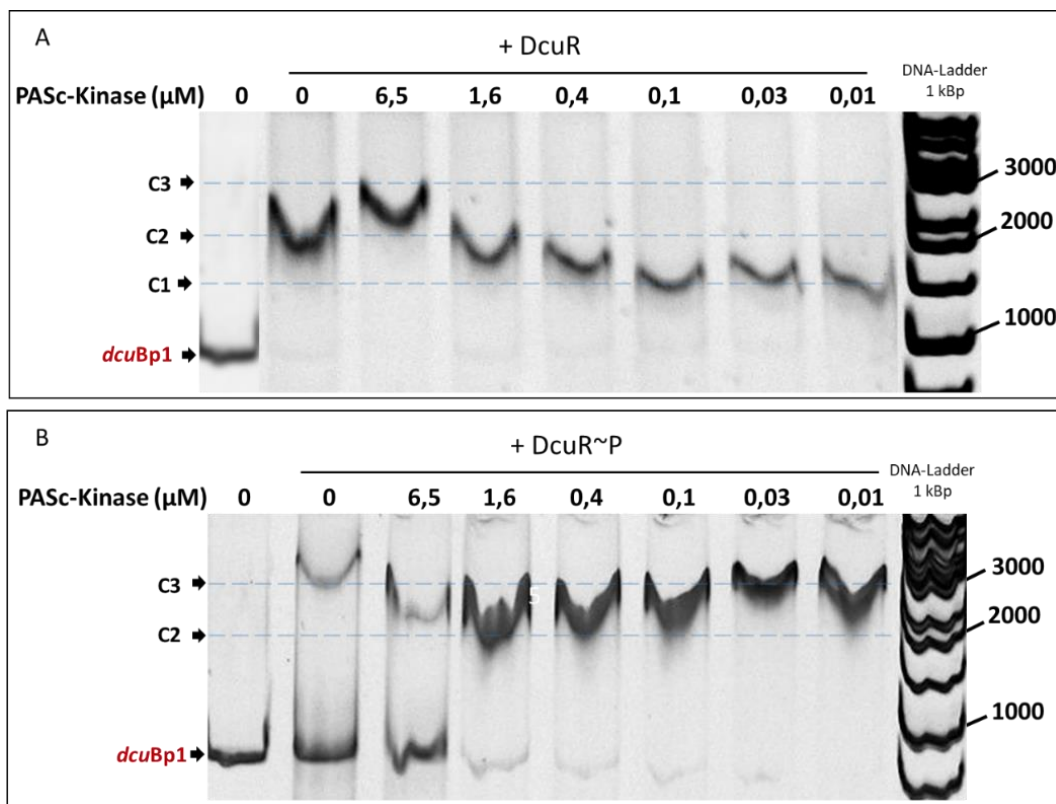


Abb. 36: Titration von PASC-Kinase zum DcuR-*dcuBp1*-Komplexen. Zu 3 μM DcuR (A) oder DcuR-P (B) wurde 2,5 nM *dcuBp1* und BP-Puffer zugesetzt und für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Es wurde PASC-Kinase von 10^{-4} bis 6,5 μM dazu titriert und für weitere 10 Min bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer inkubiert.

4.3.2 Affinität von DcuR für *dcuBp1* und die Rolle von PASC-Kinase auf die Komplexbildung

Anhand von den EMSA-Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die Bindung von DcuR an den Promotor von DcuB auch unabhängig von der Phosphorylierung stattfindet. Dennoch hat die Phosphorylierung einen deutlichen Einfluss auf die Art des Komplexes, der gebildet wird. Die Bindung zwischen dem Antwortregulator und der DNA ist durch drei Komplexe unterschiedlicher Mobilität charakterisiert. Die Affinität dieser Interaktion sollte bestimmt werden. Dies wurde durch Ermittlung der Dissoziationskonstante unter Verwendung des thermophoretischen Prozesses bestimmt.

In den folgenden Auswertungen wurde für die Kurvenanpassung den Bereich des Temperatursprunges (T_J) als auch den Bereich der Thermophorese (T) des Signals und eine 1:1 Bindung zwischen dimerem DcuR und der Promotor-DNA angenommen. Dieses Bindungsmodell arbeitet unter der Annahme einer molekularen Interaktion mit 1:1 Stöchiometrie der Bindungspartner, auch wenn mehr als zwei Bindungspartner in dem Versuch verwendet wurden. Die Daten wurden, wie bereits in Abb. 21 (Abschnitt 4.1.3) erwähnt, normiert und Basislinien-korrigiert mit dem Anfangswert null. Alle Werte sind das Ergebnis der Anfangsfluoreszenz von nicht-gebundenen fluoreszenzmarkiertem Partner (DNA oder Protein) und die Änderung dieser Fluoreszenz (ΔF_{norm}) nach der Bindung zu dem Titranden. Dieser Unterschied in der normierten Fluoreszenz wurden mit dem Faktor 1000 multipliziert und ergeben einen pro Tausend [‰] ΔF_{norm} .

Protein-DNA-Interaktion in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands von DcuR

Die Änderung des Fluoreszenzsignals von *cy5-dcuBp1* in Abhängigkeit von der Konzentration an dazu titriertem eYfp-Linker-DcuR und eYfp-Linker-DcuR-P ist in Abb. 37 zu sehen. In der nicht-gebundenen Form ist die Fluoreszenz von *cy5-dcuBp1* (B^*) gering. In der gebundenen Form, das heißt wenn *cy5-dcuBp1* einen DcuR-*dcuBp1*-Komplex ($R-B^*$) mit dem eYfp-Linker-DcuR gebildet hat, nimmt die Intensität der Fluoreszenz zu. Die Affinität von *cy5-dcuBp1* für eYfp-Linker-DcuR beträgt $K_d = 2,5 \pm 0,3 \text{ nM}$ ($n = 6$, $x = 12-15$) und die Gibbs'sche freie Dissoziationsenergie ΔG_d beträgt $31,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (offene Kreise, rechte Y-Achse). Der Phosphorylierungszustand von eYfp-Linker-DcuR erniedrigt die Komplexstabilität und der Wert der Dissoziationskonstante liegt deutlich höher $10,6 \pm 4,4 \text{ } \mu\text{M}$ ($n = 6$, $x = 12$) und die Gibbs'sche

freie Dissoziationsenergie beträgt $28,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Zudem liegt die Intensität der Fluoreszenz um die Hälfte niedriger, wenn eYfp-Linker-DcuR phosphoryliert in dem Protein-DNA Komplex vorliegt. Die erhaltenen Werte für die Dissoziationskonstante von nicht-phosphoryliertem eYfp-Linker-DcuR zeigten keine deutliche Variation, auch wenn die IR-Intensität verändert wurde (IR = 10 %, 20 % oder 40 %; die Prozentualität gibt an, um wie viel Grad die Probe lokal erhitzt wurde). Im Vergleich dazu, variiert der Kd Werte von phosphorylierter eYfp-Linker-DcuR. Mit steigender Intensität des IR-Lasers nimmt der Kd Wert ab: IR 10 % hat ein berechneten Kd von $15,6 \pm 6 \mu\text{M}$ und IR 40 % hat ein Kd von $8 \pm 1 \mu\text{M}$.

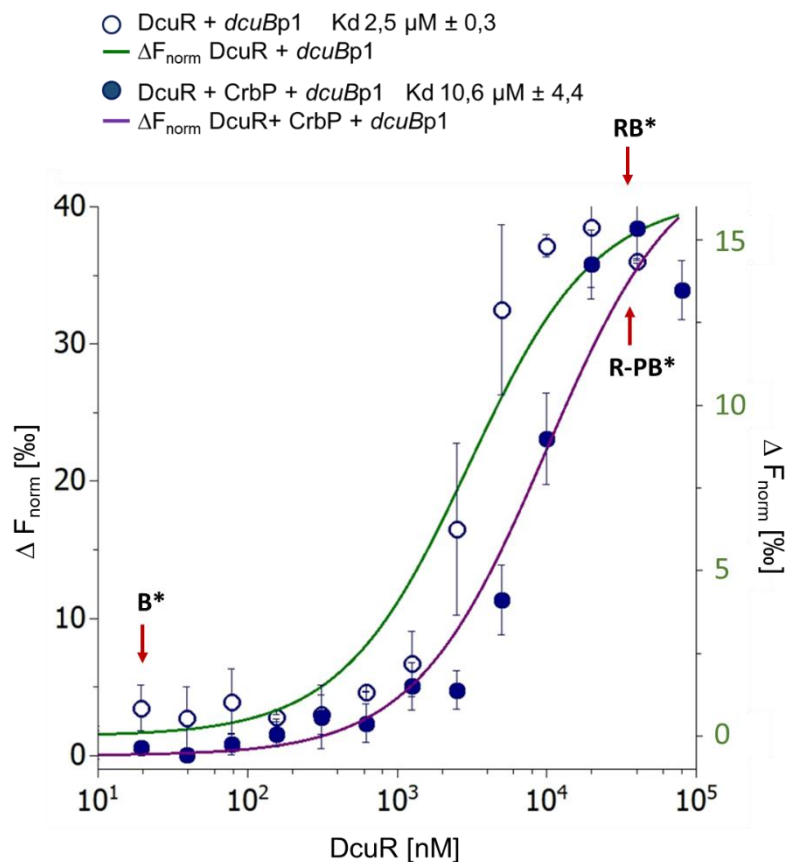


Abb. 37: Protein-DNA-Interaktion in Abhängigkeit des Phosphorylierungszustands von DcuR. Die Phosphorylierung von DcuR erfolgte mit 50 mM Carbamoylphosphat für 1 Stunde bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer. Zu dem konstant gehaltenen, cy5-markiertem Promotor *dcuBp1* (200 nM) wurde von 10^{-2} bis 10^6 nM eYfp-Linker-DcuR (offene Kreise, rechte Y-Achse) oder eYfp-Linker-DcuR-P (geschlossene Kreise, linke Y-Achse) titriert. Die DNA und die Proteine wurden bei 25 °C für 30 Min inkubiert. Die Affinität von *dcuBp1* zur nicht-phosphoryliertem Antwortregulator eYfp-Linker-DcuR beträgt $2561 \pm 393 \text{ nM}$ ($n = 6$, $x = 12-15$) und die Amplitude der Fluoreszenz erreicht nur 15 [%]. In Vergleich dazu beträgt die Affinität zu phosphoryliertem DcuR $10643 \pm 4414 \text{ nM}$ ($n = 6$, $x = 13-15$) mit einer Amplitude von 40 [%].

Affinität von PASC-Kinase für den DcuR-*dcuBp1*-Komplex

Interaktion zwischen mehreren Reaktionspartnern wird als Kooperativität bezeichnet. Wirkt sich die Kooperativität auf den Bindungspartner in einer Erhöhung der Affinität aus, so ist diese Kooperativität positiv. Bei Erniedrigung oder Hemmung der Affinität handelt es sich um negative Kooperativität. Es wird angenommen, dass die Anwesenheit von PASC-Kinase einen Einfluss auf die Interaktion und Affinität zwischen DcuR und *dcuBp1* hat.

Zur Untersuchung wurde zuerst eYfp-Linker-DcuR an *dcuBp1* gebunden. Anschließend wurde zu dem DcuR-*dcuBp1* Komplex (RB*), PASC-Kinase in Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^6 nM titriert und die Bindung wurde über thermophoretische Analyse gemessen (Abb.: 38).

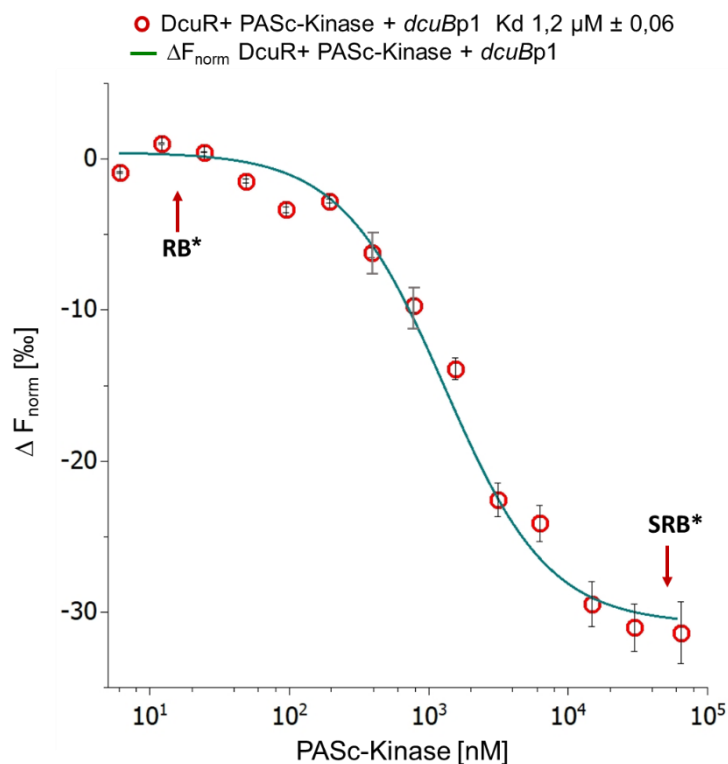


Abb.38: Einfluss von PASC-Kinase auf die Protein-DNA Interaktion (gemessen durch das Signal des Promotors). Zuerst wurde die Bindung von eYfp-linker-DcuR (40 μM) an *dcuBp1* (150 nM) durchgeführt, indem beide Komponenten für 30 Min bei 25 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde zu dem konstant gehaltenen DcuR-*dcuBp1* Komplex (RB*) PASC-Kinase von 10^{-1} bis 10^6 nM titriert und das Gemisch wurde für weitere 30 Min inkubiert. Das Signal der Fluoreszenz wurde über cy5-*dcuBp1* (B*), sowohl angeregt als auch detektiert. Nach der Zugabe von PASC-Kinase zu dem Ansatz nimmt das Fluoreszenzsignal von *dcuBp1* ab und die Affinität von eYfp-Linker-DcuR in dem DcuR-*dcuBp1*-Komplex für PASC-Kinase beträgt 1241 ± 66 nM ($n = 3, x = 14$).

Das Signal der Fluoreszenz wurde über cy5-*dcuBp1* (B*), sowohl angeregt als auch detektiert. Nach der Zugabe von PASC-Kinase zu dem Ansatz nimmt der Fluoreszenzsignal von *dcuBp1* ab und die Affinität des DcuR-*dcuBp1* Komplexes für PASC-Kinase (SRB*) beträgt $1,2 \pm 0,066$ μM und ΔGd beträgt $33,6$ kJ • mol⁻¹.

In einer analogen Versuchsanordnung (Abb.: 39) wurde die Bindung der Komplexkomponenten über die Messung des Signals des Antwortregulators eYfp-Linker-DcuR bestimmt. Sowohl die Anregung der Fluoreszenz als auch die Detektion wurden über eYfp-Linker-DcuR (R*) verfolgt. Die Bindung von PASC-Kinase an den DcuR-*dcuBp1* (R*B)-Komplex zeigt eine Abnahme der anfänglichen Fluoreszenz. Die Affinität der Bindung von PASC-Kinase in diesem Komplex beträgt 78 ± 4 nM und $\Delta G_d = 40,5$ kJ•mol⁻¹.

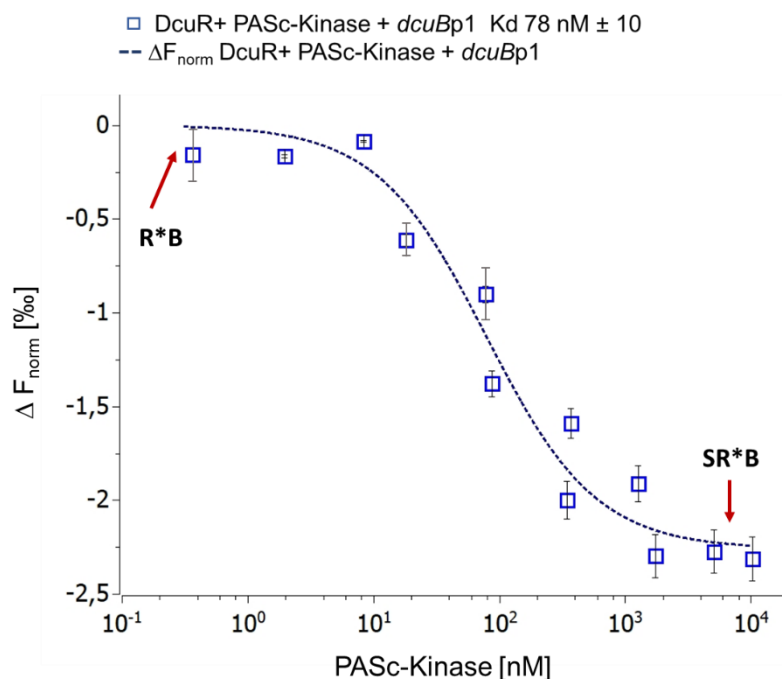


Abb. 39: Einfluss von PASC-Kinase auf die Protein-DNA Interaktion (gemessen durch das Signal des eYfp-Linker-DcuR). Die Bindung von PASC-Kinase an den eYfp-Linker DcuR in dem DcuR-*dcuBp1* (R*B) Komplex wurde über der Fluoreszenz von eYfp-Linker-DcuR (R*) sowohl angeregt als auch detektiert. Die Affinität von eYfp-Linker-DcuR für PASC-Kinase (SR*B) beträgt 78 ± 4 nM ($n = 2$, $x = 10$) und die Fluoreszenz von DcuR nimmt mit zunehmender Konzentration an PASC-Kinase ab.

Bindet PASC-Kinase an DcuR, während dieses noch mit der DNA interagiert, kann dies über Förstertransfer zwischen Fluoreszenz markierter PASC-Kinase und die Fluoreszenz markiertem Promotor verfolgt werden. Weil es keine geeigneten Fluoreszenzpaare in PASC-Kinase und dem Promotor gab, erfolgt der Energietransfer von angeregtem eYfp-Linker-DcuR (R*) über Dipol-Dipol-Kopplung mit dem Akzeptor (cy5-*dcuBp1*) und dieser kann nun seinerseits fluoreszieren [B*] (der mittlere Abstand zwischen Beiden darf nicht > 8 nm überschreiten).

Bindet PASC-Kinase an diesem Komplex, so wird sich dies auf die Emission von *dcuBp1* auswirken, da dieses selbst nur fluoreszieren kann, wenn es an eYfp-Linker-DcuR gebunden ist und die Energieübertragung stattgefunden hat. Zuerst wurde die Probe unter Standardbedingungen mittels IR-Laser 20 % punktuell erhitzt (LED 50 %) wodurch ein niedriger punktueller Temperaturgradient entsteht. Diese Energiezufuhr bewirkte eine Abnahme in der Fluoreszenz von *cy5-dcuBp* (B^*) (Abb.: 40).

Wurde die Probe stärker erhitzt, indem der IR- Laser auf 40 % eingestellt wurde, so änderte sich die Richtung des Signals und die Fluoreszenz von *cy5-dcuBp* nahm zu. Dieser Verlauf des Signals reflektiert möglicherweise zwei Bindungsereignisse. Zu einem ist die Affinität von PASC-Kinase für eYfp-Linker-DcuR in dem Protein-*dcuBp1*-Komplex ($R-B^*$) hoch, $K_d = 505$ nM, wenn der Energiezufuhr niedrig ist. Zum zweiten wird die Affinität von PASC-Kinase für eYfp-Linker-DcuR in dem Protein-DNA Komplex niedriger $K_d = 3,6$ μ M wenn das System einen höheren Energieschub bekommt.

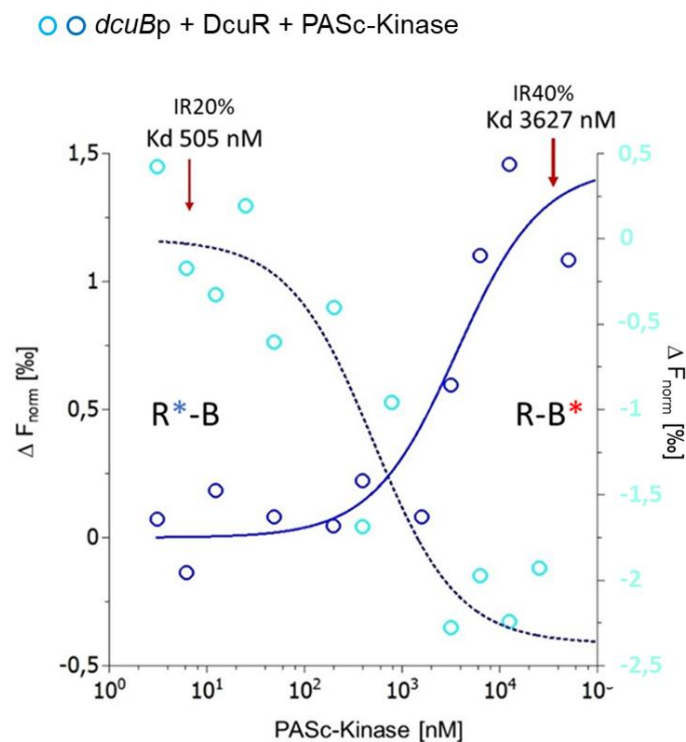


Abb. 40: Einfluss von PASC-Kinase auf die Protein-DNA Interaktion (gemessen durch Förstertransfer von eYfp-Linker-DcuR auf *cy5-dcuBp1*). Die Auswirkung von PASC-Kinase auf die Interaktion zwischen DcuR und *dcuBp1* erfolgte über die Anregung von eYfp-Linker-DcuR (R^*) (IR, blaue Emission, 20 % oder 40 %). Detektiert wurde über *cy5-dcuBp1* (B^*) (IR, rote Fluoreszenz). Die Titration von PASC-Kinase zu eYfp-Linker-DcuR in dem Protein-DNA Komplex ($R-B^*$) zeigte eine hohe Affinität ($K_d = 505$ nM ($n = 1$, $x = 13$)); cyane, offene Kreise; rechte Y-Achse). Werden die Proben, im Vergleich dazu, einer höheren Temperaturgradient ausgesetzt (IR 40 %) nimmt die Intensität der Fluoreszenz zu, aber die Affinität des Protein-DNA Komplexes für die PASC-Kinase wird kleiner ($K_d = 3627$ nM ($n = 1$, $x = 11$)); dunkelblau, offene Kreise; linke Y-Achse).

Einfluss der Phosphorylierung auf der Affinität von DcuR-*dcuBp1* Komplex für PASC-Kinase

In den DNA-Bindungsstudien und bei der Ermittlung der Affinität zwischen eYfp-Linker-DcuR und *dcuBp1* wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung eine wichtige, aber unerwartete Rolle spielt. Während der DNA-Bindungsstudien verursacht die Phosphorylierung von DcuR die Bildung eines C3-Komplexes mit niedriger Stabilität des Protein-DNA-Komplexes (K_d für DcuR-*dcuBp1* < phosphoryliertes DcuR-*dcuBp1*). Dies wirft die Frage auf, ob PASC-Kinase, während DcuR phosphoryliert vorliegt, eine stabilisierende und somit positive Wirkung auf DcuR ausübt, damit die Bindung an dem Promotor stabiler wird, oder bewirkt PASC-Kinase genau das Gegenteil. Um diese Frage zu beantworten, wurde eYfp-Linker-DcuR (40 μ M) mit 50 mM CrbP phosphoryliert und das phosphorylierte eYfp-Linker-DcuR wurde zu *dcuBp1* (150 nM) gegeben. Zu diesem konstant gehaltenen phosphoryliertem DcuR-*dcuBp1*-Komplex R-P]-B* wurde PASC-Kinase titriert. Die Thermophoresis, bedingt durch einen kleinen Temperaturgradienten (IR 20 %), wurde angeregt und detektiert über cy5-*dcuBp1* (B*). Wie in Abb. 41 zu sehen ist, ist das Signal biphasisch und zeichnet sich durch eine V-Form ab. Diese reflektiert möglicherweise zwei Bindungsereignisse, ähnlich wie bei dem Förstertransfer (dort mussten aber die Proben mit hohem IR lokal bestrahlt werden). Einer mit niedriger Affinität S(RB*)-P $K_d = 346 \pm 4$ nM aber einer Zunahme an cy5-*dcuBp1* Fluoreszenz und die anderen mit abnehmender Fluoreszenz (RB*)-P und hoher Affinität $K_d = 39 \pm 5$ nM.

In einer analogen Versuchsanordnung wurde die Bindung der Komplexkomponenten über die Messung des Signals des Antwortregulators eYfp-Linker-DcuR (R*) bestimmt. Sowohl die Anregung der Fluoreszenz als auch die Detektion wurden über eYfp-Linker-DcuR verfolgt, aber dieser befindet sich am Anfang des MST-Versuches bevor das Proteingemisch mit dem IR-Laser angeregt wird, in phosphoryliertem Zustand, an der DNA gebunden (R*B)-P. Die Bindung von PASC-Kinase an den eYfp-Linker DcuR in dem (DcuR-*dcuBp1*)-P Komplex zeichnet sich durch die starke Abnahme der Fluoreszenz von R* und eine Affinität ab ($K_d = 1,5 \pm 0,075$ μ M)

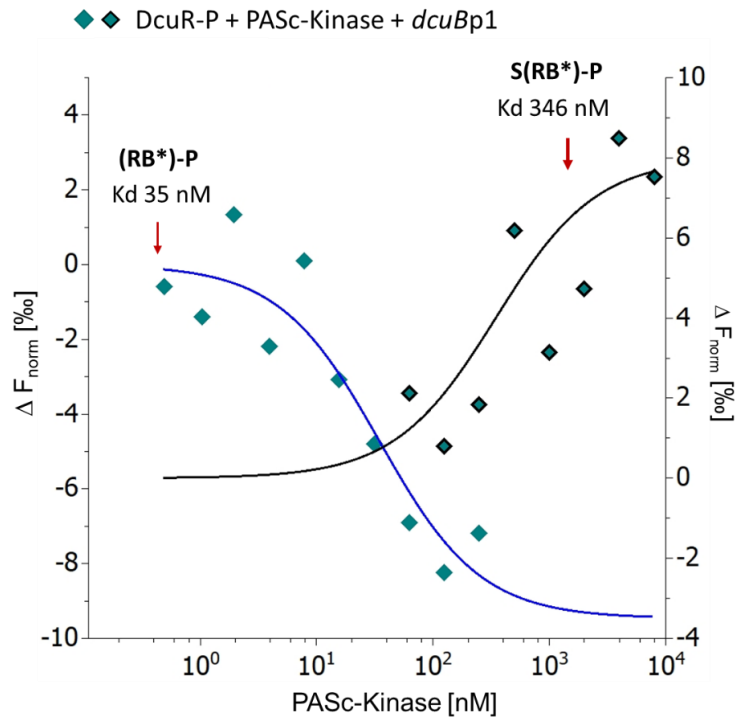


Abb. 41: Einfluss von PASC-Kinase auf die Protein-DNA Interaktion, während eYfp-Linker DcuR phosphoryliert vorliegt (gemessen durch das Signal des Promotors). Das Fluoreszenzsignal wurde über *cy5-dcuBp1* (B^*) sowohl angeregt als auch detektiert. Zuerst wurde die Bindung von phosphoryliertem eYfp-Linker-DcuR ($40 \mu\text{M}$) an *dcuBp1* (150 nM) durchgeführt, indem nach der Phosphorylierung von DcuR mit 50 mM CrbP (für 1 Stunde bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ in Phosphorylierungspuffer) das Gemisch für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde zu dem konstant gehaltenen DcuR-P-*dcuBp1*-Komplex (RB*)-P, PASC-Kinase von 10^{-1} bis 10^6 nM und das Gemisch wurde für weitere 30 Min inkubiert. Die Titration von PASC-Kinase zu (RB*)-P bewirkt zuerst die Abnahme in der Fluoreszenz von B^* , aber ab einer Konzentration an PASC-Kinase $> 10^2 \text{ nM}$ nimmt die Fluoreszenz von B^* wieder zu und erreicht fast die Ausgangsintensität. Das biphasische Signal reflektiert möglicherweise zwei Bindungsereignisse: eines mit niedriger Affinität ($K_d = 346 \pm 4 \text{ nM}$ ($n = 2$, $x = 9$), grüne Rauten; linke Y-Achse) und eines mit hoher Affinität ($K_d = 35 \pm 5 \text{ nM}$ ($n = 2$, $x = 10$), schwarz-grüne Rauten; rechte Y-Achse).

4.3.3 Thermische Stabilität der Komplexpartner und dem Komplex

Allein Strukturdaten oder biophysikalische Eigenschaften der Proteine sind nicht ausreichend, um die Komplexität einer transienten oder permanenten Interaktion zwischen mehreren Partnern zu verstehen. Faltungsdaten sowie Daten über die Dynamik des Zusammenbaus von transienten und stabilen Komplexen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen oder Umgebungen können helfen, einen Aufschluss über die Natur solcher Komplexe und Interaktionen zu geben.

Das Entfaltungsprofil von nicht-phosphorylierter und phosphorylierter PASC-Kinase und DcuR, sowie des PASC-Kinase x R-Komplexes wurde bereits in Abschnitt 4.1.2. dargelegt und

beschrieben. Nicht-phosphoryliertes DcuR hat nur ein Wendepunkt IP von $49,3 \pm 2$ °C. Wird DcuR phosphoryliert wird der Emissionssignal biphasisch mit einer IP1 bei 45 ± 2 °C und IP2 bei 52 ± 2 °C.

Die Phosphorylierung findet in der REC-Domäne von DcuR (N-terminal gelegen) statt. Diese besitzt ein nach innen gerichtetem Trp120-Rest (vgl. Abb.: 18). Die DNA-Bindedomäne von DcuR ist für die Interaktion mit der DNA wichtig und diese besitzt zwei Trp Reste (Trp170 und Trp201). Diese liegen gemäß der Strukturvorhersage (Abschnitt 4.1.3) der Oberfläche zugewandt. Liegt DcuR in dem DcuR-*dcuBp1*-Komplex vor, so wird ein deutlicher Unterschied zwischen dem Entfaltungsprofil des DcuR und DcuR-*dcuBp1*-Komplex erwartet.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde nicht-phosphoryliertes und phosphoryliertes DcuR mit *dcuBp1* gemeinsam für 30 Min Inkubiert (Abb.: 43). Das thermische Profil des DcuR-*dcuBp1* Komplex zeigt eine leichte umgekehrte sigmoidale Form mit zwei Haupt Wendepunkte. Der erste Übergang zeichnet sich durch eine geringe Abnahme der Trp-Emission IP1 $41,2 \pm 0,9$ °C und darauffolgend der zweite Übergang mit noch stärkerer Abnahme in der Fluoreszenz und ein höheren IP2 51 °C. Wird phosphoryliertes DcuR mit dem Promotor (DcuR-P-*dcuBp1*) inkubiert und der thermischen Denaturierung unterworfen, ist das Emissionssignal biphasisch (wie auch für DcuR-*dcuBp1*) aber mit starker Zunahme an Trp-Fluoreszenz. Beide IP-Übergänge erinnern an das Entfaltungsprofil von DcuR-P, nur dass hier die Übergänge nicht so deutlich voneinander getrennt sind (IP1 bei $43,6 \pm 5$ °C und IP2 bei $52,9$ °C).

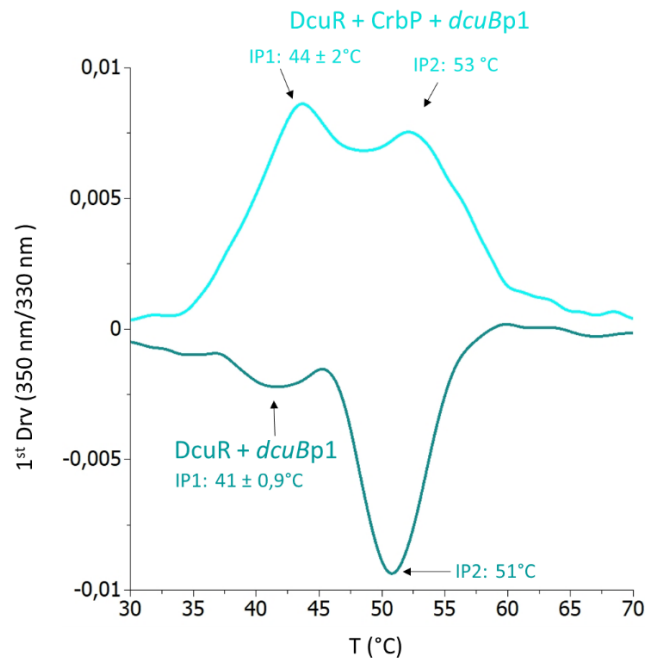


Abb. 43: Entfaltungprofil von DcuR und DcuR-P während der Interaktion mit der DNA. Die Stoffmenge an DcuR betrug $30 \mu M$. Die Phosphorylierung von DcuR erfolgte 1 Stunde mit 50 mM CrbP im Phosphorylierungspuffer. Anschließend wurde zu den Ansätzen 200 nM *dcuBp1* dazugegeben und bei $25^\circ C$ für 30 Min inkubiert. Die thermische Entfaltung wurde mit einer Heizrate und Geschwindigkeitsrate von $2^\circ C/\text{min}$ von $20^\circ C$ auf $90^\circ C$ durchgeführt. Die Fluoreszenz des thermischen Denaturierungsprofils wird die erste Ableitung der $350/330 \text{ nm}$ -Kurve.

In Abb. 44 sind die thermischen Profile des nicht-phosphorylierten DcuR-*dcuBp1* und phosphoryliertem DcuR-*dcuBp1* Komplex, gegenüber dem Ansatz mit DcuR-*dcuBp1* Komplex und der PASC-Kinase dargestellt. Die Entfaltung des Komplexes in der Anwesenheit von der PASC-Kinase ist durch zwei Wendepunkte gekennzeichnet. Die erste Transition liegt leicht positiv in der Trp-Fluoreszenz, über dem ersten IP von DcuR-*dcuBp1* aber rot verschoben (τ_1 $45^\circ C$). Die zweite Transition ist negativ in der Fluoreszenz, aber nur um die Hälfte in der Intensität reduziert und der Gipfel liegt bei $51^\circ C$.

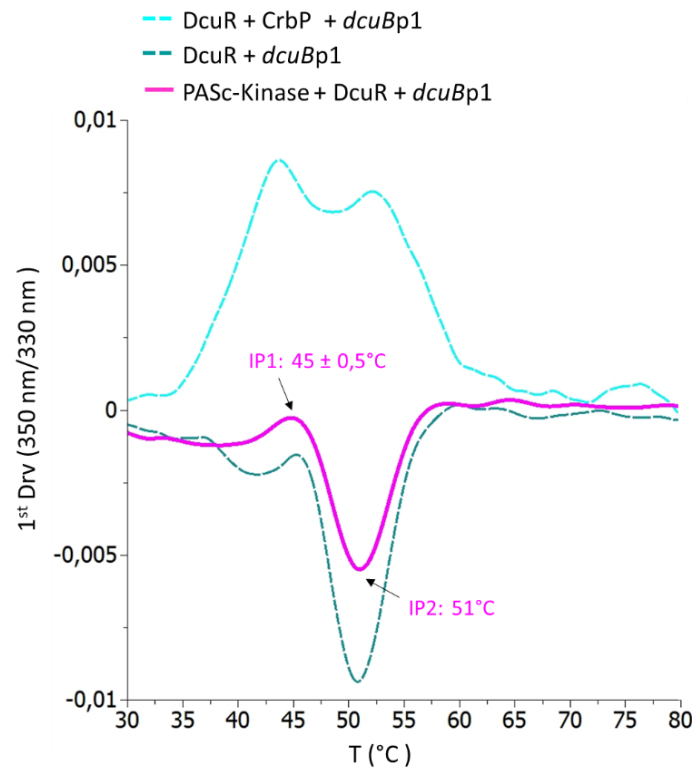


Abb. 44: Entfaltungprofil von DcuR-*dcuBp* mit PASC-Kinase. Zu den 30 μ M DcuR wurde 200 nM *dcuBp1* dazugegeben und bei 25 °C für 30 Min inkubiert. Anschließend wurde 30 μ M PASC-Kinase zum Ansatz hinzugefügt und für weiteren 30 Min inkubiert. Die erste Ableitung der 350/330 nm-Kurve von PASC-Kinase + DcuR + *dcuBp1* (lila) zeigt zwei Transitionen (τ). Thermische Entfaltungprofile von phosphoryliertem (cyan) und nicht-phosphoryliertem (grün) DcuR-*dcuBp* Komplex.

4.3.4 *In vivo* Ko-Lokalisation von DcuS-DcuR und *dcuBp1*

Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen können gleichzeitig in einer Zelle existieren. Die Stabilität und Ausbildung dieser Super-Komplexe hängen sehr stark von den physiologischen Bedingungen ab. Eine Interaktion kann *in vivo* hauptsächlich transient sein, aber unter bestimmten zellulären Bedingungen permanent werden (Nooren *et al.*, 2003). Die bisherigen Experimente lassen vermuten, dass DcuS-DcuR einen großen Komplex bestehend aus Transporter (DctA oder DcuB), dem ZKs und der DNA bildet.

Die Komplexbildung zwischen dem Transporter DctA und DcuS *in vivo* wurde bereits durch Scheu (*et al.* 2014) gezeigt. Um einen Komplex aus DcuS, DcuR und *dcuBp1* *in vivo* durch Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen, wurde das Plasmid pMW3026 erstellt (Witan *et al.*, 2012; Scheu *et al.*, 2014; Wernet, 2019). Dieses kodiert für die Proteinfusion LacI-ECFP. Zusätzlich trägt das Plasmid eine Bindestelle für DcuR, den Promotor *dcuBp1*. Dieser ist an eine symmetrische Lac-Operatorsequenz fusioniert, an die LacI-ECFP binden soll. DcuS ist bevorzugt an den Zellpolen lokalisiert (Scheu *et al.*, 2010; Scheu *et al.*, 2014). Aufgrund der Komplexbildung mit DcuS ko-lokalisiert DcuR in der Zelle bevorzugt mit den DcuS-Clustern an der Membran oder nahe dem Zellpol (Scheu *et al.*, 2014; Witan *et al.*, 2012). Wird ein Komplex aus DcuS-DcuR und dem Promotor *dcuBp1* gebildet, so sollte auch der Promotor (visualisiert durch LacI-eCFP) an den Zellpolen oder an der Zellmembran zu erwarten sein.

Erste Versuche zu diesem experimentellen Ansatz sind in Abb. 45 gezeigt. LacI-ECFP und *dcuBp1* (fusioniert an die Lac-Operatorsequenz) wurde mit Plasmid pMW3026 in Stämme transferiert, die eine *dcuR*-Deletion (IMW205) oder eine *dcuS*-Deletion (IMW262) tragen. Beide Stämme tragen zusätzlich eine *lacIZ* Deletion. Diese Deletion soll verhindern, dass LacI-ECFP an die genomischen Operatoren der Lac-Gene bindet. In Abb. 45 (A) ist die Fluoreszenzmikroskopie der Stämme dargestellt. Wird das Plasmid pMW3026 (LacI-ECFP; *dcuBp1*) in IMW262 ($\Delta dcuS$) exprimiert so ist LacI-ECFP zytosolisch über die Zelle verteilt. Aufgrund der Deletion von DcuS liegen sowohl DcuR als auch LacI-ECFP-*dcuBp1* zytoplasmatisch vor. Wurde der Stamm mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW1390) komplementiert (Abb.: 45 B), so sind Cluster von LacI-ECFP vorwiegend zytosolisch aber auch in der Membran (45 %) in den Zellen zu sehen. In der Anwesenheit von DcuS ist das LacI-ECFP, wie es für ein DcuS x R-*dcuBp1*Dreifach-Komplex zu erwarten ist, in Cluster in der Zellmembran lokalisiert. Das LacI-ECFP tragendes Plasmid wurde in einem $\Delta dcuR$ Stamm IMW205 transformiert (Abb.: 45 C). In der Abwesenheit von DcuR wurden für 15 % der Zellen Cluster

von LacI-ECFP zytosolisch lokalisiert. Dennoch liegt in der Abwesenheit von DcuR LacI-ECFP ungeordnet in dem Zytoplasma vor.

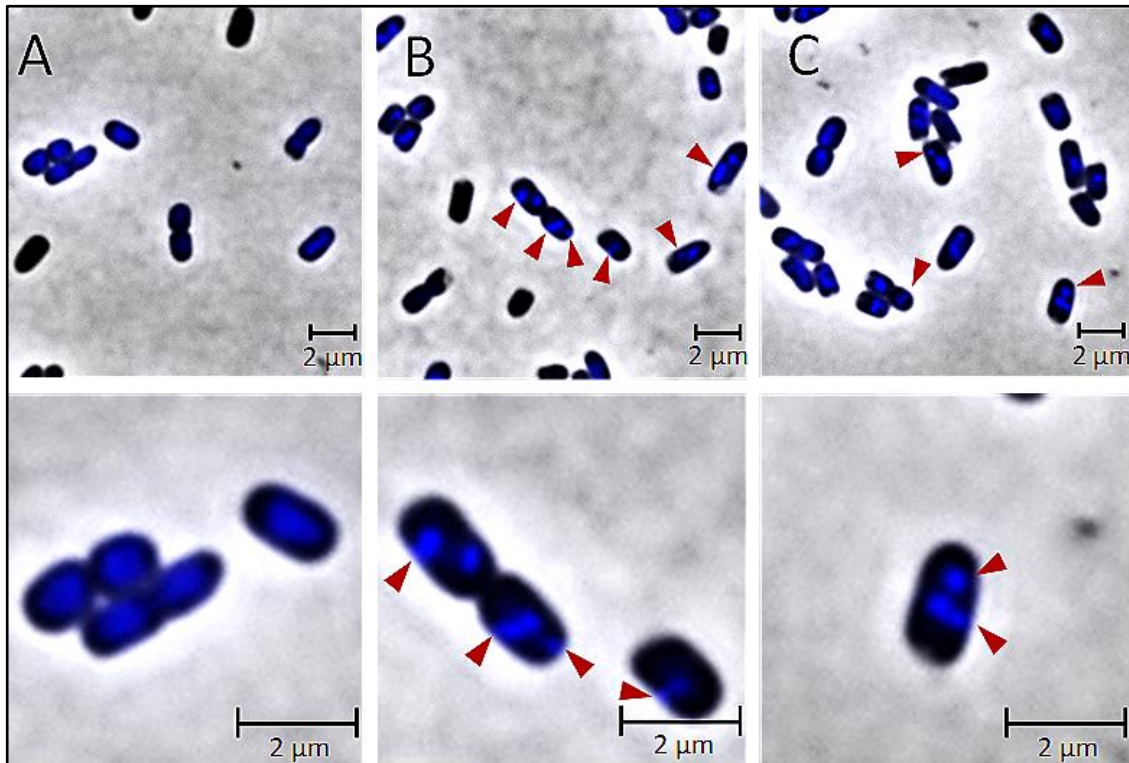


Abb. 45: *In vivo* Fluoreszenzmikroskopie der Interaktion zwischen DcuS, DcuR und *dcuBp1*. Es wurde das LacI-ECFP Expressionsplasmid pMW3026 in *E. coli* transformiert. Dieses trägt die Fusion der Promotorsequenz von *dcuBp1* mit einer symmetrischen Lac-Operatorstelle. An letztere soll LacI-ECFP binden um die Lokalisation von *dcuBp1* in der Zelle zu detektieren. (A) *E. coli* IMW262 ($\Delta dcuS$) mit pMW3026. (B) *E. coli* IMW262 ($\Delta dcuS$) komplementiert mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW1390) und pMW3026; (C) *E. coli* IMW205 ($\Delta dcuR$) mit pMW3026.

5. Diskussion

5.1 Der DcuS (PASC-Kinase) x DcuR - Komplex und die Rolle der Phosphorylierung

Die Prokaryoten nutzen zur Reizaufnahme und -verarbeitung am häufigsten Zweikomponenten-Systeme. Im typischen Fall wird für den Phosphoryl-Übertragung, vom Sensor zum AR, eine kurzlebige Interaktion angenommen, die nur der Phosphoryl-Übertragung dient (Podgornaia *et al.*, 2013). Häufig liegt die Sensorkinase in der Membran und der Antwortregulator zytoplasmatisch vor. Zur Spezifität dieser Signalübermittlung, vom Sensor zum AR, wird intensiv geforscht. Wie erfolgt eine spezifische Wechselwirkung zwischen den Komponenten der ZKS?

Casino (*et al.*, 2009) konnten als erster die Kristallstruktur von einem ZKS-Komplex, HK853-RR468 von *T. maritima*, bestehend aus dem zytoplasmatischen Teil der Histidinkinase HK853 und dem Antwortregulator RR468, aufklären. Für die Strukturaufklärung wurden sowohl nicht-phosphorylierte SHK und AR als auch phosphorylierter AR verwendet. Damit konnten ebenfalls die spezifischen AS ermittelt werden, die an der Interaktion der Proteine und der Phosphoryl-Übertragung beteiligt sind (Casino *et al.*, 2007; Casino *et al.*, 2009; Podgornaia *et al.*, 2013 b). Diese Untersuchungen zeigen, dass in diesem ZKS die Interaktion zwischen SHK und AR so stabil sind, dass ein isolierbarer Ko-Komplex erhalten werden kann.

Erste Hinweise für eine mögliche Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR ergaben die Versuche, die eine Rekrutierung von DcuR durch DcuS an den Zellpolen zeigten (Scheu *et al.*, 2014). Die Rolle der Rekrutierung besteht möglicherweise darin, die diffusionslimitierte (Erstbegegnungs-) Rate des zytoplasmatischen Partner mit dem membrangebundenen Partner und dadurch die Anzahl der aktiven Komplexe zu erhöhen.

Die räumliche Organisation von Komplex-Komponenten ist also für die effektive Kontrolle der Aktivität entscheidend (Kholodenko *et al.*, 2000; Kholodenko *et al.*, 2006).

Nach diesen anfänglichen Hinweisen *in vivo* wurde hier die Frage der Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR *in vitro* untersucht, und ob die Phosphorylierung oder der Phosphoryltransfer die Komplexbildung beeinflussen.

Für die Untersuchungen wurde gereinigtes DcuR und das PASC-Kinase-Fragment von DcuS verwendet, weil isoliertes Volllänge-DcuS nur in Lipidmembran aktiv und phosphorylierbar ist. Da PASC-Kinase alle zytosolischen Domänen von DcuS enthält, wird angenommen, dass die Komplexbildung mit DcuR, durch die Abwesenheit der PASp, TM1 und TM2 nicht gestört ist. Dieser Annahme zur Folge, werden die hier vorgestellten Ergebnisse der Komplexbildung zwischen PASC-Kinase und DcuR auch auf das Volllänge-DcuS Protein übertragen. In Abb. 46 sind DcuR, PASC-Kinase und Volllänge-DcuS schematisch dargestellt. Diese vereinfachte Darstellung, wird für die in diesem Kapitel vorgestellten Modelle verwendet.

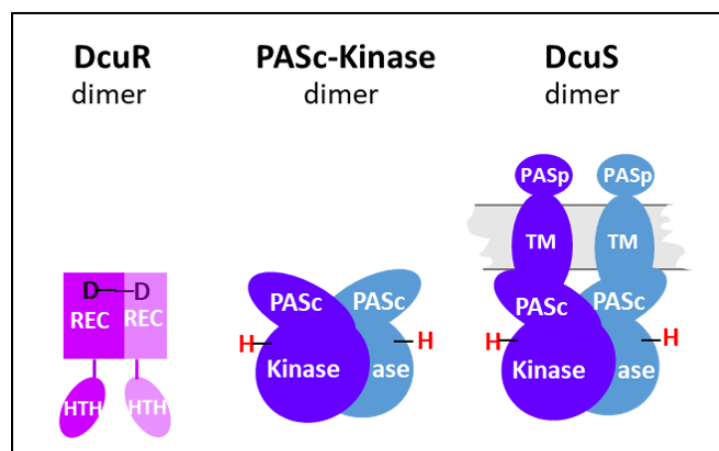


Abb. 46: Schematische Darstellung von DcuR, PASC-Kinase und DcuS. DcuR abgebildet als homodimer, mit dem Asp56-Reste in der REC-Domäne, an welchem die Phosphorylierung stattfindet und die DNA-Bindedomäne. PASC-Kinase abgebildet als homodimer, zusammengesetzt aus der N-terminalen PASC- und dem C-terminalen Kinasekern. Der Kinasekern mit der DHP- und KA-Domäne wurde als ein Element abgebildet. Volllänge-DcuS ist integriert in der Membran abgebildet, mit der PASp- und beiden TM-Domänen zusätzlich zu der PASC- und Kinasedomäne.

5.1.1 Charakterisierung von PASC-Kinase

Alle ZKS übermitteln Informationen durch Phosphoryl-Übertragung von einer SK zu einem AR (Batchelor & Goulian, 2003). Die biochemische Funktionalität des Kinasekerns und somit die Fähigkeit zur Phosphorylierung, ist abhängig von der Homo-Dimerisierung in der DHP-Domäne (Wolanin *et al.*, 2002). PASC-Kinase ist Homodimer mit der Masse von Mr 84 kDa. Die Phosphorylierung von PASC-Kinase verursacht einen apparenten Anstieg des Mr von 16 kDa auf 100 kDa im SEC-Experiment zur Folge. Dieser Anstieg sollte durch Konformationsänderungen oder Ladungseffekte verursacht sein und kann nicht durch die Massenzunahme durch die Phosphatgruppe (0,5 kDa) erklärt werden.

Die aromatischen Seitenketten der AS Trp, Tyr und Phe haben die intrinsische Eigenschaft der Fluoreszenz und sind in den meisten Proteinen anzutreffen. Tyr und Phe besitzen im Vergleich zu Trp einen niedrigen Extinktionskoeffizient und eine Quantenausbeute (Royer *et al.*, 2006). Die Indol-Gruppe von Trp dagegen gilt als die dominierende Quelle der UV-Absorption bei 280 nm und bei der UV-Emission bei 330 nm (in nicht-polarer Umgebung) sowie bei 350 nm (in polarer Umgebung). Das Fluoreszenz-Maximum und -Intensität von Trp werden stark von der Polarität seiner Umgebung, der Wasserstoffbindung und anderen nicht-kovalente Wechselwirkungen beeinflusst (Ghisaidoobe *et al.*, 2014). Wenn die Polarität der Umgebung zunimmt, wird eine Rotverschiebung (zu 350 nm) des Emissionsprofil beobachtet (Enrike, 2010). PASC-Kinase besitzt drei Trp-Reste. Die PASC-Domäne (AS 212-323) besitzt einen Trp273-Rest, welcher nach innen gerichtet ist. Die Kinase-Domäne (AS 344-538) beherbergt die restlichen zwei Trp-Reste (Trp468 und Trp536). Die Entfaltungsprofile von nicht-phosphorylierter und phosphorylierter PASC-Kinase (Abschnitt 4.1.2, Abb.: 17) zeigen eine umgekehrte Sigmoidale Kurve, mit zwei getrennten Phasenübergängen. Dieses biphasische Entfaltungsprofil korreliert mit der Anzahl an Domänen, die sich mit steigender Temperatur nacheinander entfalten. Der erste kleine Übergang bei 37°C ist mit einer Verschiebung des Emissionsspektrums von 330 nm zu 350 nm gekennzeichnet. Verantwortlich dafür ist vermutlich die Verlagerung des Trp273-Restes nach außen durch die Entfaltung der PASC-Domäne. Der zweite Phasenübergang stellt wahrscheinlich das Entfaltungsprofil des Kinasekerns dar. Die zwei Trp-Reste sind bereits nach außen gerichtet und sind der polaren Umgebung zugewandt. Dies zeigt sich in einer Blauverschiebung des Emissionsspektrums, in welcher die anfänglichen Emission bei 350 nm während dem Phasenübergang zu 330 nm verschoben wird (einzelnen Emissionen bei 330 nm und 350 nm gegeneinander graphisch dargestellt: Abschnitt 7.6, Abb.: A0).

Die Phosphorylierung wirkt stabilisierend auf die PASC-Kinase. Dieser stabilisierende Effekt ist für die PASC-Domäne kleiner (2,5 °C), als der Effekt auf dem Kinasekern (4,2 °C) in welchem die Autophosphorylierung stattfindet.

Die Autophosphorylierung der PASC-Kinase erfolgt *in vitro* mit einer Anfangsgeschwindigkeit von $r_{V_0} = 218 \text{ \%} \cdot \text{Min}^{-1}$. Sie ist sehr effizient und übertrifft die des rekonstituierten DcuS um den Faktor 89 und um den Faktor 30 in der Geschwindigkeit.

Dieser große Unterschied könnte an der Rekonstitution von DcuS in Liposomen liegen. DcuS orientiert sich in Liposomen mit der kleinen, sensorischen PAsp-Domäne nach innen und der

löslichen Kinase-Domäne zur Außenseite der Liposomen, die dann für ATP zugänglich ist (Janausch *et al.*, 2002). Dennoch kann die gewünschte Orientierung (Inside-Out) der Proteine nicht zu 100 % gesichert werden. Dies könnte sich auf die Phosphorylierungseffizienz auswirken.

Einen zweiten Grund für die langsame Umsatzgeschwindigkeit des Volllänge-DcuS könnte das Fehlen der Transporter DctA bzw. DcuB sein. Die Transporter ko-regulieren DcuS durch Interaktion in der PASC-Domäne. Studien zu der Interaktion zwischen den Transportern und DcuS haben gezeigt, dass das Fehlen der Transporter zu einem aktiven DcuSR-System und somit zur konstitutiven Expression der Zielgene führt, unabhängig von dem Vorhandensein des Induktors Fumarat (Witan, Bauer *et al.*, 2012; Uden *et al.*, 2016).

Um den Effekt von DcuR auf die Phosphorylierung von DcuS bzw. PASC-Kinase zu testen, wurde die DcuRD56N Variante verwendet. Der Asp56 zu Asn-Austausch beeinträchtigt nur die Phosphorylierung von DcuR, aber nicht die Komplexbildung mit DcuS oder die Interaktion mit der DNA. Die Anwesenheit von DcuRD56N, während der Phosphorylierung, stabilisiert die Phosphorylierungsreaktion und erhöht die Effizienz der Phosphorylierung.

5.1.2 Charakterisierung von DcuR

Für AR wird postuliert, dass diese als phosphorylierte Dimere aktiv sind und als solche an der DNA binden, um die Expression von Zielgenen zu regulieren (Kojetin *et al.*, 2003; Galperin *et al.*, 2006; Bourret, 2010; Gao & Stock, 2010). Obwohl eine einzelne Empfängerdomäne als ein binäres Logikelement theoretisch dargestellt wird, dass entweder in phosphoryliertem oder nicht-phosphoryliertem Zustand vorliegt, sind AR nicht als einfache Ein/Aus-Schalter zu behandeln (Ruiz *et al.*, 2008).

AR werden anhand von Domänen in unterschiedliche Klassen zusammengefasst. Laut der Pfam-Database sind 70.000 AR bekannt, welche 1716 unterschiedliche Domäne-Architekturen aufweisen. All diesen ist die REC-Domäne gemeinsam (Galperin, 2010). Viele AR besitzen neben der REC- auch eine DNA-Bindedomäne. Die meisten von ihnen haben bekannte dreidimensionale (3D) Strukturen, mit unterschiedlichen Strukturmotiven und werden aufgrund dessen in Familien zusammengefasst. Die bekanntesten Vertreter, mit vorhandenen Kristallstrukturen, sind derzeit die Familien der DNA-Bindedomäne,

OmpR/PhoB und NarL/FixJ (Galperin, 2006; Galperin, 2010). DcuR besitzt eine CheY-typische REC-Domäne und eine OmpR-typische HTH-DNA-Bindedomäne (InterPro, EMBI-EBI; Pfam).

SEC (Gelfiltration) kann zur direkten Bestimmung der Konformationsänderung in Abhängigkeit von Ligandenbindung verwendet werden (Abschnitt 3.4.1). Diese Methoden eignen sich allerdings am besten für Bindungsreaktionen, die langsame Dissoziationsraten aufweisen, da der Prozess der Trennung schneller sein muss als die Dissoziationsrate der Protein-Liganden-Bindung (Kastritis *et al.*, 2013). Aus der Sequenz wird für monomeres DcuR-His₆ eine Masse von 29 kDa berechnet. In den SEC- Versuchen zeigte sich für DcuR und DcuR-P eine apparente Masse von 23,5 kDa, entsprechend monomerem DcuR. Abo-Amer (*et al.*, 2004) haben jedoch eine Zunahme der app. Masse von DcuR durch Phosphorylierung beschrieben. In dieser Arbeit konnte keine direkte Dimerisierung von DcuR nach der Phosphorylierung gezeigt werden. Die Ursache für das unterschiedliche Verhalten von DcuR im SEC ist unklar.

Eine mögliche Ursache könnte die 3D-Struktur und die Position des Phosphorylrestes im DcuR sein. DcuR besitzt 48,1 % unpolare und 36,3 % polare, geladene Seitenketten. Dieses Verhältnis von unpolar : polar und geladenen AS-Resten könnte zu einer starken Kompaktierung und Vortäuschung eines monomeren Zustands im SEC führen. Die Instabilität von dimeren DcuR stellt eine weitere Möglichkeit dar. Es wäre denkbar, dass phosphoryliertes DcuR die Anwesenheit von DcuS benötigt, um stabile Dimere zu bilden. Entsprechend migriert DcuR, in der Abwesenheit von DcuS als Monomer.

Ein Nachweis der Phosphorylierung von DcuR durch niedermolekulare Phosphor-Donatoren (Crb-P, Ac-P) war auch durch Mn²⁺-Phos-tag™ Affinity SDS-PAGE nicht möglich. Vermutlich verhindert die Lage der Phosphoryl-Gruppe in DcuR eine Interaktion mit dem Phos-tag™. Es könnte aber sein, dass aufgrund von sterisch bedingten Konformation- und Oligomerisationszuständen die Zugänglichkeit für den Phos-tag™ verhindert wird (Henzler-Wildman *et al.*, 2007).

Aus den DNA-Bindungsstudien in EMSA lässt sich aber ableiten, dass isoliertes DcuR aktiv und damit dimer ist.

Als weitere Methode zur Überprüfung der Phosphorylierung von DcuR wurde NanoDSF eingesetzt. Es wird erwartet, dass DcuR und DcuR-P unterschiedliche Entfaltungsprofile

haben, weil die Bindung von Liganden oft unterschiedliche Einflüsse auf die Stabilität und Struktur des Proteins zeigen.

Wie erwartet ist das Entfaltungsprofil von DcuR deutlich von dem von DcuR-P zu unterscheiden (s. Abschnitt 4.1.2, Abb.: 19). In dem nativen Zustand von nicht-phosphoryliertem DcuR, sind die Trp-Reste offenbar nach innen gerichtet, weshalb die Emission bei 330 nm liegt und während der Entfaltung die Emission um 350 nm verschiebt (s. Abschnitt 7.6, Abb.: A0). Sowohl die REC-Domäne als auch die DNA-Bindedomäne denaturieren gleichzeitig mit nur einem Wendepunkt bei $49,3 \pm 2$ °C. Wird DcuR phosphoryliert, wird das Emissionssignal biphasisch. Dies zeigt, dass DcuR und DcuR-P unter verschiedenen Bedingungen denaturieren. Das biphasische Signal korreliert mit der Anzahl an Domänen. Die Entfaltung der Domänen erfolgt nacheinander und die Phosphorylierung stabilisiert vermutlich die REC-Domäne (IP2) und destabilisiert die DNA-Bindedomäne (IP1).

5.1.3 Der DcuS × DcuR-Komplex

SEC-Chromatographie und MST können zur direkten Bestimmung von PPI verwendet werden. Die Affinität der Komplexkomponenten zueinander und somit die Stabilität des Komplexes, wird durch die Dissoziationskonstante (K_d) und die damit verbundenen Gibbs'sche freie Dissoziationsenergie (ΔG_d) ermittelt (Abschnitt 3.4.2 und Abschnitt 4.1.3). Anhand von diesen Parametern, kann zum einem festgestellt werden, ob ein Komplex unter physiologischen Bedingungen gebildet werden kann, dient aber auch zur Eingruppierung der Komplexstabilität. Kastiris (*et al.*, 2013) konnten anhand von Struktur- und Bindungsaffinität-Daten für 144 verschiedene Komplexe eine Korrelation zwischen beiden Parametern (Struktur und Bindungsaffinität) herstellen. Sie unterteilten die PPI in die Kategorien mit hoher ($K_d < 0,1$ nM), mittlerer ($0,1$ nM – 1 μ M) und niedriger ($K_d > 1$ μ M) Bindungsaffinität. Die höchste, in pM Bereich liegende Affinität, besteht zwischen Enzymen und deren Inhibitoren. Die Stabilität von Protein-Protein-Komplexe zeigen zu 63 % eine mittlere Affinität mit der Gibbs'sche freie Dissoziationsenergie von 44 kJ/mol.

Die Kommunikation zwischen DcuS und DcuR erfolgt durch das Übertragen des Phosphorylrestes von der Histidinkinase auf den Responseregulator. Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation und ermöglicht eine dynamische und

allosterische Regulation. Diese Regulation beruht auf das reversible und schnelle Hinzufügen oder Entfernen einer di-anionischen Phosphatgruppe. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des phosphorylierten Proteins, wie Stabilität, Kinetik und Dynamik werden dadurch oft verändert (Nishi *et al.*, 2011). Durch die Ladung des Phosphats-Anions hat die Phosphorylierung Auswirkung auf den Ladungszustand und die Elektrostatik des Proteins. Die Spaltung des γ -Phosphoryl-Restes des ATP setzt 35 kJ/mol an Energie frei (Cohen, 2002; Fuchs, 2007; Homeyer *et al.*, 2007).

Mittels SEC konnte gezeigt werden, dass PASC-Kinase einen Komplex mit DcuR bildet. Die Stabilität des Komplexes in den SEC Versuchen wurde durch die Phosphorylierung verändert. Der PASC-Kinase \times DcuR-Komplex nimmt zwei unterschiedliche Zustände in der SEC-Chromatographie ein.

Nicht-phosphorylierte PASC-Kinase und DcuR bilden einen Komplex von 111 kDa. Dieser setzt sich vermutlich aus einem DcuR-Monomer, gebunden an ein PASC-Kinase-Homodimer (Gehalt an DcuR ist 0,1 mol/mol PASC-Kinase) zusammen. Aufgrund des substöchiometrischen Verhältnisses zwischen der PASC-Kinase und DcuR ist es möglich, dass der Komplex aus homo-dimerem PASC-Kinase und homo-dimerem DcuR besteht, aber während des zweistündigen SEC-Lauf DcuR permanent verloren geht. Dieser nicht-phosphorylierte Komplex ist unter Chromatographie Bedingungen nicht stabil. Mit Hilfe von MST wurde ein Kd-Wert von $114 \pm 5,8$ nM und ein ΔG_d von 39,5 kJ/mol für PASC-Kin \times DcuR bestimmt (Tab.: 6 und Abb.:47 A). Diese Werte entsprechen nach Kastiris (*et al.*, 2013) einem Komplex mittlerer Bindungsaffinität und hoher Bindungsspezifität. Diese Werte sprechen dafür, dass der nicht-phosphorylierte DcuS \times R-Komplex auch unter physiologischen Bedingungen gebildet werden kann und es wird vermutet, dass die Anwesenheit von DcuS die Dimerisierung von DcuR fördert.

Aufgrund der biochemischen und physikalischen Eigenschaften des Phosphoryl-Restes wurden, wie erwartet, deutliche Unterschiede zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten DcuS \times R-Komplexen in SEC- und MST-Versuchen beobachtet. Die Position des Phosphoryl-Restes in dem Komplex ist nicht bekannt. Aus diesem Grund wird im Text und in den Abbildungen der Phosphoryl-Rest bei dem Protein notiert, welcher in der Reaktion phosphoryliert wurde. Wurde DcuR durch Crb-P phosphoryliert, so zeigte die Phosphorylierung eine Auswirkung auf die Bindungsaffinität (Tab.: 6 und Abb.: 47 B). Die

Phosphorylierung von DcuR erhöht die Komplexstabilität um den Faktor 4 und die Gibbs'sche freie Dissoziationsenergie betrug 43 kJ/mol. Dies entspricht einem Anstieg der Dissoziationsenergie um 4,8 kJ/mol. Überraschend migrierte dieser DcuS x DcuR-P-Komplex in den SEC-Versuchen wie ein nicht-phosphorylierter DcuS x DcuR-Komplex mit einem Mr von 111 kDa. Es könnte sein, dass DcuR nach der Phosphorylierung dimerisiert und einen Komplex mit DcuS bildet. Nach der Komplexbildung dephosphoryliert DcuS rasch DcuR und der Komplex zeigt ein gleiches SEC-Profil wie der nicht-phosphorylierte Komplex. Vermutlich agiert DcuS als Phosphatase, da kein ATP für die eigene Phosphorylierung und Phosphoryl-Übertragung zur Verfügung steht. Für diese Interpretation der Daten sprechen auch die Phosphoryl-Übertragungsversuche mit radioaktivem ATP.

Wird DcuR durch Crb-P phosphoryliert, so wandert dieser in SEC-Chromatographie als Monomer. Aus diesem Grund könnte der DcuS x DcuR-P-Komplex aus homo-dimerem PASC-Kinase und homo-dimerem DcuR-P bestehen. Womöglich dissoziiert sowohl der Komplex während der SEC-Chromatographie als auch der Phosphorylrest von DcuR.

Wird PASC-Kinase (durch ATP) phosphoryliert, so hat der PASC-Kinase-P x DcuR-Komplex eine relative Molmasse von 133 kDa und ein molares Verhältnis von 1:1. Das legt nahe, dass vermutlich der Komplex aus homo-dimerem PASC-Kinase-P und homo-dimerem DcuR besteht. Der Komplex ist im phosphorylierten Zustand stabiler und dissoziiert nicht während der 2-stündigen Fraktionierung (Tab.:6 Abb. 47 C). Es könnte sein, dass die Anwesenheit von DcuS die Dimerisierung von DcuR fördert und dass der Phosphoryl-Rest zu den starken Konformationsänderungen und der Stabilisierung des Komplexes führt. Der K_d-Wert des DcuS-P x DcuR-Komplexes wurde nicht bestimmt. Es wird dennoch erwartet, dass der energetische Effekt der ATP-Phosphorylierung die Dissoziationsenergie um mehr als 9,6 kJ/mol im Vergleich zu nicht-phosphoryliertem DcuS x R-Komplex senkt, da der Komplex stabilisiert wird und das Gleichgewicht bei dem assoziierten Komplex vorliegt.

Die thermischen Entfaltungprofile des phosphorylierten und nicht-phosphorylierten DcuS x DcuR-Komplexes zeigten, dass sich die Phosphorylierung auf die Stabilität des Komplexes auswirkt.

Zusammenfassend wurde der Komplex aus DcuS und DcuR, als transienter Komplex mit mittleren Bindungsaffinität, aber starker und spezifischer Interaktion charakterisiert (Nooren & Thornton, 2003). Die kinetischen Parameter der Komplexbildung sind in Tab.: 6

zusammengefasst und diese lassen darauf schließen, dass der Komplex auch unter physiologischen Bedingungen gebildet wird. Die Bildung des transienten Komplexes erfordert einen molekularen Auslöser. Die Phosphorylierung ist ein solcher Auslöser und moduliert die Stärke und Änderung der Bindungsenergie. Die Phosphorylierung von DcuS in dem Komplex löst den Übergang zwischen dem Konformation- und Oligomerisationszustand des Komplexes aus. Vermutlich fördert DcuS die Dimerisierung von DcuR.

Die antreibende Kraft von Interaktionen, ist die lokale Konzentration der Komponenten und die freie Energie des gebildeten Komplexes, im Verhältnis zu alternativen Zuständen. Die mögliche Rolle der Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR unter physiologischen Bedingungen besteht voraussichtlich darin, die Anzahl (oder durchschnittliche Lebensdauer) von der in Nähe der Membran lokalisiertem DcuR zu erhöhen. Dadurch wird auch die Anzahl an DcuS x R-Komplexe erhöht. Dies steigert vermutlich das Ausmaß der Aktivierung von Downstream-Prozessen. Via "Huckepack"-Bindung an einen der Transporter, wird womöglich das konstante Signalniveau (DcuS x R-Komplex stimulierten Grundexpression) durch die zusätzliche Interaktion gesteigert und für die C₄-Dicarbonsäuren sensibilisiert.

Tab.: 6 Biophysikalische Parameter für den DcuS x R-Komplex.

Komplex:	PASc-Kinase x DcuR	PASc-Kinase-P x DcuR	PASc-Kinase x DcuR-P
Mr (kDa)	111	133	111
Kd (nM):	114 ± 5,8	k.A	28 ± 6,5
ΔGd (kJ/mol):	39,5	k.A	43,1

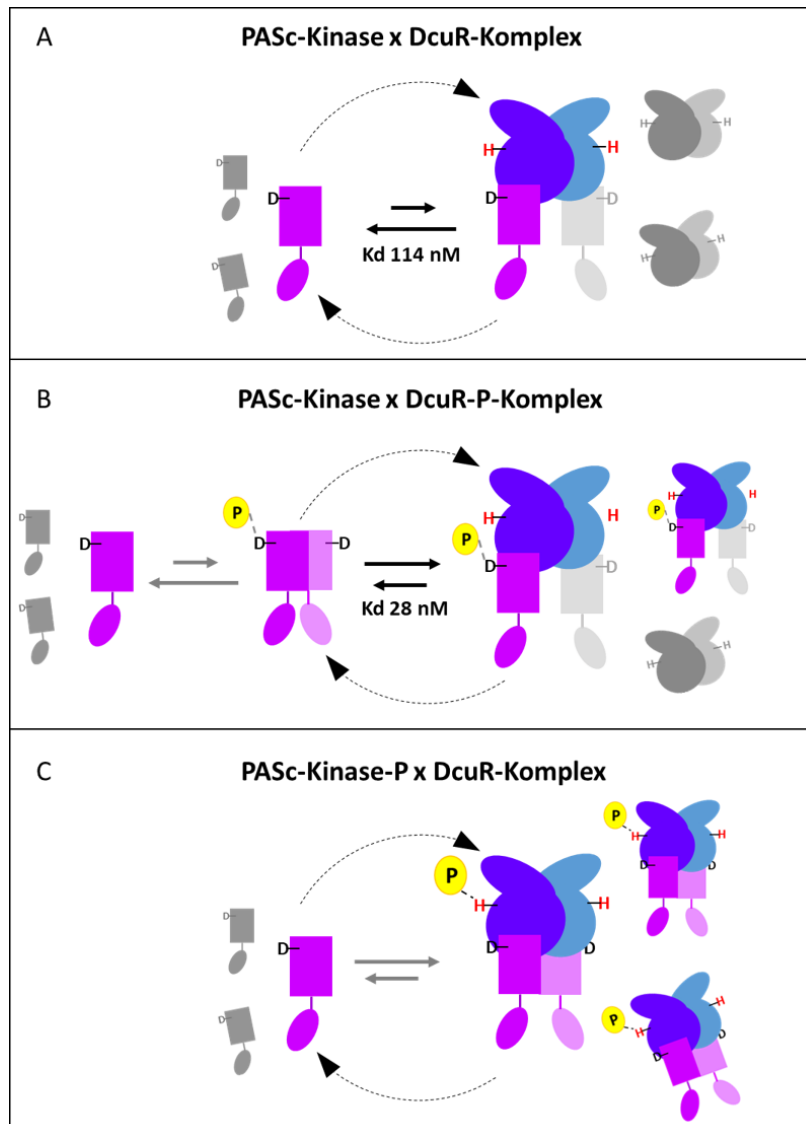


Abb. 47: Modelle des DcuS x R-Komplexes in Abhängigkeit von der Phosphorylierung. Die Position des Phosphoryl-Restes in dem Komplex ist nicht bekannt. Aus diesem Grund wird in dem Modell der Phosphoryl mit gestrichelter Linie dargestellt, gebunden an dem Protein welches in der Reaktion phosphoryliert wurde (A) Der PASc-Kinase x DcuR-Komplex mit der Masse von 111 kDa und einem Kd von 114 nM, setzt sich vermutlich aus einem DcuR-Homodimer, gebunden an ein PASc-Kinase-Homodimer, zusammen. DcuR hat ein substöchiometrische Verhältnisse zu PASc-Kinase in dem DcuS x R-Komplex. (B) Mit CrbP phosphoryliertes DcuR bildet mit PASc-Kinase einen Komplex mit der Größe von 111 kDa und Kd von 28 nM. Fast der gesamte Anteil an DcuR liegt vermutlich als gebundener heterotetramer Komplex vor, welcher unter der SEC-Bedingungen zur Heterotrimer dissoziiert. (C) Wird PASc-Kinase mit ATP phosphoryliert, so hat der DcuS x R-Komplex eine relative Molmasse von 133 kDa. Dieser phosphorylierte Komplex besteht aus einer homo-dimeren PASc-Kinase-P und ein homo-dimeren DcuR.

5.2 Identifizierung von PASC-Kinase- und DcuR-Substitutionen mit Bedeutung für die Komplexbildung

SKs und ihre AR sind in der Lage, sich gegenseitig gezielt zu erkennen (Skerker *et al.*, 2008; Weigt *et al.*, 2008; Vishwanath *et al.*, 2017). Diese Fähigkeit zur molekularen Erkennung, liegt in der Interaktionsoberfläche und den daran beteiligten AS-Resten. Vergleichende Strukturanalysen und MSA-Studien von unterschiedlichen Proteinkomplexen, zeigen ein Muster an definierten und konservierten Sequenzmotiven, innerhalb der PPI-Grenzflächen (Jones *et al.*, 2000; Goncarenco *et al.*, 2014). Solche konservierten Sequenzmotive spiegeln die Existenz charakteristischer Merkmale an Bindungsoberflächen wider (Goncarenco *et al.*, 2014). Die Interaktionsstellen, sowie die Struktur von SK-AR Komplexen wurden bereits für die Zweikomponenten-Systeme HK853-RR468 von *T. maritima*, Spo0B-Spo0F von *B. subtilis*, PhoR-PhoB, CheA-CheY und EnvZ-OmpR von *E. coli* beschrieben (Zapf *et al.*, 2000; Skerker *et al.*, 2008; Casino *et al.*, 2009; Podgornaia *et al.*, 2013). Häufig sind an dem Komplex die AS Thr, Tyr, Asn und Gln beteiligt, die auf der α 1-Helix der DHp-Domäne liegen. Allgemein wird angenommen, dass die ‚Hot-Spot‘ Aminosäurereste, die an der PPI beteiligt sind, unter homologen Proteinen stark konserviert sind. Dies ist aber nicht immer der Fall. In den homologen CheA-CheY-Komplexen von *E. coli* und *T. maritima* unterscheiden sich die an der Komplexbildung beteiligten AS-Reste deutlich. Dies ist überraschend, da das Chemotaxis-TCS CheA-CheY gut konserviert ist und die Affinität der Komplexbildung (*E. coli* = 1,3 μ M; *T. maritima* = 0,2 μ M) und Strukturtopologie ähnlich sind (Park *et al.*, 2004). Durch Sequenz- und Strukturvergleiche wurden mögliche wichtige Reste, beteiligt an dem DcuS x R-Komplex, identifiziert und getestet.

5.2.1 Reste in DcuS mit Bedeutung für die Komplexbildung

Es wurden fünf AS identifiziert, deren Substitution die Aktivität von DcuS (*dcuB-lacZ* Expression) und die Interaktion mit DcuR (gemessen im BACTH-Test und Ko-Lokalisationsstudien) beeinflussen. Die Aktivität von DcuS hängt mit der Interaktion von DcuR zusammen. Die identifizierten AS: Glu350, Asn353, Lys354, Gly360 und Leu361 liegen in der DHp-Domäne von DcuS (Abb.: 48). Diese Domäne und die KA-Domäne werden mit zwei enzymatischen Funktionen assoziiert (Marina *et al.*, 2005). Die erste Funktion ist als

Autokinase- und Phosphotransferaktivität, welcher mit positiver Regulation auf dem AR einhergeht, definiert. Durch die positive Regulation wird der AR phosphoryliert und dieser wird dadurch aktiviert. Im Gegensatz dazu ist die zweite enzymatische Funktion die Phosphataseaktivität der HK auf dem AR. Durch diese negative Regulation liegt der AR nicht-phosphoryliert vor (Gao & Stock, 2010). Der Verlust der Phosphatase Aktivität führt zu permanent phosphoryliertem AR und dadurch bedingter andauernder Expression der Zielgene (Huynh *et al.*, 2011; Huynh *et al.*, 2013). DcuS besitzt das E350xxN353-Phosphatasemotiv. Erste Hinweise auf mögliche Phosphatase-Aktivität von DcuS auf DcuR wurden *in vivo* ermittelt (Gencheva, 2016). Ein direkter Nachweis für die Dephosphorylierung von DcuR durch DcuS wurde jedoch nicht gezeigt.

Die hier identifizierten AS liegen also in dem katalytischen Zentrum von DcuS. Die Veränderung der Komplexbildung und Interaktion diese AS durch Substitutionen kann verschiedene Ursachen haben. Sowohl eine veränderte Struktur und Interaktionsoberfläche als auch eine Störung der enzymatischen Funktion, als Folge der Substitutionen, sind möglich. Die enzymatische Funktion ist mit der Struktur assoziiert, was die Unterscheidung zwischen Beiden erschwert. Dennoch führen die in Abb.: 48 zusammengefassten Substitutionen der AS zu zwei Effekten, in Bezug auf die Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR. Diese zwei Effekte wurden als komplexstimulierend oder komplexhemmend charakterisiert.

Der komplexhemmende Effekt, ist durch übermäßige *dcuB-lacZ* Expression und gleichzeitig durch Verlust der Interaktion zwischen DcuS und DcuR charakterisiert (Abb. 49). Vermutlich führt die Substitution durch eine Umstrukturierung der Interaktionsoberfläche in DcuS, zu einer Veränderung der Interaktionsaffinität oder/und enzymatischen Funktion. Drei der fünf als ‚Hot-Spot‘ charakterisierten Reste; Asn353, Gly360 und Leu361 und den damit verbundenen Verlust der DcuS-DcuR-Interaktion zeigen ein solchen Phänotyp. Die AS Asn353, Leu361 und Gly360 besitzen Reste, die als obligatorisch für PPI klassifiziert werden. Die Klassifikation beruht auf der Beteiligung der AS an der Bindung einer anderen AS-Kette zur Aufrechterhaltung der Stabilität und der Funktion von PPI (Subhajyoti *et al.*, 2005).

Die AS Asn353 ist Teil des Phosphatasemotiv von DcuS und wurde deshalb zusätzlich in MST und [$\gamma^{33}\text{P}$] –ATP Versuchen untersucht. Sowohl das Volllänge-DcuS als auch die PASC-Kinase tragende Substitution N353A, könnten durch [$\gamma^{33}\text{P}$] –ATP phosphoryliert werden. Im Vergleich zur Wt fiel die Phosphorylierung schwächer aus. *In vitro* Bestimmung der Kd von

PASc-KinaseN353 zeigt, im Vergleich zu dem Wt, keine Steigerung der Affinität durch die Phosphorylierung mit ATP. Dennoch ist der Kd mit 89 nM in dem Bereich von Wt und zeigt keine Störung der Komplexbildung. Dieser Diskrepanz zwischen dem Kd Wert und die BACTH Ergebnisse könnte eine Strukturveränderung zu Grunde liegen, die im BACTH aufgrund der T18-Fusion negativ ausfallen würde. Eine andere mögliche Ursache könnte die veränderte enzymatische Aktivität sein.

Im Vergleich dazu wurden Reste, die keine Expression zeigten, aber eine starke Interaktion und Ko-Lokalisation, als positiv und komplexstimulierend definiert. Die Substitution in Position Gln350 und Lys354 führt vermutlich zum „Einfangen“ von DcuR in dem DcuS x R-Komplex.

	DcuS α 1-Helix				Linker zu α 2-Helix		
	H	E x x	N	K xxxxx	G	L	L
		↓	↓	↓	↓	↓	
DcuS Hot-Spot-Reste	H349A	E350A	N353A	K354A	G360A	L361A	L362A
MSA-Konservierung	1	0,5	1	0	1	0	1
<i>dcuB</i> Expression	-	-	+	-	-	+	+
Interaktion	+	+	-	+	-	-	-
Ko-Lokalisation	-	+	-	+	+/-	+/-	k.a.

Abb. 48: Zusammenfassung der identifizierten „Hot-Spot“-AS von DcuS. Über der Tabelle ist der α 1-Helix der DHp Domäne (grüner Zylinder), der darauffolgende Linker zu α 2-Helix (schwarzen Linie) und die „Hot-Spot“-AS Positionen abgebildet. Mit „x“ wurden Skip-Positionen annotiert. Die MSA Konservierung, sowohl innerhalb der HisKA als auch der HPK5-Gruppe, ist von 1 (\cong 98 %) bis 0 (\cong >15 %) eingetragen. Die Pfeile, positioniert über den AS, stellen den für die Komplexbildung entscheidenden Effekt dar. Verhindert die Substitution, an den entsprechenden Stellen die Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR, ist dieser als komplexhemmend und mit einem roten Pfeil über der Position gekennzeichnet. Bewirkt die Substitution die Verstärkung der Komplexbildung zwischen SHK und AR, so ist der Pfeil grün. Positiver Effekt (grüner Pluszeichen); Negativer Effekt (roter Minuszeichen); reduzierter, aber vorhandener Effekt (schwarzes Plus-Minuszeichen); k.a. (kein Wert ist vorhanden).

Die AS Gln353 ist Teil des ExxN-Phosphatasemotiv von DcuS und wurde wie Asn353 zusätzlich in MST und [γ^{33} P]–ATP Versuchen untersucht. Sowohl das Volllänge-DcuS als auch die PASc-Kinase mit der E350A Substitution konnten durch [γ^{33} P]–ATP nicht-phosphoryliert werden (Abb.: A9 im Anhang). Die *in vitro* Bestimmung der Kd von PASc-KinaseE350A zeigt,

im Vergleich zu dem Wt, eine leichte Steigerung der Affinität durch die Anwesenheit von ATP. Die ermittelte Dissoziationskonstante (K_d 80 nM bzw. 60 nM) zeigt eine vergleichbare Affinität für DcuR wie der Wt.

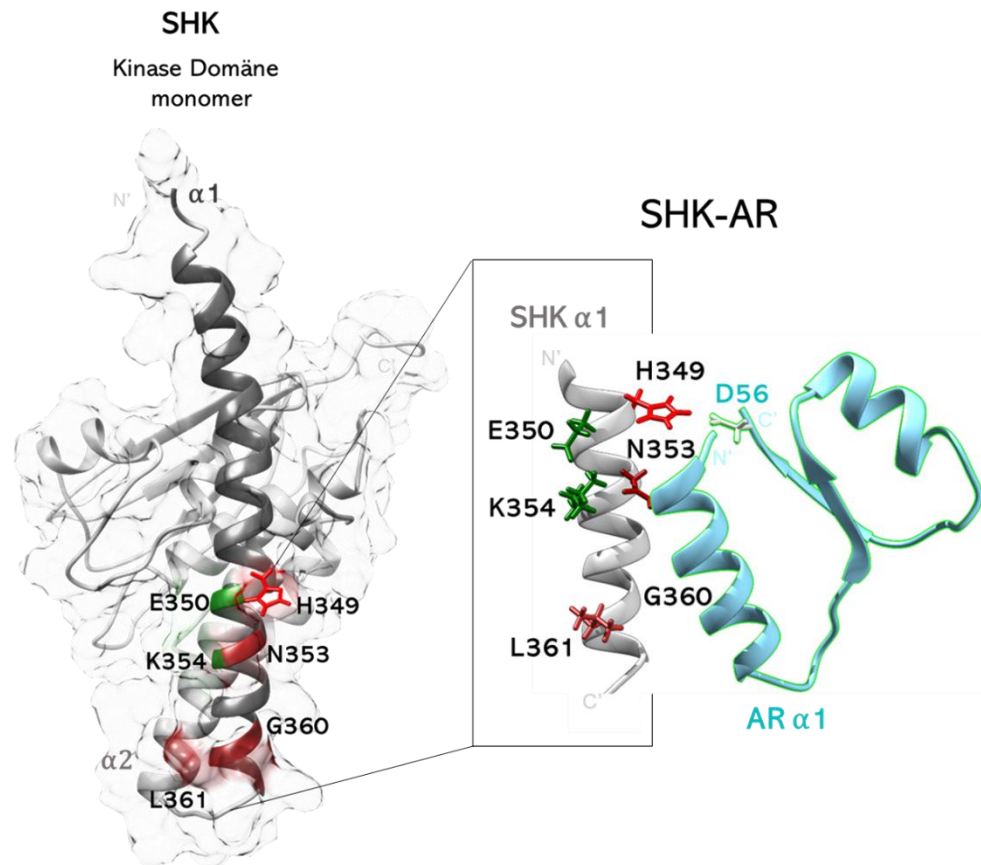


Abb. 49.: 3D-Modell der Kinase Domäne von DcuS und der möglichen Interaktionsoberfläche zwischen DcuS und DcuR. Substitutionen durch Alanin führten zu einem Verlust oder Förderung der DcuS-DcuR Interaktion im BACTH-System und *in vitro* Ko-Lokalisation Studien. Die AS sind mit Seitenketten stimulierenden (grün) oder hemmenden (rot) Effekt dargestellt. Die 3D-Strukturmodelle basieren auf Grundlage der Struktur von CitA_{Gt} von *G. thermodenitrificans* für DcuS und auf der Struktur von SpoF_{Bs} von *B. subtilis* für DcuR dargestellt. Von DcuS ist nur die Kinase-Domäne mit hervorgehobenen $\alpha 1$ - $\alpha 2$ -DHP-Domäne in Seitenansicht als monomer dargestellt. Für DcuR ist der Bereich $\alpha 1$ - $\alpha 2\beta 2$ - $\beta 3$ dargestellt.

5.2.2 Reste in DcuR mit Bedeutung für die Komplexbildung

Die Interaktionsreste, beteiligt an der Komplexbildung zwischen DcuS und DcuR, sollten auch auf Seiten des AR untersucht werden. Die spezifische PPI-Stelle liegt hierbei in der REC-Domäne. Diese erstreckt sich von AS 5-117 und beinhaltet die $\alpha 1$ -Helix und $\beta 5$ - $\alpha 5$ Regionen, welche für die Interaktion mit dem $\alpha 1$ -Helix der DHP-Domäne von DcuS verantwortlich ist.

Die Vorauswahl, welche für DcuS-Substitutionen verwendet wurde, konnte im Falle von DcuR nicht vorgenommen werden, da ein geeignetes Test-System fehlte. Aus diesem Grund wurden die eingeführten Substitutionen direkt in dem BACTH-Interaktionstest untersucht. Ausgehend von der Annahme, dass die $\alpha 1$ -Helix von DcuR für die spezifische Interaktion von Bedeutung sein könnte und sich diese nach dem hypothetischen Modell von Aminosäure 11-23 erstreckt, kommen aufgrund der räumlichen Struktur als Interaktionsstellen die Aminosäuren M12, V13, E15, L16, N17 und Y20 in Betracht (Wernet, 2019).

Von den im BACTH getesteten DcuR Substitutionen, wurden D8, M12, V13, N17 und D56 als mögliche ‚Hot-Spot‘-Reste für die Interaktion mit DcuS bestimmt. Diese zeichneten sich durch deutlichen Verlust der Interaktion in den Zügen der vorgenommenen Substitutionen aus. In Abb.: 50 ist ein 3D-Modell der möglichen Interaktionsoberfläche zwischen DcuS und DcuR dargestellt. Die 3D-Strukturmodelle basieren auf Grundlage der Struktur von CitAGt von *G. thermodenitrificans* für DcuS und auf der Struktur von SpoFBs von *B. subtilis* für DcuR. Von DcuS ist nur die Kinase-Domäne mit hervorgehobenen $\alpha 1$ -Helix der -DHP-Domäne in frontaler Ansicht dargestellt. Für DcuR ist der Bereich $\alpha 1\beta 1$ - $\alpha 2\beta 2$ dargestellt. Die Substitutionen liegen hauptsächlich auf dem $\alpha 1$ -Helix der REC-Domäne von DcuR.

SHK-AR

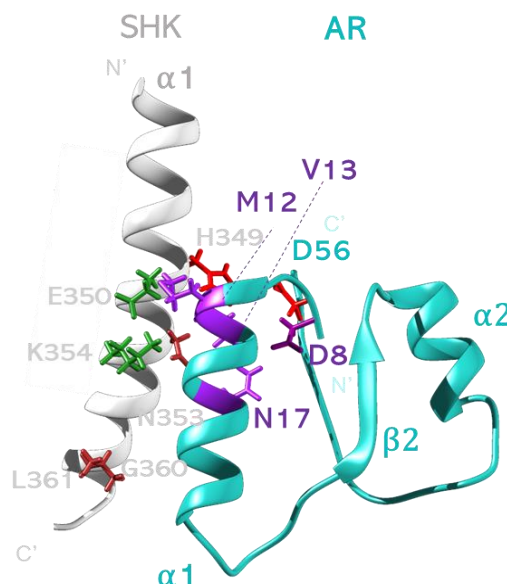


Abb. 50: 3D-Modell der möglichen Interaktionsoberfläche zwischen DcuS und DcuR. Substitutionen durch Alanin führten zu einem Verlust der DcuS-DcuR Interaktion im BACTH-System. Die 3D-Strukturmodelle basieren auf Grundlage der Struktur von CitAGt von *G. thermodenitrificans* für DcuS und auf der Struktur von SpoFBs von *B. subtilis* für DcuR. Von DcuS ist nur die Kinase-Domäne mit hervorgehobenen $\alpha 1$ -Helix der -DHP-Domäne in frontaler Ansicht dargestellt. Für DcuR ist der Bereich $\alpha 1\beta 1$ - $\alpha 2\beta 2$ dargestellt. Die Substitutionen liegen hauptsächlich auf dem $\alpha 1$ -Helix der REC-Domäne von DcuR.

Es sollten weitgehende Untersuchungen und ein geeignetes Testsystem für die Expression erstellt werden, um die Frage der PPI auf Seiten von DcuR untersuchen zu können.

Bei der Untersuchung des konservierten Asp 56 von DcuR konnte für die beiden Varianten D56A und D56N unterschiedliche PPI mit DcuS bestimmt werden. Wird Asp gegen Ala substituiert, verminderte die Substitution deutlich die Interaktion zwischen DcuS und DcuR. Wurde dagegen Asp gegen Asn getauscht (beide Reste sind polar), entsprach die Interaktion mit DcuS dem des Wt. [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP Experimente zeigten, dass sowohl D56A als auch D56N von DcuS nicht phosphoryliert werden können. D56N zeigte in EMSA-Bindungsstudien die Bindung an den Promotor von *dcuB* und in der SEC- Chromatographie eine Komplexbildung mit DcuS (Mr 133 kDa) (im Anhang). Diese Befunde lassen vermuten, dass die Mutation D56N eine Imitation des phosphorylierten Zustandes von DcuR bewirkt.

5.2 Das Zusammenspiel des DcuS(PASc-Kinase) x R-Komplexes mit der DNA

Die Ebene der Signalwahrnehmung und -weiterleitung des DcuSR-Systems basiert auf der Kommunikation und dem PPI zwischen DcuS und DcuR, sowie den als Ko-Regulatoren funktionierenden Transporter DctA und DcuB. Die zweite Ebene der Interaktion dieses Systems ist die Interaktion mit der DNA.

Anhand von EMSA-Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die Bindung von DcuR an den Promotor von *dcuB* auch unabhängig von der Phosphorylierung stattfindet. Der nicht-phosphorylierte DcuR-*dcuBp1*-Komplex weist eine kleine Retentionsgröße auf (C1) und ein K_d von 2,4 μM . Ob nicht-phosphorylierter DcuR, als Monomer oder als Dimer an der DNA bindet, ist nicht nachgewiesen. Es ist möglich, dass DcuR erst am Promotor dimerisiert oder als Monomer an der DNA bindet. Das nicht-phosphorylierte AR an Zielgene binden und zur Hemmung oder Aktivierung der Expression führen, ergaben Studien an PhoP von (*E. coli*) und BvgV (*B. pertussis*). Die Affinität der DNA-Bindung wird jedoch durch die Phosphorylierung erhöht (Hong *et al.*, 2007).

Die Phosphorylierung von DcuR zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Art des Komplexes. Der phosphorylierte DcuR-*dcuBp1*-Komplex hatte die kleinste Migrationsstrecke (C3). Überraschenderweise ist dieser Komplex um den Faktor 4 instabiler (K_d 10,6 μM) als der nicht-phosphorylierte DcuR-*dcuBp1*-Komplex. Die thermischen Entfaltungsprofile, der nicht-

phosphorylierten und phosphoryliertem DcuR-*dcuBp1*-Komplexen, unterscheiden sich stark voneinander. Während der nicht-phosphorylierte DcuR-*dcuBp1*-Komplex eine Rotverschiebung der Emission hat, zeigt der phosphorylierte Komplex eine Blauverschiebung der Emission (Abschnitt 4.3.1 Abb.: 43).

Der DcuR-DNA-Komplex hat eine mittlere Bindungsaffinität. Im Vergleich dazu ist der DcuS x DcuR-Komplex um den Faktor 21 stabiler. Welche Rolle spielt dann DcuS auf die DcuR-DNA-Interaktion? Welche Kooperativität bestimmt die Affinität? Welcher Rolle spielt die Phosphorylierung?

Um diese Frage zu beantworten wurde ein Bindungsmodell erstellt (Abb.: 51). Mit dessen Hilfe und der in MST gewonnenen Daten, soll die Kooperativität der Komponenten berechnet werden. DcuR (R) besitzt zwei Bindungsstellen. Die erste Bindestelle liegt in der REC-Domäne und ist an der Interaktion zwischen PASC-Kinase (S) und DcuR beteiligt. Diese Interaktion hat die Dissoziationskonstante $K_d 1$. Die zweite Bindestelle liegt in der HTH-Bindedomäne von DcuR. Diese Bindestelle ist für die Interaktion zwischen DcuR und den Promotor *dcuBp1* (B) zuständig. Wenn der Promotor *dcuBp1* zu DcuR gegeben wird, bilden beide Komponenten den DcuR-*dcuBp1*-Komplex mit der Dissoziationskonstante $K_d 2$. Kooperationsbindungen sind Bindungsereignisse, bei denen die Bindungsaffinität der Moleküle zu einem Interaktionspartner, durch ein vorangegangenes Bindungsereignis beeinflusst wird. Um den Einfluss von DcuS bzw. *dcuB* auf den jeweiligen vorgebildeten Komplexen zu untersuchen, wird die Art der Kooperativität bestimmt. Wirkt sich die Kooperativität auf den Bindungspartner in einer Erhöhung der Affinität aus, so ist diese Kooperativität positiv. Bei Verringerung oder Hemmung der Affinität handelt es sich um eine negative Kooperativität (Winter & Noll, 1998; Kundrotas *et al.*, 2006; Kastritis *et al.*, 2013). Es wurde zu den vorgebildeten DcuS x R-Komplex (R x S) der Promotor *dcuBp1* dazugegeben. Die Dissoziationskonstante für die Bindung des Promotors an den R x S-Komplex ist $K_d 3$. Wurde zu dem vorgebildeten DcuR-*dcuBp1*-Komplex (B x R) die PASC-Kinase dazugegeben, konnte diese Interaktionsaffinität durch die Dissoziationskonstante $K_d 4$ bestimmt werden. Von den oben beschriebenen Bindungsmodell ergibt sich das folgende Bindungsgleichgewicht $K_d 1 \cdot K_d 3 = K_d 4 \cdot K_d 2$. Nach Umstellung wird das Verhältnis $K_d 1 / K_d 4 = K_d 2 / K_d 3$ gebildet. Dieses Verhältnis gibt die Art an Kooperativität an. Wenn das Verhältnis > 1 ist liegt positive Kooperativität vor. Wenn das Verhältnis < 1 ist liegt eine negative Kooperativität vor. Die Dissoziationskonstanten $K_d 1$ und $K_d 2$ wurden

durch MST direkt bestimmt (Abschnitt 4.1.2 und Abschnitt 4.3.2). Die Dissoziationskonstanten $K_d 3$ und $K_d 4$ wurden aus den MST-Versuchen (durch Förstertransfer zwischen Fluoreszenz markierter Promotor und DcuR) geschätzt (Abschnitt 4.3.2 und Anhang Abb.: A7).

Nach der Ermittlung des Quotienten aus $K_d 1 / K_d 4$ liegt der Wert unter 1. Somit ist wahrscheinlich die Kooperativität zwischen der PASC-Kinase und dem DcuR-*dcuBp1*-Komplex negativ. Vermutlich führt die Anwesenheit von PASC-Kinase zur vermehrten Bildung von DcuS x R-Komplexen und gleichzeitig zur Dissoziation des DcuR-Promotor Komplexes. Ob PASC-Kinase eine Bindung mit DcuR eingeht, während diese noch an der DNA gebunden vorliegt, ist nicht nachgewiesen. Dennoch gibt es Hinweise, dass ein solcher intermediärer Tripartitkomplex, bestehend aus DcuS, DcuR und den Promotor, möglich wäre (Abschnitt 4.3.4). Für den Einfluss des Promotors *dcuBp1* auf dem vorgebildeten DcuS x R-Komplex, ergab die Berechnung des Quotienten von $K_d 2 / K_d 3$ eine positive Kooperativität. Vermutlich stimuliert die Anwesenheit des Promotors die Bindung zwischen PASC-Kinase und DcuR. Diese Stimulierung ist im Falle von nicht phosphorylierten DcuR stärker ausgeprägt, als wenn der Antwortregulator phosphoryliert vorliegen würde.

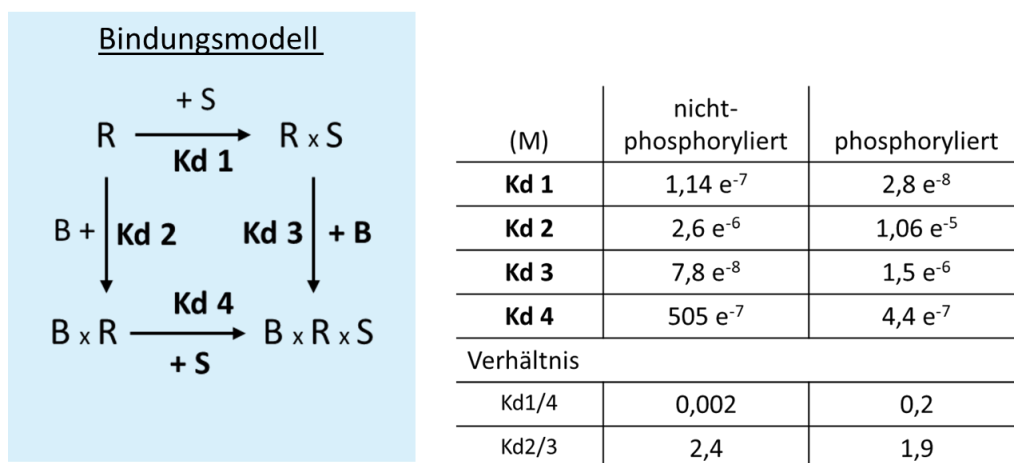


Abb. 51: Bindungsmodell für die verschiedenen Interaktionen zwischen PASC-Kinase, DcuR und *dcuBp1*.

Aus dem Bindungsmodell ergibt sich das folgende Bindungsgleichgewicht $K_d 1 \cdot K_d 3 = K_d 4 \cdot K_d 2$. Nach Umstellung wird das Verhältnis $K_d 1 / K_d 4 = K_d 2 / K_d 3$ gebildet. Dieses Verhältnis gibt die Art der Kooperativität an. Der Quotient aus $K_d 1 / K_d 4$ gibt die Affinität von PASC-Kinase (S) für DcuR (R) an. Dieser liegt sowohl nicht-komplexiert als auch in dem vorgebildeten DcuR-*dcuBp1*-Komplex ($B \times R$) vor. Der Quotient $K_d 2 / K_d 3$ gibt ebenfalls die Affinität des Promotors *dcuBp1* (B) für den DcuR (R) vor. DcuR liegt sowohl frei als auch in dem vorgebildeten DcuS x R-Komplex ($R \times S$) vor. Wenn der Quotient > 1 beträgt, ist die Kooperativität positiv. Wenn das Verhältnis < 1 ist, liegt eine negative Kooperativität vor. Die Dissoziationskonstanten $K_d 1$ und $K_d 2$ wurden durch MST-Versuche direkt bestimmt. Die Dissoziationskonstanten $K_d 3$ und $K_d 4$ wurden aus den MST-Versuchen (durch Förstertransfer zwischen Fluoreszenz markierter Promotor und DcuR) geschätzt.

6. Literatur

- Abo-Amer, A. E.; Munn, J.; Jackson, K.; Aktas, M.; Golby, P.; Kelly, D. J. & Andrews, S. C. (2004): DNA interaction and phosphotransfer of the C4-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **6**: 1879–1889; 10.1128/jb.186.6.1879-1889.2004.
- Alberto Marina, Carey D. Waldburger and Wayne A. Hendrickson (2005): Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidin-kinase protein. *The EMBO Journal* **24**: 4247–4259;
- Alm, E.; Huang, K. & Arkin, A. (2006): The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS computational biology* **11**: e143; 10.1371/journal.pcbi.0020143.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J. & Schwede, T. (2006): The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)* **2**: 195–201; 10.1093/bioinformatics/bti770.
- Aytuna, A. S.; Gursoy, A. & Keskin, O. (2005): Prediction of protein-protein interactions by combining structure and sequence conservation in protein interfaces. *Bioinformatics (Oxford, England)* **12**: 2850–2855; 10.1093/bioinformatics/bti443.
- Baaske, P.; Wienken, C. J.; Reineck, P.; Duhr, S. & Braun, D. (2010): Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **12**: 2238–2241; 10.1002/anie.200903998.
- Barford, D.; Hu, S.-H. & Johnson, L. N. (1991): Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *Journal of molecular biology* **1**: 233–260; 10.1016/0022-2836(91)90887-c.
- Bar-On, Y. M.; Phillips, R. & Milo, R. (2018): The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **25**: 6506–6511; 10.1073/pnas.1711842115.
- Batchelor, E. & Goulian, M. (2003): Robustness and the cycle of phosphorylation and dephosphorylation in tcs. *PNAS* **2**: 691–696;
- Blencke, H.-M.; Homuth, G.; Ludwig, H.; Mäder, U.; Hecker, M. & Stülke, J. (2003): Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering* **2**: 133–149; 10.1016/s1096-7176(03)00009-0.
- Blount, Z. D. (2015): The unexhausted potential of *E. coli*. 10.7554/eLife.05826.001.
- Bourret, R. B. (2010): Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current opinion in microbiology* **2**: 142–149; 10.1016/j.mib.2010.01.015.
- Brader, M. L.; Estey, T.; Bai, S.; Alston, R. W.; Lucas, K. K.; Lantz, S.; Landsman, P. & Maloney, K. M. (2015): Examination of thermal unfolding and aggregation profiles of a series of developable therapeutic monoclonal antibodies. *Molecular pharmaceuticals* **4**: 1005–1017; 10.1021/mp400666b.

- Bullock, A. N.; Henckel, J.; DeDecker, B. S.; Johnson, C. M.; Nikolova, P. V.; Proctor, M. R.; Lane, D. P. & Fersht, A. R. (1997): Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **26**: 14338–14342; 10.1073/pnas.94.26.14338.
- Casino, P.; Fernández-Alvarez, A.; Alfonso, C.; Rivas, G. & Marina, A. (2007): Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochimica et biophysica acta* **5**: 603–609; 10.1016/j.bbapap.2007.02.005.
- Casino, P.; Rubio, V. & Marina, A. (2009): Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **2**: 325–336; 10.1016/j.cell.2009.08.032.
- Cheung, J. & Hendrickson, W. A. (2008): Crystal structures of C4-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *The Journal of biological chemistry* **44**: 30256–30265; 10.1074/jbc.M805253200.
- Clackson, T. & Wells, J. A. (1995): A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science (New York, N.Y.)* **5196**: 383–386; 10.1126/science.7529940.
- Crowley, P. B. & Golovin, A. (2005): Cation- π interactions in protein-protein interfaces. *Proteins* **2**: 231–239; 10.1002/prot.20417.
- Cukuroglu, E.; Engin, H. B.; Gursoy, A. & Keskin, O. (2014): Hot spots in protein-protein interfaces: towards drug discovery. *Progress in biophysics and molecular biology* **2-3**: 165–173; 10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.003.
- Cusick, M. E.; Klitgord, N.; Vidal, M. & Hill, D. E. (2005): Interactome: gateway into systems biology. *Human molecular genetics* R171-81; 10.1093/hmg/ddi335.
- Cuthbertson, L. & Nodwell, J. R. (2013): The TetR family of regulators. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **3**: 440–475; 10.1128/MMBR.00018-13.
- Dahl, J. L.; Wei, B.-Y. & Kadner, R. J. (1997): Protein Phosphorylation affects binding. *The Journal of biological chemistry* **3**: 1910–1919;
- De, S.; Krishnadev, O.; Srinivasan, N. & Rekha, N. (2005): Interaction preferences across protein-protein interfaces of obligatory and non-obligatory components are different. *BMC structural biology* **15**; 10.1186/1472-6807-5-15.
- Deutscher, J.; Francke, C. & Postma, P. W. (2006): How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **4**: 939–1031; 10.1128/MMBR.00024-06.
- Dower, W. J.; Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* **13**: 6127–6145; 10.1093/nar/16.13.6127.
- Dutta, R. & Inouye, M. (1996): Reverse Phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a Kinase/Phosphatase Mutant of EnvZ (EnvZN347D), a Bifunctional Signal Transducer of *Escherichia coli*. *Biochemistry and Molecular Biology* **3**: 1424–1429;
- Dutta, and, R.; Ling, Q. & Masayori, I. (1999): Histidine kinases: diversity of domain organization. *Molecular microbiology* **34(4)**: 633–640;

- Etzkorn, M.; Kneuper, H.; Dünwald, P.; Vijayan, V.; Krämer, J.; Griesinger, C.; Becker, S.; Uden, G. & Baldus, M. (2008): Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nature structural & molecular biology* **10**: 1031–1039; 10.1038/nsmb.1493.
- Farinha, M. A. & Kropinski, A. M. (1990): High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions. *FEMS microbiology letters* **2**: 221–225; 10.1111/j.1574-6968.1990.tb13982.x.
- Finn, R. D.; Mistry, J.; Tate, J.; Coghill, P.; Heger, A.; Pollington, J. E.; Gavin, O. L.; Gunasekaran, P.; Ceric, G.; Forslund, K.; Holm, L.; Sonnhammer, E. L. L.; Eddy, S. R. & Bateman, A. (2010): The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*: D211–22; 10.1093/nar/gkp985.
- Fuchs, G., Schlegel G. H., Eitinger, T. (2014): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart.
- Fuhs, S. R. & Hunter, T. (2017): pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification. *Current opinion in cell biology* 8–16; 10.1016/j.ceb.2016.12.010.
- Galperin, M. Y. (2005): A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC microbiology* 35; 10.1186/1471-2180-5-35.
- Galperin, M. Y. (2006): Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of bacteriology* **12**: 4169–4182; 10.1128/JB.01887-05.
- Galperin, M. Y. (2010): Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current opinion in microbiology* **2**: 150–159; 10.1016/j.mib.2010.01.005.
- Galperin, M. Y.; Higdon, R. & Kolker, E. (2010): Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular bioSystems* **4**: 721–728; 10.1039/b908047c.
- Gao, K.; Oerlemans, R. & Groves, M. R. (2020): Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophysical reviews* **1**: 85–104; 10.1007/s12551-020-00619-2.
- Gao, R. & Stock, A. M. (2010): Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Current opinion in microbiology* **2**: 160–167; 10.1016/j.mib.2009.12.009.
- Gardner, S. G.; Johns, K. D.; Tanner, R. & McCleary, W. R. (2014): The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *Journal of bacteriology* **9**: 1741–1752; 10.1128/JB.00029-14.
- Gerald M. Pao and Milton H. Saier, Jr. (1995): Response Regulators of Bacterial Signal Transduction Systems: Selective Domain Shuffling During Evolution. *Journal of Molecular Evolution* **40**: 136–154;
- Ghisaidoobe, A. B. T. & Chung, S. J. (2014): Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International journal of molecular sciences* **12**: 22518–22538; 10.3390/ijms151222518.
- Goh, E.-B.; Bledsoe, P. J.; Chen, L.-L.; Gyaneshwar, P.; Stewart, V. & Igo, M. M. (2005): Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *Journal of bacteriology* **14**: 4890–4899; 10.1128/JB.187.14.4890-4899.2005.

- Golby, P.; Kelly, D. J.; Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1998): Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C4-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **24**: 6586–6596; 10.1128/JB.180.24.6586-6596.1998.
- Golby, P.; Davies, S.; Kelly, D. J.; Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1999): Identification and Characterization of a Two-Component Sensor-Kinase and Response-Regulator System (DcuS-DcuR) Controlling Gene Expression in Response to C4-Dicarboxylates in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1238–1248;
- Goncearenco, A.; Shoemaker, B. A.; Zhang, D.; Sarychev, A. & Panchenko, A. R. (2014): Coverage of protein domain families with structural protein-protein interactions: current progress and future trends. *Progress in biophysics and molecular biology* **2-3**: 187–193; 10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.005.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2012): Molecular cloning, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Gromiha, M. M.; Santhosh, C. & Ahmad, S. (2004): Structural analysis of cation- π interactions in DNA binding proteins. *International journal of biological macromolecules* **3**: 203–211; 10.1016/j.ijbiomac.2004.04.003.
- Gunsalus, R. P. (1992): Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *Journal of bacteriology* **22**: 7069–7074; 10.1128/jb.174.22.7069-7074.1992.
- Hendrickson, H. (2009): Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. *PLoS genetics* **1**: e1000335; 10.1371/journal.pgen.1000335.
- Hentschel, E. (2015): Interaction of the two-component systems HrrSA and ChrSA in *Corynebacterium glutamicum*, *Forschungszentrum Jülich, Zentralbibliothek*.
- Henzler-Wildman, K. & Kern, D. (2007): Dynamic personalities of proteins. *Nature* **7172**: 964–972; 10.1038/nature06522.
- Henzler-Wildman, K. A.; Lei, M.; Thai, V.; Kerns, S. J.; Karplus, M. & Kern, D. (2007): A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* **7171**: 913–916; 10.1038/nature06407.
- Homeyer, N.; Essigke, T.; Ullmann, G. M. & Sticht, H. (2007): Effects of histidine protonation and phosphorylation on histidine-containing phosphocarrier protein structure, dynamics, and physicochemical properties. *Biochemistry* **43**: 12314–12326; 10.1021/bi701228g.
- Hong, E.; Lee, H. M.; Ko, H.; Kim, D.-U.; Jeon, B.-Y.; Jung, J.; Shin, J.; Lee, S.-A.; Kim, Y.; Jeon, Y. H.; Cheong, C.; Cho, H.-S. & Lee, W. (2007): Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *The Journal of biological chemistry* **28**: 20667–20675; 10.1074/jbc.M609104200.
- Hsieh, Y.-J. & Wanner, B. L. (2010): Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current opinion in microbiology* **2**: 198–203; 10.1016/j.mib.2010.01.014.
- Hurley, J. H.; Dean, A. M.; Sohl, J. L.; Koshland, D. E. & Stroud, R. M. (1990): Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science (New York, N.Y.)* **4972**: 1012–1016; 10.1126/science.2204109.

- Huynh, T. N.; Noriega, C. E. & Stewart, V. (2013): Missense substitutions reflecting regulatory control of transmitter phosphatase activity in two-component signalling. *Molecular microbiology* **3**: 459–472; 10.1111/mmi.12195.
- Huynh, T. N. & Stewart, V. (2011): Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Molecular microbiology* **2**: 275–286; 10.1111/j.1365-2958.2011.07829.x.
- Janausch, I.; Zientz, E.; Tran, Q.; Kröger, A. & Unden, G. (2002): C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1-2**: 39–56; 10.1016/S0005-2728(01)00233-X.
- Janausch, I. G.; Garcia-Moreno, I.; Lehnen, D.; Zeuner, Y. & Unden, G. (2004): Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)* **Pt 4**: 877–883; 10.1099/mic.0.26900-0.
- Jean-Louis Rigaud, Bruno Pitard, Daniel Levy :Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins.
- Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. (1999): Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* **12**: 3–18;
- Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P. & Breitsprecher, D. (2014): MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* 101–113; 10.1016/j.molstruc.2014.03.009.
- Jing, D.; Agnew, J.; Patton, W. F.; Hendrickson, J. & Beechem, J. M. (2003): A sensitive two-color electrophoretic mobility shift assay for detecting both nucleic acids and protein in gels. *Proteomics* **7**: 1172–1180; 10.1002/pmic.200300438.
- John S. Parkinson and Eric C. Kofoid (1992): Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins.
- Jones, S.; Marin, A. & Thornton, J. M. (2000): Protein domain interfaces: characterization and comparison with oligomeric protein interfaces. *Protein engineering* **2**: 77–82; 10.1093/protein/13.2.77.
- Jordan, S.; Hutchings, M. I. & Mascher, T. (2008): Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews* **1**: 107–146; 10.1111/j.1574-6976.2007.00091.x.
- Karimova, G.; Ullmann, A. & Ladant, D. (2001): Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **1**: 73–82;
- 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. *Journal of bacteriology* **7**: 2233–2243; 10.1128/JB.187.7.2233-2243.2005.
- 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 USA* **95**: 5752–5756;

- Karinou, E.; Compton, E. L. R.; Morel, M. & Javelle, A. (2013): The Escherichia coli SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. *Molecular microbiology* **3**: 623–640; 10.1111/mmi.12120.
- Kastritis, P. L. & Bonvin, A. M. J. J. (2013): On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *Journal of the Royal Society, Interface* **79**: 20120835; 10.1098/rsif.2012.0835.
- Kastritis, P. L.; Moal, I. H.; Hwang, H.; Weng, Z.; Bates, P. A.; Bonvin, A. M. J. J. & Janin, J. (2011): A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. *Protein science : a publication of the Protein Society* **3**: 482–491; 10.1002/pro.580.
- Keramisanou, D.; Biris, N.; Gelis, I.; Sianidis, G.; Karamanou, S.; Economou, A. & Kalodimos, C. G. (2006): Disorder-order folding transitions underlie catalysis in the helicase motor of SecA. *Nature structural & molecular biology* **7**: 594–602; 10.1038/nsmb1108.
- Kholodenko, B. N. (2006): Cell signaling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 165–176;
- Kholodenko, B. N.; BROWN, G. C. & Hoek, J. B. (2000): Diffusion control of protein phosphorylation in signal transduction pathways. *Biochemical Journal* **3**: 901; 10.1042/0264-6021:3500901.
- Kholodenko, B. N.; Hoek, J. B. & Westerhoff, H. V. (2000): Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends in Cell Biology* **5**: 173–178; 10.1016/s0962-8924(00)01741-4.
- Kleefeld, A.; Ackermann, B.; Bauer, J.; Krämer, J. & Uden, G. (2009): The fumarate/succinate antiporter DcuB of Escherichia coli is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *The Journal of biological chemistry* **1**: 265–275; 10.1074/jbc.M807856200.
- Kojetin, D. J.; Thompson, R. J. & Cavanagh, J. (2003): Sub-classification of response regulators using the surface characteristics of their receiver domains. *FEBS Letters* **3**: 231–236; 10.1016/S0014-5793(03)01167-0.
- Krämer, J.; Fischer, J. D.; Zientz, E.; Vijayan, V.; Griesinger, C.; Lupas, A. & Uden, G. (2007): Citrate sensing by the C4-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of Escherichia coli: binding site and conversion of DcuS to a C4-dicarboxylate- or citrate-specific sensor. *Journal of bacteriology* **11**: 4290–4298; 10.1128/JB.00168-07.
- Kretschy, N.; Sack, M. & Somoza, M. M. (2016): Sequence-Dependent Fluorescence of Cy3- and Cy5-Labeled Double-Stranded DNA. *Bioconjugate chemistry* **3**: 840–848; 10.1021/acs.bioconjchem.6b00053.
- Kundrotas, P. J. & Alexov, E. (2006): Electrostatic properties of protein-protein complexes. *Biophysical journal* **5**: 1724–1736; 10.1529/biophysj.106.086025.
- Leimbach, A.; Hacker, J. & Dobrindt, U. (2013): E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology* 3–32; 10.1007/82_2012_303.
- Lin, W.; Wang, Y.; Han, X.; Zhang, Z.; Wang, C.; Wang, J.; Yang, H.; Lu, Y.; Jiang, W.; Zhao, G.-P. & Zhang, P. (2014): Atypical OmpR/PhoB subfamily response regulator GlnR of actinomycetes functions

- as a homodimer, stabilized by the unphosphorylated conserved Asp-focused charge interactions. *The Journal of biological chemistry* **22**: 15413–15425; 10.1074/jbc.M113.543504.
- Lua, R. C.; Marciano, D. C.; Katsonis, P.; Adikesavan, A. K.; Wilkins, A. D. & Lichtarge, O. (2014): Prediction and redesign of protein-protein interactions. *Progress in biophysics and molecular biology* **2-3**: 194–202; 10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.004.
- Mao, Y.; Yu, L.; Yang, R.; Qu, L. & Harrington, P. d. B. (2015): A novel method for the study of molecular interaction by using microscale thermophoresis. *Talanta* 894–901; 10.1016/j.talanta.2014.09.038.
- Mascher, T.; Helmann, J. D. & Unden, G. (2006): Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **4**: 910–938; 10.1128/MMBR.00020-06.
- Miller, J. H. (1992): A short course in bacterial genetics, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996): Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* **3**: 289–298; 10.1006/jmbi.1996.0399.
- Monzel, C.; Degreif-Dünnwald, P.; Gröpper, C.; Griesinger, C. & Unden, G. (2013): The cytoplasmic PASC domain of the sensor kinase DcuS of Escherichia coli: role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction. *MicrobiologyOpen* **6**: 912–927; 10.1002/mbo3.127.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **35**: 11042–11047; 10.1073/pnas.1507217112.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. & Erlich, H. (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)* 17–27;
- Nishi, H.; Hashimoto, K. & Panchenko, A. R. (2011): Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure (London, England : 1993)* **12**: 1807–1815; 10.1016/j.str.2011.09.021.
- Nooren, I. M. A. & Thornton, J. M. (2003): Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal* **14**: 3486–3492;
- Noriega, C. E.; Lin, H.-Y.; Chen, L.-L.; Williams, S. B. & Stewart, V. (2010): Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from Escherichia coli K-12. *Molecular microbiology* **2**: 394–412; 10.1111/j.1365-2958.2009.06987.x.
- Noriega, C. E.; Schmidt, R.; Gray, M. J.; Chen, L.-L. & Stewart, V. (2008): Autophosphorylation and dephosphorylation by soluble forms of the nitrate-responsive sensors NarX and NarQ from Escherichia coli K-12. *Journal of bacteriology* **11**: 3869–3876; 10.1128/JB.00092-08.
- Oliveira, A. P. & Sauer, U. (2012): The importance of post-translational modifications in regulating Saccharomyces cerevisiae metabolism. *FEMS yeast research* **2**: 104–117; 10.1111/j.1567-1364.2011.00765.x.

- Pappalardo, L.; Janausch, I. G.; Vijayan, V.; Zientz, E.; Junker, J.; Peti, W.; Zweckstetter, M.; Unden, G. & Griesinger, C. (2003): The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **40**: 39185–39188; 10.1074/jbc.C300344200.
- Park, S.-Y.; Beel, B. D.; Simon, M. I.; Bilwes, A. M. & Crane, B. R. (2004): In different organisms, the mode of interaction between two signaling proteins is not necessarily conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **32**: 11646–11651; 10.1073/pnas.0401038101.
- Paternostre, M. T.; Roux, M. & Rigaud, J. L. (1988): Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* **8**: 2668–2677; 10.1021/bi00408a006.
- Perkins, J. R.; Diboun, I.; Dessailly, B. H.; Lees, J. G. & Orengo, C. (2010): Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure (London, England : 1993)* **10**: 1233–1243; 10.1016/j.str.2010.08.007.
- Peter M Wolanin, Peter A. Thomason and Jeffry B. Stock (2002): Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* **10**:
- Plum, G. E.; Park, Y. W.; Singleton, S. F.; Dervan, P. B. & Breslauer, K. J. (1990): Thermodynamic characterization of the stability and the melting behavior of a DNA triplex: a spectroscopic and calorimetric study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **23**: 9436–9440; 10.1073/pnas.87.23.9436.
- Podgornaia, A. I.; Casino, P.; Marina, A. & Laub, M. T. (2013): Structural basis of a rationally rewired protein-protein interface critical to bacterial signaling. *Structure (London, England : 1993)* **9**: 1636–1647; 10.1016/j.str.2013.07.005.
- Podgornaia, A. I. & Laub, M. T. (2013): Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current opinion in microbiology* **2**: 156–162; 10.1016/j.mib.2013.01.004.
- Royer, C. A. (2006): Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chemical reviews* **5**: 1769–1784; 10.1021/cr0404390.
- Ruiz, D.; Salinas, P.; Lopez-Redondo, M. L.; Cayuela, M. L.; Marina, A. & Contreras, A. (2008): Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology (Reading, England)* **Pt 10**: 3002–3015; 10.1099/mic.0.2008/020677-0.
- Salazar, M. E. & Laub, M. T. (2015): Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Current opinion in microbiology* **7–14**; 10.1016/j.mib.2014.12.003.
- Salentin, S.; Haupt, V. J.; Daminelli, S. & Schroeder, M. (2014): Polypharmacology rescored: protein-ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment. *Progress in biophysics and molecular biology* **2-3**: 174–186; 10.1016/j.pbiomolbio.2014.05.006.
- Salvi, M.; Schomburg, B.; Giller, K.; Graf, S.; Unden, G.; Becker, S.; Lange, A. & Griesinger, C. (2017): Sensory domain contraction in histidine kinase CitA triggers transmembrane signaling in the membrane-bound sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **12**: 3115–3120; 10.1073/pnas.1620286114.

- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Scheu, P. D.; Kim, O. B.; Griesinger, C. & Uden, G. (2010): Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C(4)-dicarboxylates in bacteria. *Future microbiology* **9**: 1383–1402; 10.2217/fmb.10.103.
- Scheu, P. D.; Steinmetz, P. A.; Dempwolff, F.; Graumann, P. L. & Uden, G. (2014): Polar localization of a tripartite complex of the two-component system DcuS/DcuR and the transporter DctA in *Escherichia coli* depends on the sensor kinase DcuS. *PLoS one* **12**: e115534; 10.1371/journal.pone.0115534.
- Serber, Z. & Ferrell, J. E. (2007): Tuning bulk electrostatics to regulate protein function. *Cell* **3**: 441–444; 10.1016/j.cell.2007.01.018.
- Shatalkin, A. I. (2004): Highest level of division in the organism classification 1. Prokaryotes and eukaryotes. *Zh Obshch Biol.* **65**: 19–38;
- Six, S.; Andrews, S. C.; Uden, G. & Guest, J. R. (1994): *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). *Journal of bacteriology* **21**: 6470–6478; 10.1128/jb.176.21.6470-6478.1994.
- Skerker, J. M.; Perchuk, B. S.; Siryaporn, A.; Lubin, E. A.; Ashenberg, O.; Goulian, M. & Laub, M. T. (2008): Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* **6**: 1043–1054; 10.1016/j.cell.2008.04.040.
- Sourjik, V. & Berg, H. C. (2002): Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *PNAS* **20**: 12669–12674; 10.1073/pnas.192463199.
- Duhr, S. & Braun, D. (2006): Why molecules move along a temperature gradient. *PNAS* **52**: 19678–19682; 10.1073.
- Strickfaden, S. C.; Winters, M. J.; Ben-Ari, G.; Lamson, R. E.; Tyers, M. & Pryciak, P. M. (2007): A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell* **3**: 519–531; 10.1016/j.cell.2006.12.032.
- Surmann, K.; Stopp, M.; Wörner, S.; Dhople, V. M.; Völker, U.; Uden, G. & Hammer, E. (2020): Fumarate dependent protein composition under aerobic and anaerobic growth conditions in *Escherichia coli*. *Journal of proteomics* 103583; 10.1016/j.jprot.2019.103583.
- Tiwari, S.; Jamal, S. B.; Hassan, S. S.; Carvalho, P. V. S. D.; Almeida, S.; Barh, D.; Ghosh, P.; Silva, A.; Castro, T. L. P. & Azevedo, V. (2017): Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Frontiers in microbiology* 1878; 10.3389/fmicb.2017.01878.
- Tuncbag, N.; Gursoy, A. & Keskin, O. (2009): Identification of computational hot spots in protein interfaces: combining solvent accessibility and inter-residue potentials improves the accuracy. *Bioinformatics (Oxford, England)* **12**: 1513–1520; 10.1093/bioinformatics/btp240.

- Ulrich, L. E.; Koonin, E. V. & Zhulin, I. B. (2005): One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in microbiology* **2**: 52–56; 10.1016/j.tim.2004.12.006.
- Ulrich, L. E. & Zhulin, I. B. (2010): The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic acids research Database issue*: D401-7; 10.1093/nar/gkp940.
- Uden, G.; Wörner, S. & Monzel, C. (2016b): Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling: The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of Escherichia coli. *Advances in microbial physiology* 139–167; 10.1016/bs.ampbs.2016.02.003.
- Uden, G.; Strecker, A.; Kleefeld, A. & Kim, O. B. (2016): C₄-Dicarboxylate Utilization in Aerobic and Anaerobic Growth. *Cellular and Molecular Biology*.
- Van Holde, K. E.; Johnson, C. W. & Ho, S. P. (2006): Principles of Physical Biochemistry. *Pearson*
- Vishwanath, S. & Srinivasan, N. (2014): Chemical specificity and conformational flexibility in proteinase-inhibitor interaction: scaffolds for promiscuous binding. *Progress in biophysics and molecular biology* **2-3**: 151–157; 10.1016/j.pbiomolbio.2014.08.003.
- Vishwanath, S.; Sukhwai, A.; Sowdhamini, R. & Srinivasan, N. (2017): Specificity and stability of transient protein-protein interactions. *Current opinion in structural biology* 77–86; 10.1016/j.sbi.2016.12.010.
- Wernert, M. (2019): Charakterisierung der spezifischen Interaktion zwischen DcuS und DcuR. Masterarbeit, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.
- Weigand, B.; Köhler, J. & Wolfersdorf, J. von (2016): Thermodynamik kompakt, *Springer Vieweg*.
- Whitman, W. B.; Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998): Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**: 6578–6583.
- Winter, R. & Noll, F. (1998): Methoden der biophysikalischen Chemie, *Teubner*.
- Wintjens, R.; Liévin, J.; Rooman, M. & Buisine, E. (2000): Contribution of cation-pi interactions to the stability of protein-DNA complexes. *Journal of molecular biology* **2**: 395–410; 10.1006/jmbi.2000.4040.
- Witan, J.; Bauer, J.; Wittig, I.; Steinmetz, P. A.; Erker, W. & Uden, G. (2012): Interaction of the Escherichia coli transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Molecular microbiology* **5**: 846–861; 10.1111/j.1365-2958.2012.08143.x.
- Witan, J.; Monzel, C.; Scheu, P. D. & Uden, G. (2012): The sensor kinase DcuS of Escherichia coli: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biological chemistry* **11**: 1291–1297; 10.1515/hsz-2012-0229.
- Wolanin, P. M.; Thomason, P. A. & Stock, J. B. (2002): Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* **3**: 3013.1-3013.8.
- Wolanin, P. M.; Webre, D. J. & Stock, J. B. (2003): Mechanism of phosphatase activity in the chemotaxis response regulator CheY. *Biochemistry* **47**: 14075–14082; 10.1021/bi034883t.
- Wörner, S.; Surmann, K.; Ebert-Jung, A.; Völker, U.; Hammer, E. & Uden, G. (2018): Cellular Concentrations of the Transporters DctA and DcuB and the Sensor DcuS of Escherichia coli and the

Contributions of Free and Complexed DcuS to Transcriptional Regulation by DcuR. *Journal of bacteriology* **4**: 10.1128/JB.00612-17.

Yamamoto, K.; Hirao, K.; Oshima, T.; Aiba, H.; Utsumi, R. & Ishihama, A. (2005): Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **2**: 1448–1456; 10.1074/jbc.M410104200.

Zapf, J.; Udayaditya, S.; Madhusudan; Hoch, J. A. & Varughese, K. I. (2000): A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* **8**: 851–862.

Zhou, H.-X. & Pang, X. (2018): Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chemical reviews* **4**: 1691–1741; 10.1021/acs.chemrev.7b00305.

Zientz, E.; Bongaerts, J. & Uden, G. (1998): Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system. *Journal of bacteriology* **20**: 5421–5425; 10.1128/JB.180.20.5421-5425.1998.

Kneuper, H. (2005): Strukturl und Funktionsuntersuchungen des C₄-Dicarboxylat-Sensor DcuS von *Escherichia coli*. Disertation, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

Kleefeld, A. (2006): Der Carrier DcuB als zweiter Sensor des Zweikomponentensystem DcuSR in *Escherichia coli*. Disertation, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

Wörner, S. (2017): Der Transporter DcuB als funktioneller Schalter zwischen freiem DcuS und dem sensorisch aktiven DcuS/DcuB Sensorkomplex. Disertation, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

Gencheva, S. (2016): Das ExxN_Motiv und die Phosphataseaktivität der Sensorkinase DcuS von *Escherichia coli*. Diplomarbeit, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

Janausch, I. (2001): Rekonstitution des Fumaratsensors DcuS in Liposomen und Transport von Fumarat und Succinat in *Escherichia coli*. Disertation, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

Witan, J. (2012): Funktion der C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS in *Escherichia coli*. Disertation, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

Eckelmann, E. (2020): Molecular interactions between the response regulator DcuR and the histidin kinase DcuS in *E. coli*. Bachelorarbeit, *Johannes Gutenberg- Universität Mainz*.

7. Anhang

7.1 Stämme

Tab. A1: Verwendete Stämme von *Escherichia coli* K12.

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsS_Bgall</i> , <i>dcm</i> λ(DE), mit IPTG-induzierbare chromosomaler T7-RNA-Polymerase; Zytoplasmatische Proteinüberproduktion	Studier & Moffat, 1986
C43 (DE3)	Spontane Mutation von BL21(DE3) zur Überproduktion von Membranproteinen	Miroux & Walker, 1996
BTH101	F ⁻ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galk16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str^r</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Karimova <i>et al.</i> , 1998
XL1-Blue	F ⁻ , <i>recA1</i> ⁻ , (<i>mk+</i> , <i>rk+</i>) <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , (<i>lac</i> ⁻) [F ⁻ , ProAB, <i>lacIq</i> , Z ΔM15 Tn10(<i>tet^R</i>)]; Stamm zur gerichteten Mutagenese	Stratagene
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>), F' <i>[traD36proAB⁺, lac^q lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
AN387	Wildtyp	Wallace & Young, 1977
IMW260	MC4100, λ(<i>φ</i> (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>)hyb, Ap ^r) <i>dcuS::cam^r</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW262	MC4100, <i>dcuS::cam^r</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW205	MC4100, <i>dcuR::kan^r</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1999
IMW691	MG1655, <i>lacZYA::f^{rt}</i> und <i>dcuR::kan^r</i>	Wernet, 2019

7.2 Plasmide

Tab.A2: Ausgangsplasmide und Plasmide; verwendet für Mutagenese, Klonierung und Expression.

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pET28a	Expressionsvektor; pBR322 ori, T7 promotor, 6-His-tag (Kan ^r)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18C	Plasmid für die Expression von N-terminal T18-Fusionen; pUC19 Derivat (Ap ^r)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18	Plasmid für die Expression von C-terminal T18-Fusionen; pUC19 Derivat (Ap ^r)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pUT18C-zip	Plasmid für Expression von T18-Zip ; pUT18C Derivative (Ap ^r)	Karimova <i>et al.</i> , 1998

pKNT25	Plasmid für die Expression von C-terminal T25-Fusionen; pUC19 Derivat (Kan ^r)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pKT25-zip	Plasmid für Expression von T25-Zip; pKNT25 Derivat (Kan ^r)	Karimova <i>et al.</i> , 1998
pASK-IBA3 ⁺	Überexpression von IBA für Proteine mit C-terminalen StrepII- Tag,AHT-induzierbar (Ap ^r)	IBA, Göttingen
BB-4	pBlueskriptK- aus λ Zap durch in-vivo Excision präpariert (Genofit-Katalog und Manual)	Genofit
pMW151	Plasmid für Überexpression von His ₆ -DcuS; pET28a Derivat (Kan ^r)	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW180	Plasmid für Expression von DcuS; pET28a Derivative (Kan ^r)	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW181	pET28a mit <i>dcuS</i> (mit eigenem promotor) (Kan ^r)	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW266	Plasmid für Überexpression von His ₆ -DcuR; pET28a Derivat (Kan ^r)	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW267	pMW266 aber DcuR(D56N) (Kan ^r)	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW407	Plasmid für die Expression von DcuS-eYfp basierend auf pBAD30 Derivat (Ap ^r)	Scheu <i>et al.</i> , 2014
pMW427	Plasmid für die Expression von T25-DcuR; pKT25 Derivat (Kan ^r)	Scheu <i>et al.</i> , 2011
pMW428	Plasmid für die Expression von DcuS-T18; pUT18 Derivat (Ap ^r)	Kleefeld, 2006
MW1075	Plasmid für die Expression von PASC-Kinase-T25 (DcuS(211-539)); pKNT25 Derivat (Ap ^r)	Dünnwald, 2014
pMW1076	Plasmid für die Expression von PASC-Kinase-T18 (DcuS(211-539)); pUT18 Derivat (Ap ^r)	Dünnwald, 2014
pMW1390	Plasmid für die Expression von His ₆ -DcuS; pBAD18-Kan Derivat (Kan ^r)	Witan, 2012
pMW1953	eYfp(A206K)-linker-DcuR Expressionsplasmid; pMW643 Derivat (Ap ^r , Tet ^r)	Scheu <i>et al.</i> , 2014
pMW2600	PASC-Kinase (Aminosäure 212-543) von DcuS in pET28a mit N-terminalen His-Tag zur Überexpression (Kan ^r)	Strecker, 2018
pMW2529	Plasmid für die Expression von DcuR-Strep (C-terminal) über HindIII/EcoRI zur Überproduktion mit AHT induzierbaren Promotor (Tet ^r , Ap ^r)	Dieser Arbeit
pMW3026	pMW764, mit <i>cfp-lacI</i> fusion und symetrischer LacI Bindestelle (Operator) an <i>dcuB</i> Promotor, eingebracht mittels Gibson Assembly	Wernet, 2019

Tab.A3: DcuS-Punktmutanten

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW2430	pMW181, aber DcuS(N353T), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2431	pMW181, aber DcuS(N353A),(Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2434	pMW181, aber DcuS(E350A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2438	pMW181, aber DcuS(F351A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2439	pMW181, aber DcuS(M352A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2829	pMW181, aber DcuS(Y373A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2830	pMW181, aber DcuS(Q382A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2831	pMW181, aber DcuS(G386A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2835	pMW181, aber DcuS(K354A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2836	pMW181, aber DcuS(G360A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2837	pMW181, aber DcuS(L361A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2838	pMW181, aber DcuS(L362A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2842	pMW181, aber DcuS(Y367A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2892	pMW181, aber DcuS(Y340L), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2892	pMW181, aber DcuS(L344Y), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2893	pMW181, aber DcuS(L361Y), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2894	pMW181, aber DcuS(R345G), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2895	pMW181, aber DcuS(K354L), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2896	pMW181, aber DcuS(V357T), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2897	pMW181, aber DcuS(P395D), (Kan ^r)	Diese Arbeit

Tab.A4 DcuS Plasmide, verwendet für das BACTH-System

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW3011	pMW1390, aber DcuS(H349A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3012	pMW1390, aber DcuS(E350A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3013	pMW1390, aber DcuS(N353A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3014	pMW1390, aber DcuS(K354A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3015	pMW1390, aber DcuS(G360A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3016	pMW1390, aber DcuS(L361A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW2979	pMW407, aber DcuS(H349A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2980	pMW407, aber DcuS(E350A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2981	pMW407, aber DcuS(N353A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2982	pMW407, aber DcuS(K354A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2983	pMW407, aber DcuS(G360A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2984	pMW407, aber DcuS(L361A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2999	pMW428, aber DcuS(H349A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW3000	pMW428, aber DcuS(E350A), (Ap ^r)	Diese Arbeit
pMW3001	pMW428, aber DcuS(N353A), (Ap ^r)	Diese Arbeit
pMW2904	pMW428, aber DcuS(N353T), (Ap ^r)	Diese Arbeit
pMW2905	pMW428, aber DcuS(K354A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2906	pMW428, aber DcuS(V357T), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2907	pMW428, aber DcuS(G360A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2908	pMW428, aber DcuS(L361A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW3002	pMW428, aber DcuS(L362A), (Ap ^r)	Wernet, 2019

pMW3003	pMW1075, aber DcuS(H349A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3004	pMW1075, aber DcuS(E350A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3005	pMW1075, aber DcuS(N353A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3006	pMW1075, aber DcuS(N353T), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3007	pMW1075, aber DcuS(K354A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3008	pMW1075, aber DcuS(V357T), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3009	pMW1075, aber DcuS(G360A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3010	pMW1075, aber DcuS(L361A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3025	pMW1075, aber DcuS(L362A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3027	pMW1076, aber DcuS(H349A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW3028	pMW1076, aber DcuS(E350A), (Ap ^r)	Diese Arbeit
pMW3029	pMW1076, aber DcuS(N353A), (Ap ^r)	Diese Arbeit
pMW3030	pMW1076, aber DcuS(N353T), (Ap ^r)	Diese Arbeit
pMW3031	pMW1076, aber DcuS(K354A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW3032	pMW1076, aber DcuS(V357T), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW3033	pMW1076, aber DcuS(G360A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2909	pMW1076, aber DcuS(L361A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW3034	pMW1076, aber DcuS(L362A), (Ap ^r)	Wernet, 2019

Tab.A5: DcuR Plasmide, verwendet für das BACTH-System.

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW2899	pMW427, aber DcuR(M12A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW2900	pMW427, aber DcuR(V13A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW2901	pMW427, aber DcuR(E15A), (Kan ^r)	Wernet, 2019

pMW2902	pMW427, aber DcuR(D56A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW3017	pMW427, aber DcuR(D8A), (Kan ^r)	Diese Arbeit
pMW3018	pMW427, aber DcuR(D9A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3019	pMW427, aber DcuR(N17A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3020	pMW427, aber DcuR(D56N), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3021	pMW427, aber DcuR(Y58A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3022	pMW427, aber DcuR(I81A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3023	pMW427, aber DcuR(L96A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW3024	pMW427, aber DcuR(K106A), (Kan ^r)	Wernet, 2019
pMW2863	DcuR über <i>Pst1/EcoR1</i> in pUT18C (N-T18), (Ap ^r)	Dieser Arbeit
pMW2985	pMW2863, aber DcuR(D8A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2986	pMW2863, aber DcuR(D9A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2987	pMW2863, aber DcuR(M12A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2988	pMW2863, aber DcuR(V13A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2989	pMW2863, aber DcuR(E15A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2990	pMW2863, aber DcuR(N17A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2991	pMW2863, aber DcuR(D56A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2992	pMW2863, aber DcuR(D56N), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2993	pMW2863, aber DcuR(Y58A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2994	pMW2863, aber DcuR(I81A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2995	pMW2863, aber DcuR(L96A), (Ap ^r)	Wernet, 2019
pMW2996	pMW2863, aber DcuR(K106), (Ap ^r)	Wernet, 2019

Tab. A6: Plasmide für EMSA-Studien.

Plasmid	Plasmidbeschreibung	Referenz
pMW2962	pBlueskriptK-, chromosomal isolierten und amplifizierten (0,6 kb) Promotorbereich von DcuB (<i>dcuBp1</i>) über <i>XbaI/EcoRI</i> , (Apr)	Diese Arbeit
pMW2963	pBlueskriptK-, chromosomal isolierten und amplifizierten (0,3 kb) Promotorbereich von DcuB (<i>dcuBp2</i>) über <i>XbaI/Sall</i> , (Apr)	Diese Arbeit
pMW2964	pBlueskriptK-, chromosomal isolierten und amplifizierten (0,5 kb) Promotorbereich (<i>dcuBp3</i>) über <i>XbaI/EcoRI</i> , (Apr)	Diese Arbeit

7.3 Primer

Tab. A7: Verwendete DcuS-Mutageneseprimer

Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Mutation
DcuS_E350A_r	CAATTTATTCATAAATGCGTGGGATCG	60,4	E350A
DcuS_E350A_f	CGATCCCACGCATTTATGAATAAATTG	60,4	E350A
DcuS_F351A_r	CAATTTATTCATAGCTTCGTGGGATCG	61,9	F351A
DcuS_F351A_f	CGATCCCACGAAGCTATGAATAAATTG	61,9	F351A
DcuS_M352A_r	ACATGCAATTTATTCGCAAATTCGTGG	60,4	M352A
DcuS_M352A_f	CCACGAATTTGCGAATAAATTGCATGT	60,4	M352A
DcuS_N353A_r	CACATGCAATTTAGCCATAAATTCG	58,1	N353A
DcuS_N353A_f	CGAATTTATGGCTAAATTGCATGTG	58,1	N353A
DcuS_N353T_r	CACATGCAATTTAGTCATAAATTCG	56,4	N353T
DcuS_N353T_f	CGAATTTATGACTAAATTGCATGTG	56,4	N353T
DcuS_K354A-f	CACGAATTTATGAATGCATTGCATGTGA	60,7	K354A
DcuS_K354A-r	TCACATGCAATGCATTCATAAATTCGTG	60,7	K354A
DcuS_L355A-f	TTATGAATAAAGCGCATGTGATTCTC	58,5	L355A
DcuS_L355A-r	GAGAATCACATGCGCTTTATTCATAA	58,5	L355A
DcuS_H356A-f	GAATAAATTGGCTGTGATTCTCGGAT	60,1	H356A
DcuS_H356A-r	ATCCGAGAATCACAGCCAATTTATTC	60,1	H356A
DcuS_V357A_f	TGAATAAATTGCATGCGATTCTCGGAT	60,4	V357A
DcuS_V357A_r	ATCCGAGAATCGCATGCAATTTATTCA	60,4	V357A
DcuS_I358A_f	ATTGCATGTGGCGCTCGGATTATTGC	64,8	I358A
DcuS_I358A_r	GCAATAATCCGAGCGCCACATGCAAT	64,8	I358A
DcuS_L359A_f	TGCATGTGATTGCCGATTATTGC	61,0	L359A
DcuS_L359A_r	GCAATAATCCGGCAATCACATGCA	61,0	L359A
DcuS_G360A_f	TGTGATTCTCGCATTATTGCATCTGA	60,1	G360A
DcuS_G360A_r	TCAGATGCAATAATGCGAGAATCACACA	60,1	G360A
DcuS_L361A-f	TGATTCTCGGAGCATTGCATCTGAAGA	63,4	L361A
DcuS_L361A-r	TCTTCAGATGCAATGCTCCGAGAATCA	63,4	L361A
DcuS_L362A_f	ATTCTCGGAGCATTGCATCTGAAGA	61,3	L362A
DcuS_L362A_r	TCTTCAGATGCAATGCTCCGAGAAT	61,3	L362A
DcuS_H363A_f	TTCTCGGATTATTGGCTCTGAAGAGT	61,6	H363A
DcuS_H363A_r	ACTCTTCAGAGCCAATAATCCGAGAA	61,6	H363A
DcuS_K365A_f	ACTGCTTATAACTCGCCAGATGCAATA	61,9	K365A
DcuS_K365A_r	TATTGCATCTGGCGAGTTATAAGCAGT	61,9	K365A

DcuS_S366A_f	TTGCATCTGAAGGCTTATAAGCAGTTGG	63,7	S366A
DcuS_S366A_r	CCAACTGCTTATAAGCCTTCAGATGCAA	63,7	S366A
DcuS_Y367A_f	GCATCTGAAGAGTGCTAAGCAGTTGGA	65,0	Y367A
DcuS_Y367A_r	TCCAACTGCTTAGCACTCTTCAGATGC	65,0	Y367A
DcuS_D372A-f	GCAGTTGGAAGCTTACATTCTCAAAA	60,1	D372A
DcuS_D372A-r	TTTTGAGAATGTAAGCTTCCAAGTGC	60,1	D372A
DcuS_Y373A-f	AGCAGTTGGAAGATGCCATTCTCAAAA	61,9	Y373A
DcuS_Y373A-r	TTTTGAGAATGGCATCTTCCAAGTGC	61,9	Y373A
DcuS_T377A-f	ACATTCTCAAAGCAGCCAATAACTAT	58,5	T377A
DcuS_T377A-r	ATAGTTATTGGCTGCTTTGAGAATGT	58,5	T377A
DcuS_Q382A_f	CAATAACTATGCGGAAGAGATTGGCT	61,6	Q382A
DcuS_Q382A_r	AGCCAATCTCTCCGCATAGTTATTG	61,6	Q382A
DcuS_I385A_f	ATCAGGAAGAGGCTGGCTCTCTGCTG	68,0	I385A
DcuS_I385A_r	CAGCAGAGAGCCAGCCTCTTCTGAT	68,0	I385A
DcuS_G386A_f	AGGAAGAGATTGCCTCTCTGCTGGGT	66,4	G386A
DcuS_G386A_r	ACCCAGCAGAGAGGCAATCTCTTCT	66,4	G386A
DcuS_S387A_f	AAGAGATTGGCGCTCTGCTGGGTAAAGA	66,5	S387A
DcuS_S387A_r	TCTTACCCAGCAGAGCGCCAATCTCTT	66,5	S387A
DcuS_Y340L_f	ACGGTCTGGTCAACTTAGCTGACGC	61	Y340L
DcuS_Y340L_r	GCGTCAGCTAAGTTGACCAGACCGT	61	Y340L
DcuS_D342T_f	TGGTCAACTATGCTACCGCACTTCG	59,3	D342T
DcuS_D342T_r	CGAAGTGCGGTAGCATAGTTGACCA	59,3	D342T
DcuS_D342G_f	TCTGGTCAACTATGCTGGCGCACTT	59,3	D342G
DcuS_D342G_r	AAGTGCGCCAGCATAGTTGACCAGA	59,3	D342G
DcuS_L344Y_f	TCAACTATGCTGACGCATATCGTGAA	56,4	L344Y
DcuS_L344Y_r	TTCACGATATGCGTCAGCATAGTTGA	56,4	L344Y
DcuS_L361Y_f	GCATGTGATTCTCGGATATTTGCATCTG	58,5	L361Y
DcuS_L361Y_r	CAGATGCAAATATCCGAGAATCACATGC	58,5	L361Y
DcuS_R345G_f	ATGCTGACGCACTTGGTGAACGATC	59,3	R345G
DcuS_R345G_r	GATCGTTCACCAAGTGCCTCAGCAT	59,3	R345G
DcuS_K354L_f	CCCACGAATTTATGAATACTTTGCATGT	55,5	K354L
DcuS_K354L_r	ACATGCAAAGTATTCATAAATTCGTGGG	55,5	K354L
DcuS_V357T_f	ATGAATAAATTGCATACGATTCTCGGAT	54,1	V357T
DcuS_V357T_r	ATCCGAGAATCGTATGCAATTTATTCAT	54,1	V357T
DcuS_S366L_f	CATCTGAAGCTTTATAAGCAGTTGGA	54,3	S366L
DcuS_S366L_r	TCCAACTGCTTATAAAGCTTCAGATG	54,3	S366L
DcuS_S394L_f	GGGTAAGATCAAACCTCCGGTTATC	56	S394L
DcuS_S394L_r	GATAACCGGAAGTTTGATCTTACCC	56	S394L
DcuS_P395D_f	GGTAAGATCAAATCTGACGTTATCGCT	56,7	P395D
DcuS_P395D_r	AGCGATAACGTCAGATTTGATCTTACC	56,7	P395D
DcuS_I374N_f	CAGTTGGAAGATTACAATCTCAAACAG	55,5	I374N
DcuS_I374N_r	CTGTTTTGAGATTGTAATCTTCCAAGT	55,5	I374N
DcuS_G360N_f	AATTGCATGTGATTCTCAACTATTGCA	54,7	G360N
DcuS_G360N_r	TGCAATAAGTTGAGAATCACATGCAATT	54,7	G360N
DcuS_G386N_f	ATCAGGAAGAGATTAAGTCTCTGCTGG	58	G386N
DcuS_G386N_r	CCAGCAGAGAGTTAATCTCTTCTGAT	58	G386N

Tab. A8: Verwendete DcuR-Mutagenese primer

Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Mutation
DcuR_M12A_f	ATGACGACGCAGCGGTCGCGGAGC	71,3	M12A
DcuR_M12A-r	GCTCCGCGACCGCTGCGTCGTCAT	71,3	M12A
DcuR_V13A_f	ACGACGGAATGGCCGCGGAGCTGAA	69,5	V13A
DcuR_V13A_r	TTCAGCTCCGCGGCCATTGCGTCGT	69,5	V13A
DcuR_E15A_f	ATGGTCGCGGCGCTGAATCGCCGATA	69,5	E15A
DcuR_E15A_r	TATCGGCGATTACAGCGCCGCACCAT	69,5	E15A
DcuR_L16A_f	GTCGCGGAGGCGAATCGCCGATACGT	71,1	L16A
DcuR_L16A_r	ACGTATCGGCGATTGCGCTCCGCGC	71,1	L16A
DcuR_D56A_f	GATATTGCTCGCTATCTATATGCAA	58,5	D56A
DcuR_D56A_r	TTTGCATATAGATAGCGAGCAATATC	58,5	D56A

Tab. A9: Primer für die Konstruktion von Plasmiden für die DNA-Bindungsstudien.

Name	Sequenz (5'-3')	Tm [°C]	Schnittstelle
Chr_DcuB-for	ACAAATGGGTAGATCAGATTAATCTATAAACCT	62,5	
Chr_DcuB-rev	CCGATGCCGCCACCACCGCAATGATAAC	65,1	
DcuR_(EcoRI)_for	CGTATAGAATTCATATGATCAATGTATTAATTAT	61	<i>EcoRI</i>
DcuR_(HindIII)_rev	CGTATAAAGCTTTTATTGGCAATATTGTTTCAGTAG	63	<i>HindIII</i>
Pst1_dcuR_for(CT18)	GCCCTGCAGCATGATCAATGTATTAATTA	62,4	<i>Pst1</i>
EcoRI_dcuR_rev(CT18)	ACGAATTCTTATTGGCAATATTGTTTCAGTAGTGAG	64,9	<i>EcoRI</i>
Xba1_pdcuB1_for	CCTCTAGACTGGCTGGTCAACTGCCACATCT	65,7	<i>Xba1</i>
EcoR1_pDcuB1_rev	GGGGAATTCTCGCGATAATCCTATTTAAATTT	56	<i>EcoRI</i>
Sall_pdcuB2_rev	CCTCTAGACTACCGTAATGCAAATACCCCTG	63,1	<i>Sall</i>
Xba1_pdcuB3_for	GTCGACAATCTGATCTACCCATTTGTGGGTAA	61	<i>Xba1</i>
Cy5-dcuB1_f	[Cyanine5]GGCTGGTCAACTGCCACATCTTGTT	72	

7.4 Medien, Lösungen und Puffer

Wenn nötig wurden Zuchtmedien, Zusätze und Puffer vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 Min) oder sterilfiltriert. Angesetzt wurden alle Komponenten in dest. H₂O.

7.4.1 Medien und Antibiotika

LB-Medium (Sambrook und Russell, 2001)

10 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

LB-Agar

15 g/l Agar-Agar in LB-Medium

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

26,64 g/l SOB-Medium

20 mM Glucose

Glycerin-MOPS

1 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)

15 % Glycerin

eM9-Minimal-Medium (Miller,1992; Kim *et al.*,2007)

10x M9-Stammlösung: 75 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O

30 g/l KH₂PO₄

10 g/l NH₄Cl

5 g/l NaCl

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt

Zusätze vor Anwendung: 10 ml/l CaCl₂ (10 mM)

10 ml/l AHC (10 %)

5 ml/l L-Tryptophan (1 %)

Elektronenakzeptor und Kohlenstoffquelle: 20 mM Dimethylsulfoxid (DMSO)

50 mM Glycerin

Effektor: 20 mM Na₂Fumarat, pH7,0

Die Zusätze sowie der Elektronenakzeptor, die Kohlenstoffquelle und der Effektor wurden getrennt angesetzt, autoklaviert und vor Anwendung zu der Stammlösung gegeben.

eM9-X-Gal-Agar

eM9-Medium plus 20 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal)
15 g/l Agar-Agar

10x PBS-Puffer, pH7,5

1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

20 mM KH₂PO₄

Induktoren (Stammlösung)

1 M Isopropyl-β-D-thiogalaktipyransid (IPTG)

1 M L(+)-Arabinose

1 M Anhydrotetracyclin (AHT)

Antibiotika

Tab. A10 Antibiotika und deren Endkonzentrationen. Beim Einsatz mehrerer Antibiotika wurde deren Konzentration halbiert

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Kanamycinsulfat	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in H ₂ O	15 µg/ml

7.4.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen verwendet für β-Galaktosidase Test (Miller, 1992)

Lösungen für den β-Galaktosidase Test:

4 mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG)

1 M Na₂CO₃

β-Galaktosidase Reaktionspuffer, pH7:

- 100 mM Kaliumphosphat-Puffer
- 10 mM KCl
- 1 mM MgCl₂
- 0,005 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
- 0,0025 % (w/v) Natriumdesoxycholat (SDC)
- 5 mM Dithiothreitol (DTT)

Puffer und Lösungen verwendet für SDS-Gelelektrophorese10x Laufpuffer

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

Trenngelpuffer:

- 1,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer:

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

SDS-Gel	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (6,5%)
Trenngelpuffer	4,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,1 ml
dest. H ₂ O	5,7 ml	4,7 ml
10% SDS	180 µl	81 µl
10% APS	72 µl	33 µl
TEMED	36 µl	22 µl
Rotiophorese 30	7,5 ml	1,9 ml

2x SDS-Ladepuffer:

- 100 mM Tris/HCl (pH 6,8)
- 200 mM DTT
- 4% (w/v) SDS
- 0,2% (w/v) Bromphenolblau
- 20% (v/v) Glycerin

SDS-Proteinfärbung:

0,5% Coomassie Brilliant Blue

10% (v/v) Eisessig

50% (v/v) Ethanol

Puffer und Lösungen, verwendet für Semi-Dry Western-Blotting (Towbin et al., 1979)

Transferpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

20% Ethanol (v/v)

Blockingpuffer:

3% (w/v) „Bovine Serum Albumin“ (BSA)

0,1% (v/v) Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20) in 1 x PBS

Waschpuffer:

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

Antikörperlösung:

3 % (w/v) BSA

0,1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS zuzüglich Antikörper

Primärantikörper:

Anti-DcuS-PD (IgG-Fraktion aus Kaninchen),
gegen die periplasmatische Domäne von DcuS (Müller, 2007)

Verdünnung 1:20.000

Penta-His-Antikörper (IgG1-Fraktion aus Maus (Qiagen))

Verdünnung 1:5.000-1:10.000

Strep-Antikörper, HRP-Konjugat (IBA)

Verdünnung 1:100

Sekundärer Antikörper:

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

Verdünnung 1:20.000

Anti-IgG gegen Maus, HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich)

Verdünnung 1:5.000

Chemilumineszenz-Entwicklung:

Substrat: Immobilon Western HRP Substrat (Merck Millipore, Darmstadt)

Filme: LucentBlue, 13x18 cm (Advansta, Menlo Park, CA, USA)

Puffer, verwendet für die Überexpression von DcuS, PASC-Kinase und DcuR

Puffer 1 zur Resuspension

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

10 mM MgCl₂

Puffer 2 zur Homogenisierung

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

10 mM Imidazol, pH 7

0,5 M NaCl

10 % Glycerin

Puffer 3 zur Equilibrierung

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

20 mM Imidazol, pH 7

0,5 M NaCl

10 % Glycerin

0,04 % LDAO

Puffer 4 zur Elution

Wie Puffer 3, mit Zusatz von 500 mM Imidazol, pH7

Puffer 5 zur Dialyse

Wie Puffer 4, nur ohne Imidazol

Phosphorylierungspuffer, verwendet für die Phosphorylierung von rek. Volllänge-DcuS und PAsC-Kinase.

50 mM Tris/HCl, pH 7,7

1% Glycerin

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

20 mM Fumarat wurde dazugegeben, nur zu Versuche in welcher volllänge rek. DcuS verwendet wurde.

Chemische Phosphorylierungspuffer, verwendet für die Phosphorylierung von DcuR

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

50 mM Carbamoylphosphat oder Acetylphosphat

1% Glycerin

5 mM MgCl₂

Puffer, verwendet für die Gel Filtration (SEC). Die Puffer wurden durch Ultraschal entgast.

SEC Laufpuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

0,5 M NaCl

SEC Reinigungspuffer

0,1 M NaOH (1/5 Säulenvolumen)

1 M Essigsäure (1/5 Säulenvolumen)

Äquilibrieren mit SEC Laufpuffer

Puffer, verwendet für Protein-DNA Bindungsstudien (EMSA)

2 x Phosphorylierungspuffer (P-Puffer)

100 mM Tris/HCl, pH7,7

10 mM MgCl₂

2 mM DTT

5 x Bindungspuffer (BP-Puffer)

250 mM Tris/HCl, pH7,7

250 mM KCl

50 mM MgCl₂

0,5 mM EDTA

27,5 % Glycerin

Vor jedem Versuch ist frisch anzusetzen und zu dem BP-Puffer dazuzugeben:

5 µg/ ml Salmon Sperm DNA (davor in dest. H₂O lösen)

100 mM DTT

2 x DNA-Auftragungspuffer

100 mM Tris/HCl, pH7

20 % Glycerin

0,2% Coomassie brilliant blue

5%-ige Polyacrylamid Gele

5 ml 10 x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)

8,3 ml 30% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid (Rotiophores 30)

350 µl 10 % APS

17,5 µl TEMED

36 ml H₂O

Puffer, verwendet für Microscale Thermophorese und thermische Entfaltung

2x Reaktionspuffer

100 mM Tris/HCl, pH7,7

10 mM MgCl₂

2 mM DTT

7.5 Chemikalien

Tab.6: **Verwendete Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar, Kobe I	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
[γ^{33} -P]-ATP	Hartmann Analytic
ATP	Roth
Ampicillin-Dinatriumsalz	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Roth
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	AppliChem
Calciumchlorid	AppliChem
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dinatriumfumarat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Ethanol	VWR Chemicals
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Glycerin	Roth

Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
LB-Medium (Lennox)	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
3-N-Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumdesoxycholat	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
o-Nitrophenyl-D-galactopyranosid (ONPG)	Roth
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Roth
Säurehydrolysiertes Casein (AHC)	Gibco
SOB-Medium	Roth
Tetracyclin Hydrochlorid	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
L-Tryptophan	Serva

7.6 Abbildungen

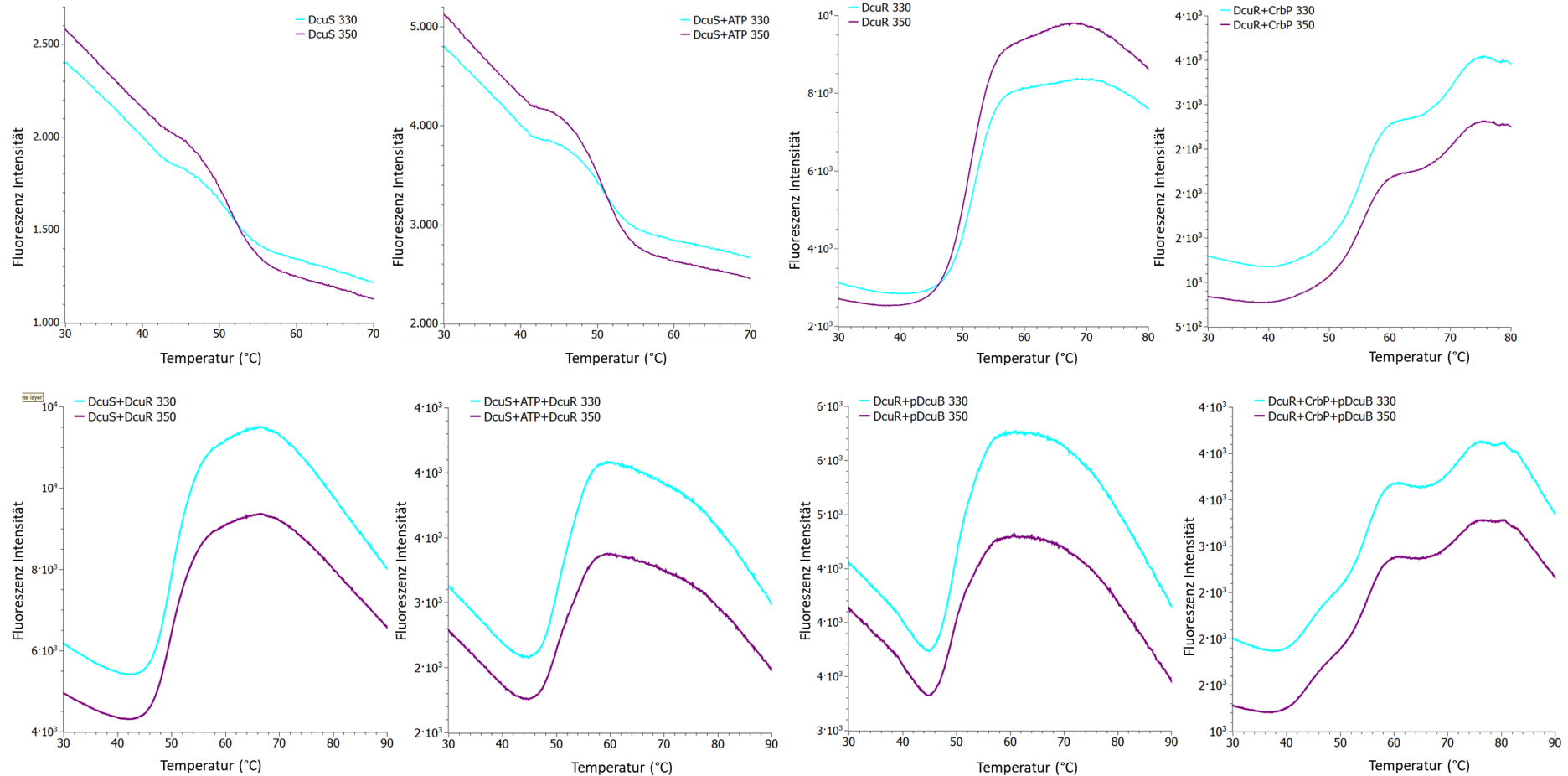


Abb. A1: Fluoreszenz Intensität gemessen bei 330 nm und 350 nm. Blaue und violette Linien heben die Wellenlängen hervor, bei denen Prometheus Fluoreszenz detektiert wurde (blaue Linie für 330 nm, violette Linie für 350 nm) und die resultierende Fluoreszenzintensität gemessen über der Temperatur. Die Fluoreszenz nimmt im Allgemeinen mit steigender Temperatur ab. Zusätzlich zu dieser allgemeinen Abnahme können charakteristische Wölbungen bei der Entfaltung des Proteins beobachtet werden.

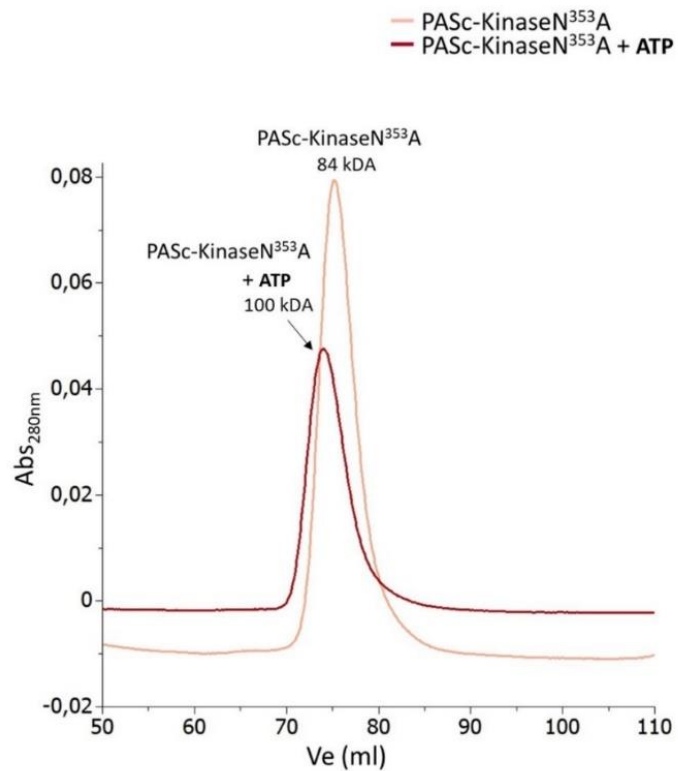


Abb. A1: SEC-Profil von phosphorylierter und nicht-phosphorylierter PASC-KinaseN353A. Versuchsanordnung, Durchführung und Auswertung wie bereits in Abschnitt 4.1.1 dargestellt. Die Massenkonzentration an injiziertem PASC-KinaseN353A betragen mindestens 2-2,5 mg/ml (Stoffmengenanteil 1:2 wobei 1= 42,64 μ M). Sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte PASC-KinaseN353A (dunkel und hell orangene Linie) zeigt das gleiche SEC-Profil und Strecke wie die PASC-Kinase.

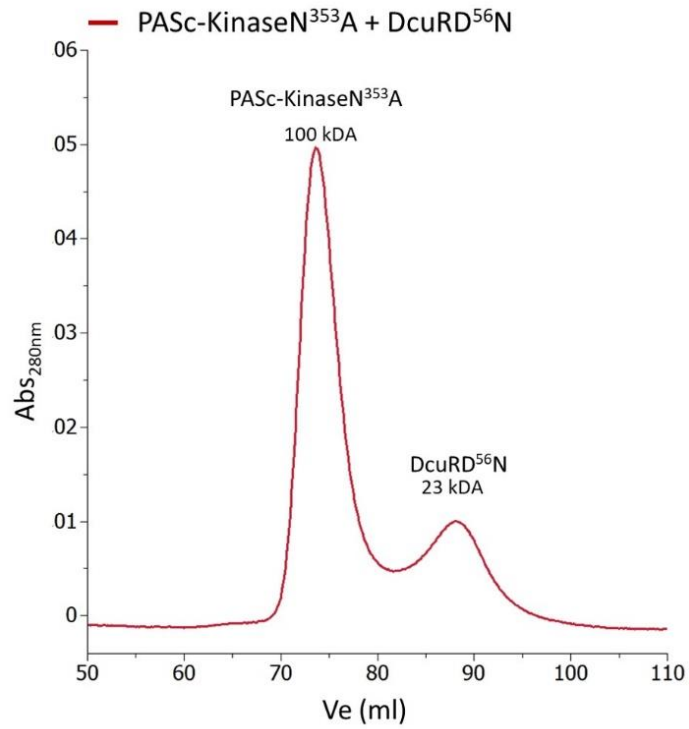


Abb. A2. SEC-Profil von nicht-phosphorylierter PASC-KinaseN353A mit DcuRD56N. Die Massenkonzentration an injiziertem DcuRD56N und PASC-KinaseN353A betrug mindestens 2-2,5 mg/ml (Stoffmengenanteil 1:2 wobei 1= 42,64 μ M). Beide Proteine wurden zu den Komplexpuffer gegeben und bei 25 °C für 10 Min inkubiert. Die Laufprofile sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängig durchgeführten Gelpermeationsläufen.

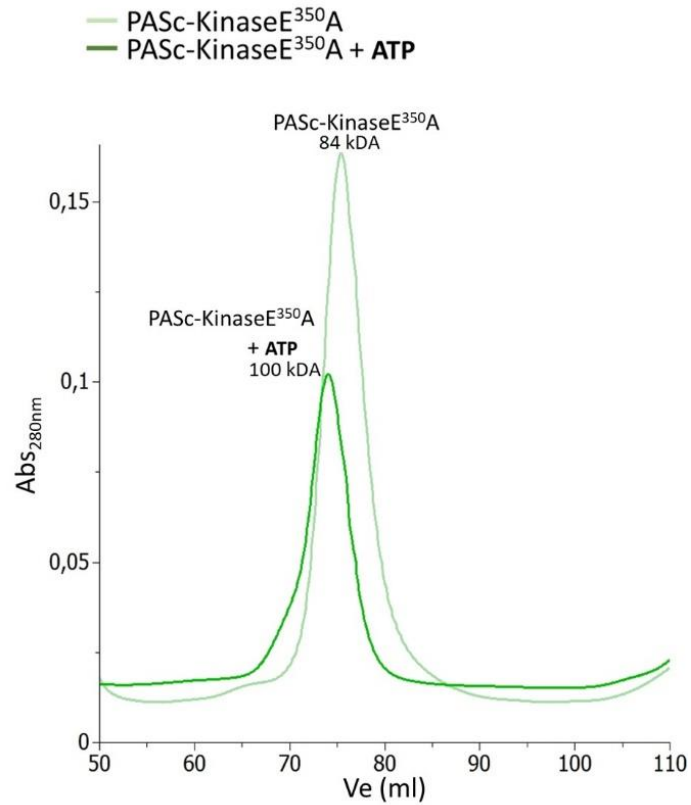


Abb. A3: SEC-Profil von phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes PASC-KinaseE350A. Die Stoffmenge an injizierter PASC-KinaseE350A betrug 52 nmol. Die Phosphorylierung von PASC-KinaseE350A erfolgte 10 Min mit dem Phosphorylierungspuffer und die Gelpermeation wurde in SEC-Puffer durchgeführt. Sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte PASC-KinaseE350A (dunkel und hell orangene Linie) zeigt das gleiche SEC-Profil und Strecke wie die PASC-Kinase.

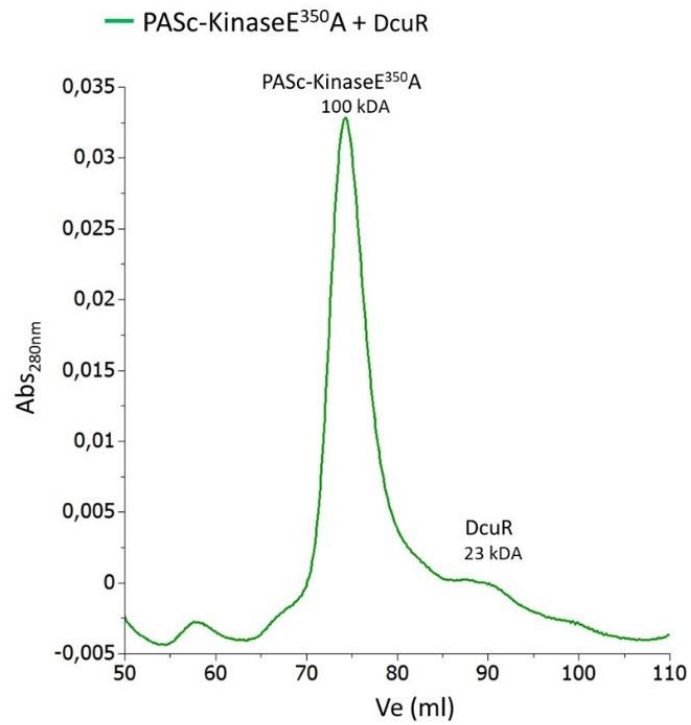


Abb. A4: SEC-Profil von nicht-phosphorylierter PASC-KinaseE350A mit DcuRD56N Die Massenkonzentration an injiziertem DcuRD56N und PASC-KinaseN353A betragen mindestens 2-2,5 mg/ml (Stoffmengenanteil 1:2 wobei 1 = 42,64 μ M). Beide Proteine wurden zu den Komplexpuffer gegeben und bei 25 °C für 10 Min inkubiert.

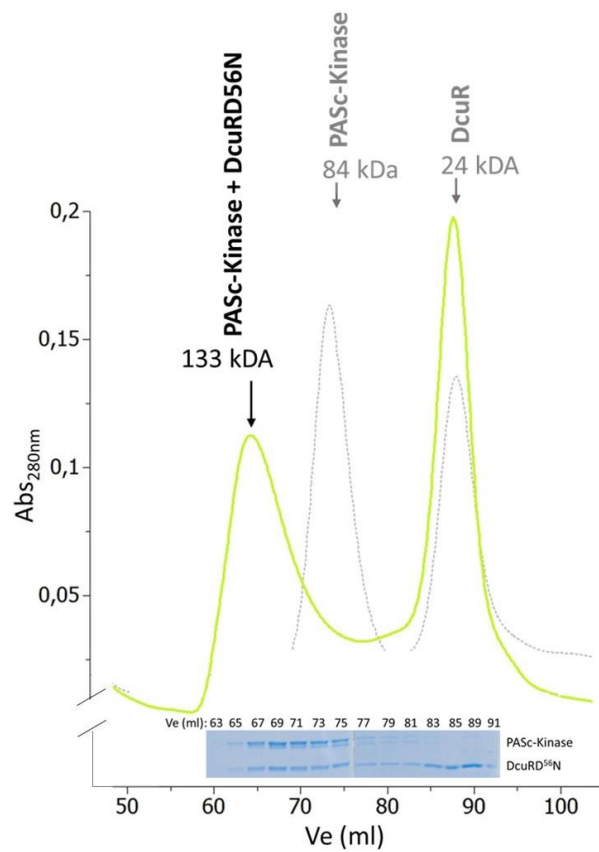


Abb. A5: SEC-Profil von PASC-Kinase + DcuRD56N. Versuchsanordnung, Durchführung und Auswertung wie bereits in Abb.1 dargestellt (Grau: Laufprofile nicht-phosphorylierter PASC-Kinase und DcuR als Referenz). Die Massenkonzentration an injiziertem DcuR und PASC-Kinase betragen mindestens 2-2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Stoffmengenanteil 1:1). Beide Proteine wurden zu den Phosphorylierungspuffer gegeben und bei 25 °C für 10 Min inkubiert. Die Laufprofile sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängig durchgeführten Gelpermeationsläufen.

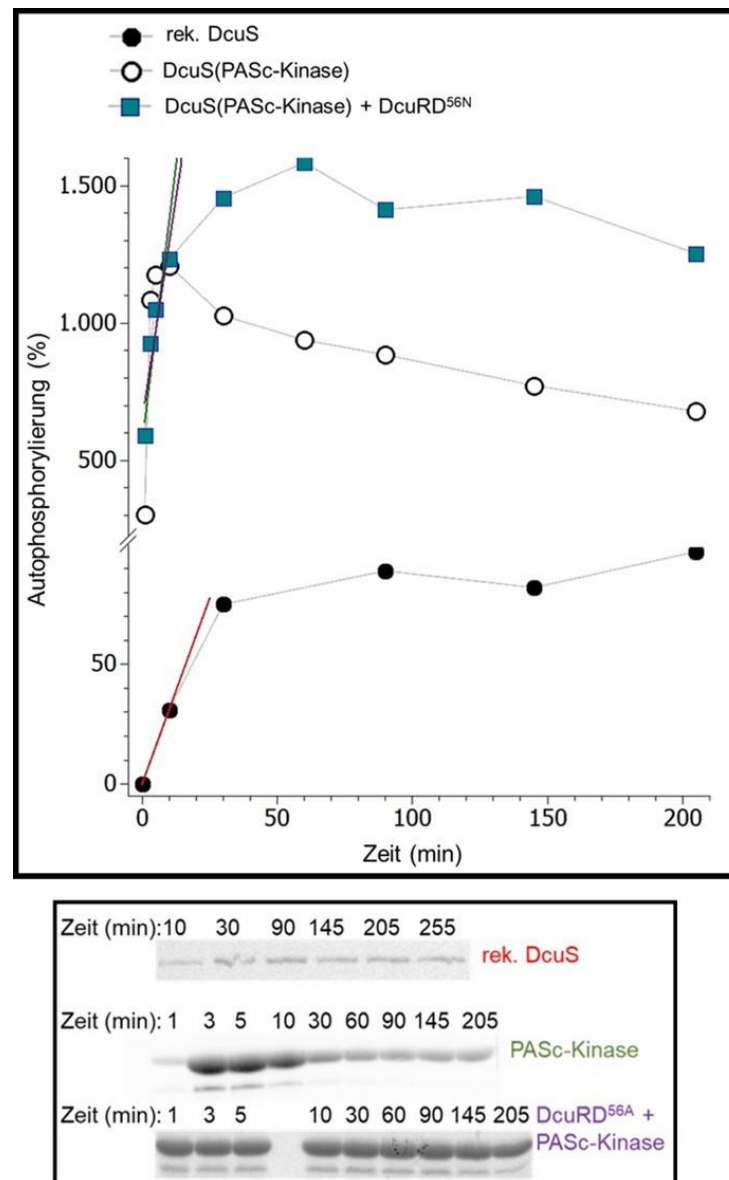


Abb. A6: Unterschied in der relativen Autophosphorylierung von rek. DcuS und PASC-Kinase mit und ohne die Anwesenheit von DcuRD^{56N}. DcuS (6 μ M) und PASC-Kinase (12 μ M) wurden in Phosphorylierungspuffer für 45 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Autophosphorylierungsreaktion wurde mit der Zugabe an 0,14 μ M [γ ³³P] –ATP gestartet, welches mit unmarkiertem ATP ergänzt wurde (zu 10 μ M ATP insgesamt). Zusätzlich wurde zu einem zweiten Ansatz von PASC-Kinase DcuRD^{56N} (12 μ M) dazugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μ l Probe von dem Reaktionsgefäß entnommen, zu der Stopp-Lösung gegeben und per SDS-PAGE aufgetrennt. Daraufhin wurden die radioaktiven Gele auf die Phosphoimagerplatte gelegt und für 16-19 h inkubiert.

	IR On	IR Det	K _D (nM)
eYfp-DcuR + PASC-Kinase	Blau	Blau	114 ± 5,8
eYfp-DcuR-P + PASC-Kinase	Blau	Blau	28 ± 6,5
eYfp-DcuR + PASC-KinaseN353A	Blau	Blau	89 ± 0,7
eYfp-DcuR-P + PASC-KinaseN353A	Blau	Blau	87 ± 0,5
eYfp-DcuR + PASC-KinaseE350A	Blau	Blau	80 ± 19
eYfp-DcuR-P + PASC-KinaseE350A	Blau	Blau	61 ± 6
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR	Rot	Rot	2642 ± 954
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR-P	Rot	Rot	10643 ± 4414
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR	Blau	Blau	1,07
cy5-dcu Bp + DcuRD56N	Rot	Rot	3542 ± 1265
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR + PASC-Kinase	Blau	Blau	78 ± 4
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR + PASC-Kinase	Blau	Rot	505 / 1311
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR + PASC-Kinase	Rot	Rot	1241 ± 66
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR + PASC-Kinase	Rot	Blau	174
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR-P + PASC-Kinase	Blau	Blau	1564 ± 75
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR-P + PASC-Kinase	Blau	Rot	4126
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR-P + PASC-Kinase	Rot	Rot	343 ± 4
cy5-dcu Bp + eYfp-DcuR-P + PASC-Kinase	Rot	Blau	4422

Abb. A7: Zusammenfassung der K_D-Werte bestimmt durch MST. Fluoreszenz-markiert wurden DcuR (eYfp-Linker-DcuR) und der Promotor *dcuBp1* (Cy5-*dcuBp1*). Die Konzentration des fluoreszenz-markierten Moleküls wurde konstant gehalten (200 nM oder 300 nM für Cy5-*dcuBp1* und 50-100 nM für eYfp-Linker-DcuR). Die Verfolgung der Bindungsreaktion wurde entweder über der Fluoreszenz von eYfp-Linker-DcuR (blauer markiert) oder über Cy5-*dcuBp1* (rot markiert) angeregt (IR ON) und/ oder detektiert (IR Det).

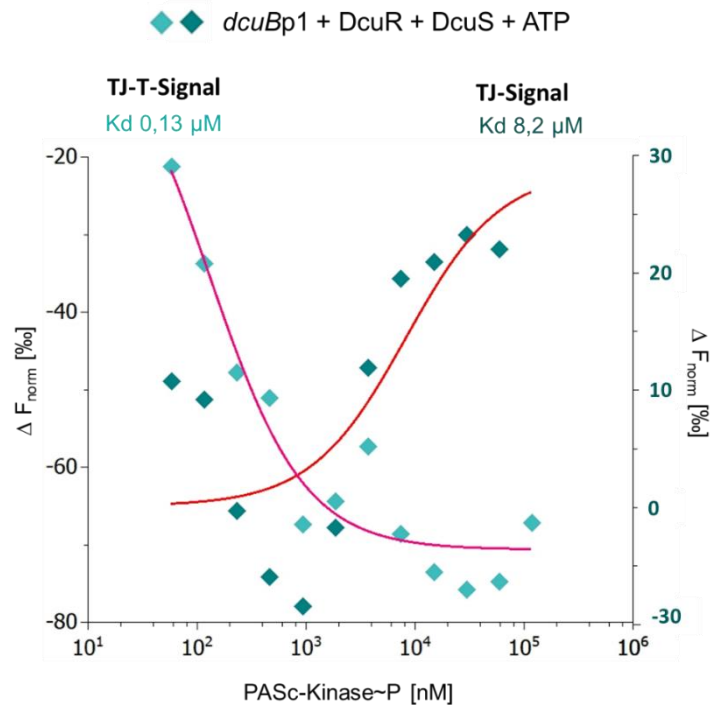


Abb. A8: Einfluss von phosphorylierter PASC-Kinase auf die Protein-DNA Interaktion (gemessen durch das Signal des Promotors). Zuerst wurde die Bindung von eYfp-Linker-DcuR (40 μ M) an *dcuBp* (150 nM) durchgeführt, indem das Gemisch für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde zu dem konstant gehaltenen DcuR-*dcuBp1*-Komplex phosphorylierte PASC-Kinase (1 mM) von 10^{-1} bis 10^6 nM und das Gemisch wurde für weitere 30 Min inkubiert. Die Titration von PASC-Kinase-P zu DcuR-*dcuBp1* Komplex, bei er Auswertung in TJ+T-Modus, bewirkt zuerst die Abnahme in der Fluoreszenz von [B*] aber ab einer Konzentration an PASC-Kinase $> 10^3$ nM nimmt die Fluoreszenz von [B*] wieder leicht an. Wird nur der TJ-Signal zur berechnung der K_d verfolgt, nimmt das Signal der Fluoreszenz von [B*] zu und übertritt den Anfangssignal. Die zwei Bindungsereignisse: eines mit niedriger Affinität ($K_d = 8219$ \times 6; dunkelgrüne Rauten; rechte Y-Achse) und eines mit hoher Affinität ($K_d = 130$ nM; \times 7 ; hellgrüne Rauten; linke Y-Achse).

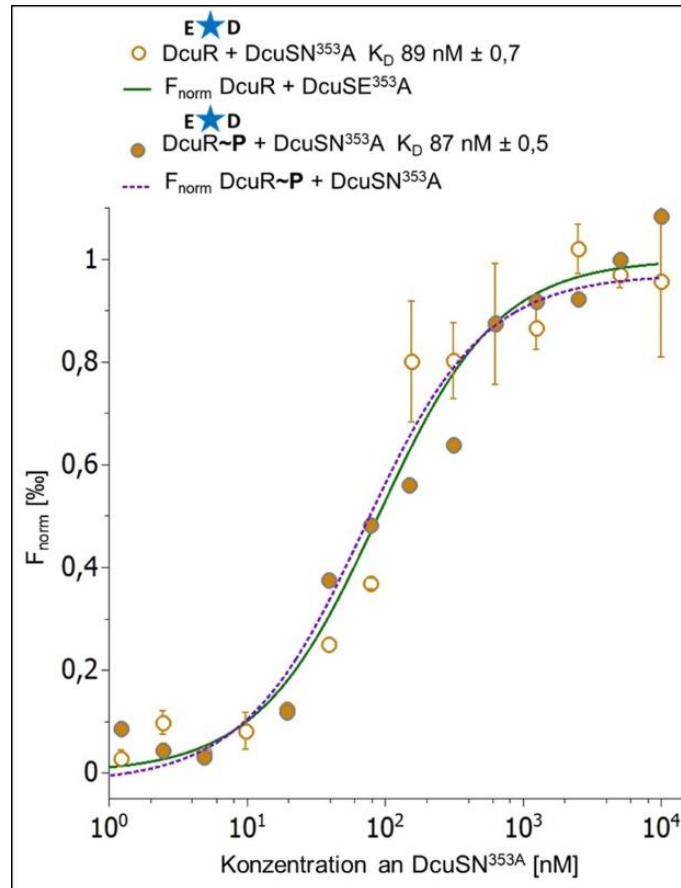


Abb. A9: Einfluss der Punktmutationen PAsc-KinaseN353A auf die Protein-Protein Interaktion in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand von DcuR. Als Modalität wurde T+TJ verwendet und für die Kurvenanpassung wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet. Die Bindungsreaktion wurde über der Fluoreszenz von eYfp-Linker-DcuR (blauer Stern über DcuR) angeregt (E) und detektiert (D). Zu dem konstant gehaltenen, eYfp-Linker-DcuR (offene Kreise) und eYfp-Linker-DcuR-P (geschlossene Kreise) wurde von 10^{-1} bis 10^4 nM PAsc-KinaseN353A dazu titriert. Die Proteine wurden bei 25 °C für 10 Min inkubiert. Das Signal für die Komplexbildung zwischen PAsc-KinaseN353A mit eYfp-Linker-DcuR ist durch die Abnahme der Fluoreszenz von DcuR in der gebundenen Form gekennzeichnet (Aufgrund der Darstellungsform F_B ist die Richtung der Amplitude normiert und zeigt nur positive Werte). Die Affinität von eYfp-Linker-DcuR für PAsc-KinaseN353A beträgt $89 \pm 0,7$ nM und für eYfp-Linker-DcuR-P und PAsc-KinaseN353A $87 \pm 0,5$ nM ($n=2$, $x=15$).

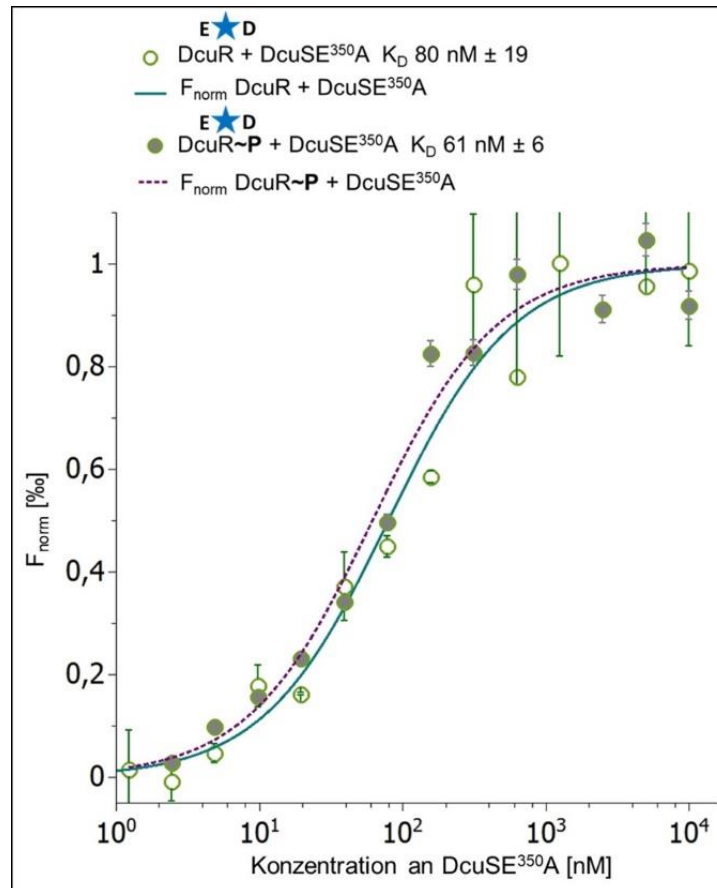


Abb. A10: Einfluss der Punktmutationen PASC-KinaseE350A auf die Protein-Protein Interaktion in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand von DcuR. Als Modalität wurde T+TJ verwendet und für die Kurvenanpassung wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet. Die Bindungsreaktion wurde über der Fluoreszenz von eYfp-Linker-DcuR (blauer Stern über DcuR) angeregt (E) und detektiert (D). Zu dem konstant gehaltenen, eYfp-Linker-DcuR (offene Kreise) und eYfp-Linker-DcuR-P (geschlossene Kreise) wurde von 10^{-1} bis 10^4 nM PASC-KinaseE350A dazu titriert. Die Proteine wurden bei 25 °C für 10 Min inkubiert. Das Signal für die Komplexbildung zwischen PASC-KinaseN353A mit eYfp-Linker-DcuR ist durch die Abnahme der Fluoreszenz von DcuR in der gebundenen Form gekennzeichnet (Aufgrund der Darstellungsform F_B ist die Richtung der Amplitude normiert und zeigt nur positive Werte). In Vergleich dazu ist die Affinität zwischen eYfp-Linker-DcuR und PASC-KinaseE350A 80 ± 19 nM und zwischen eYfp-Linker-DcuR-P und PASC-KinaseE350A 61 ± 6 nM ($n=2$, $x=15$).

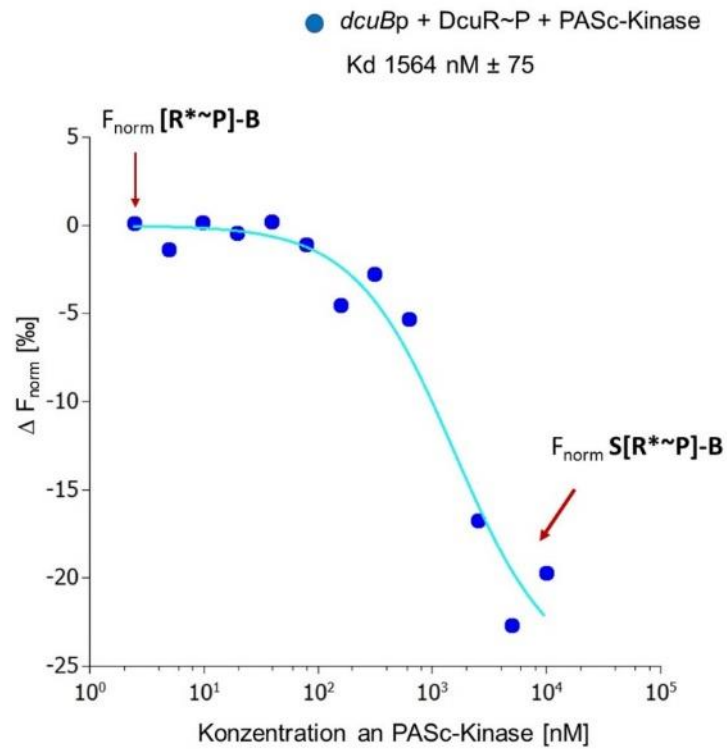


Abb. A11: Unterschied in der Bindungsaffinität von DcuR und DcuRD56N an der DNA. Zu dem konstant gehaltenen, cy5-markiertem Promotor *dcuBp* (200 nM) wurde von 10^{-2} bis 10^6 nM DcuR (offene Kreise, Fit: grüner Linie) oder DcuRD^{56N} dazu titriert (offene Raute, Fit: rote Linie). Die Bindungsreaktion wurde über der Fluoreszenz von eYfp-Linker-DcuR (blauer Stern über DcuR) angeregt (E) und detektiert (D). Die Affinität von *dcuBp* zur nicht-phosphoryliertem Antwortregulator DcuR beträgt 2642 ± 954 nM ($n=3$, $x=12$) und die Amplitude der Fluoreszenz erreicht nur 15 %. Im Vergleich dazu beträgt die Affinität von DcuRD56N 3542 ± 1265 nM ($n=2$, $x=12$). Alle Werte wurden mit dem Faktor 1000 multipliziert und ergeben die Fluoreszenz der gebundenen Fraktion (F_B) pro Tausend [%]).

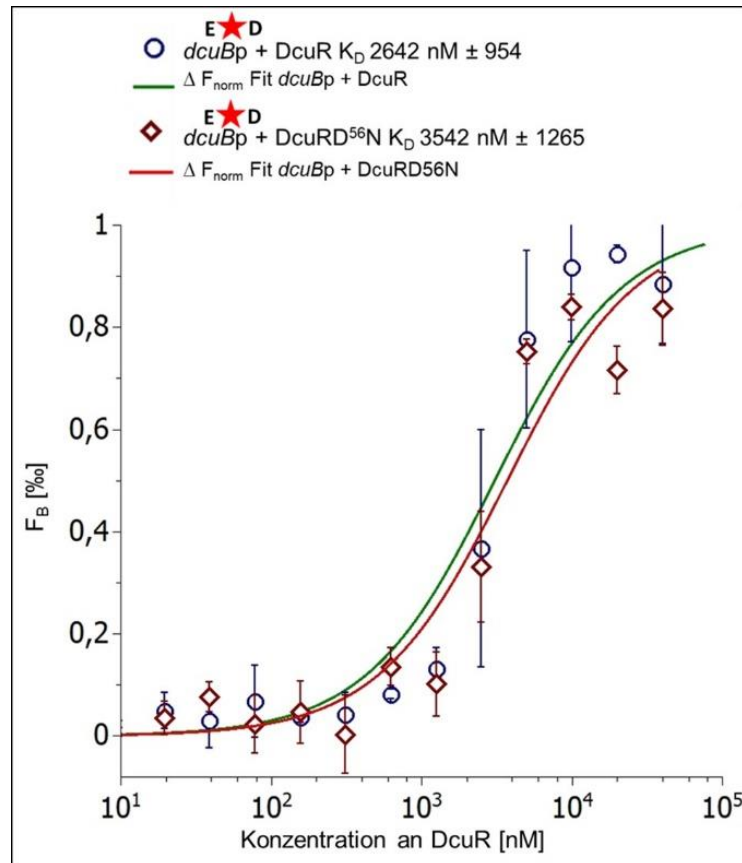


Abb. A12: Einfluss von PASC-Kinase auf die Bindung zwischen eYfp-Linker-DcuR und *dcuBp1* verfolgt über der Fluoreszenz von eYfp-Linker-DcuR. Das Fluoreszenzsignal wurde über den phosphorylierten eYfp-Linker-DcuR [R*-P] sowohl angeregt als auch detektiert. Sonst wurde der Versuch, wie für Abb.28 beschrieben durchgeführt. Die Titration von PASC-Kinase zu DcuR-P-*dcuBp1* Komplex zeichnet sich durch die Starke Abnahme der Fluoreszenz von [R*-P] und eine sehr hohe Affinität ($K_d = 1564 \pm 75$ nM ($n=2, x=12$)).

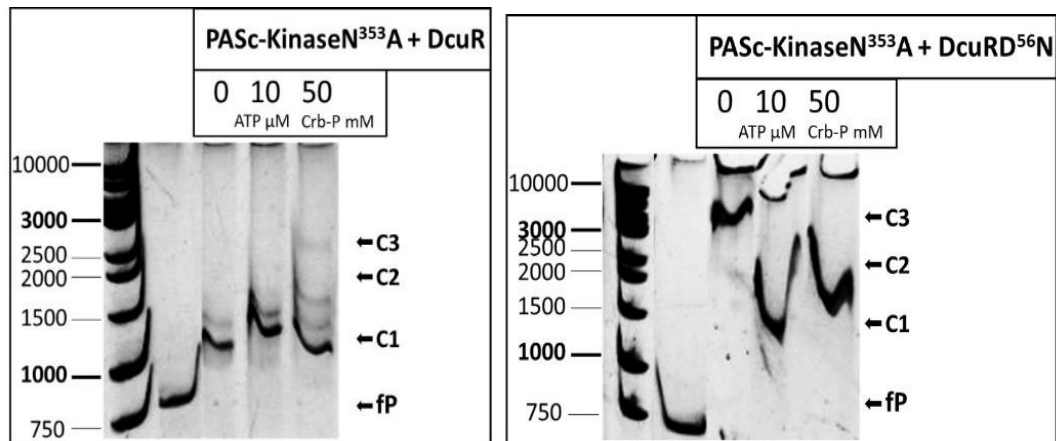


Abb. A13: DNA-Gelmobilität Studie und quantitative Analyse der Einfluss von PASC-KinaseN353A auf die DcuR-*dcuBp1* und DcuRD56N-*dcuBp1* Komplexe. Zu 8 μM DcuR (+/- Acetylphosphat) wurde 4 μM PASC-KinaseN353A (+/- ATP) dazugegeben und für 10 Min bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde 2,5 nM *dcuBp1* und BP-Puffer zugesetzt und für weiteren 30 Min bei 37 °C inkubiert. Die Bindung von DcuR an der DNA, bewirkt die Retention zweier Komplexe mit folgenden Anteilen: C1 (83%), C2 (30%) und fP (35%).

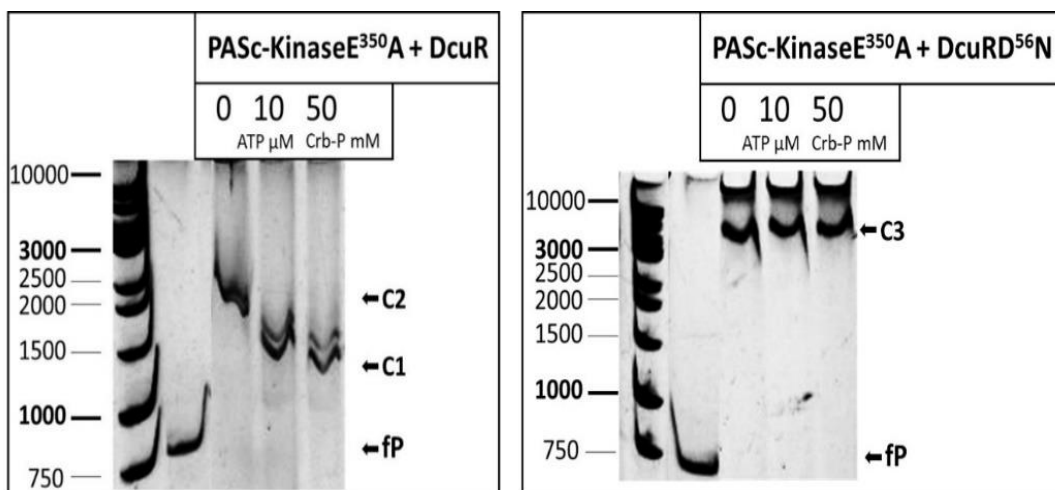


Abb. A14: DNA-Gelmobilität Studie und quantitative Analyse der Einfluss von PASC-KinaseE350A auf die DcuR-*dcuBp1* und DcuRD56N-*dcuBp1* Komplexe. Zu 8 μM DcuR (+/- Acetylphosphat) wurde 4 μM PASC-Kinase und 4 μM PASC-KinaseE350A (+/- ATP) dazugegeben und für 10 Min bei 25 °C in Phosphorylierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde 2,5 nM *dcuBp1* und BP-Puffer zugesetzt und für weiteren 30 Min bei 37 °C inkubiert. DcuRD56N ist in der Lage den Promotor *dcuBp1* zu binden und bildet ein Komplex mit den Mobilität C3 unabhängig von Phosphorylierungszustand. Wird DcuRD56N mit Crb-P versetzt und ist die PASC-KinaseE350A anwesend, so bewegt sich der Komplex auf die Höhe von C1. Wird dagegen PASC-KinaseE350A phosphoryliert, wandert DcuRD56N-*dcuBp1* auf die Höhe von C3.

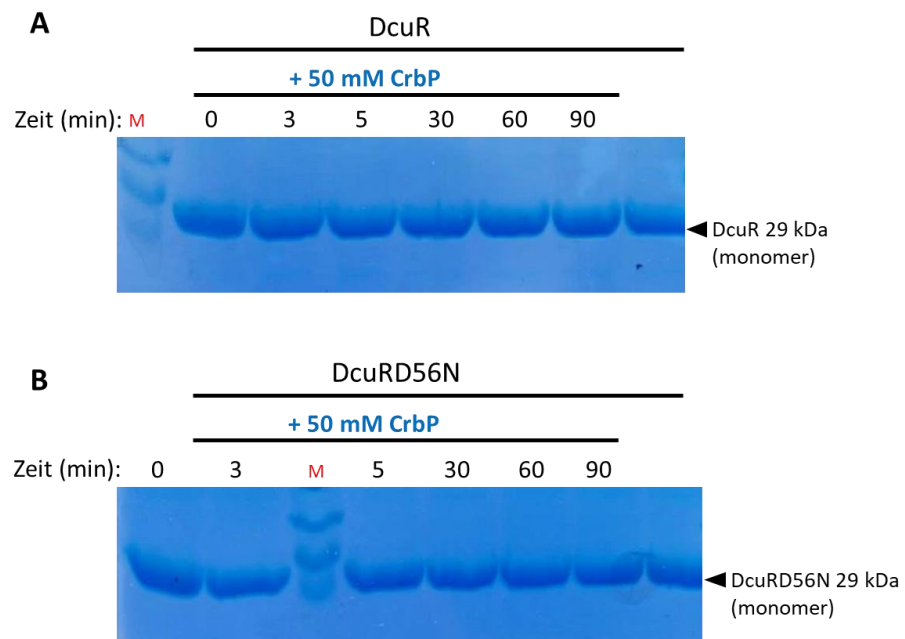


Abb. A15: Phosphorylierung von DcuR mit CbP und Nachweis über Phos-tag™. Es wurden 15 µg Protein (DcuR-His₆ und DcuRD56N-His₆) mit Phosphorylierungspuffer mit und ohne Zugabe an 50 mM CrbP in einem Endvolumen von 30 µl aufgenommen und für 2 Stunden bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl von den Ansätzen entnommen und in die Stopp-Lösung (2x SDS-Ladepuffer) gegeben. Die Proben wurden dann auf 12,5 %-igem SDS-PAGE Gel mit Acrylamide-pendant Phos-tag™ (75 µM) und MnCl₂ (150 µM) geladen und über Phosphat Affinity SDS-PAGE nach der Phosphorylierung getrennt. Mit dieser Methode könnte die Phosphorylierung von DcuR nicht nachgewiesen werden.

8. Danksagung

.

9. Poster

Gencheva, S. und Uden, G. (2019): Phosphorylation and DNA-binding of the two-component DcuS-DcuR complex. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Mainz.

Gencheva, S. und Uden, G. (2017): The Role of the complex build by DcuS and DcuR in relation to phosphorylation and DNA-binding. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Würzburg.

Gencheva, S., Wörner, S. und Uden, G. (2016): The ExxN phosphatase motif of C₄-dicarboxylate sensor kinase DcuS of *E. coli*. 31 Konferenz der Tagungsserie: Mechanism of Gene Regulation, Bad Bergzabern.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mainz,

(Datum)

(Unterschrift)