

Der C₄-Dicarboxylat-Metabolismus von *Escherichia coli*

Die Rolle von DcuA und von DcuS im Signaltransfer

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Alexander Strecker
geboren am 19.04.1989 in Aktjubinsk

Mainz, Oktober 2018

I.	Inhaltsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	V
III.	Tabellenverzeichnis	VII
IV.	Abkürzungen	VIII
1.	Abstract	1
2.	Zusammenfassung	2
3.	Einleitung	3
3.1.	Sauerstoffabhängige Regulation in <i>E. coli</i>	3
3.2.	Der C ₄ -DC-Metabolismus von <i>E. coli</i>	4
3.3.	Die C ₄ -DC-Transporter von <i>E. coli</i>	7
3.3.1.	Die aeroben C ₄ -DC-Transporter in <i>E. coli</i>	7
3.3.2.	Die anaeroben C ₄ -DC-Transporter DcuA, DcuB und DcuC	8
3.4.	Signalperzeption und Regulation durch das ZKS DcuS-DcuR	11
3.5.	Aufbau der Sensor-Histidinkinase DcuS von <i>Escherichia coli</i>	12
3.6.	Signaltransduktion in DcuS	14
3.7.	Ziel der Arbeit	15
4.	Material und Methoden	17
4.1.	Stämme, Plasmide und Primer	17
4.2.	Chemikalien	17
4.3.	Kultivierung von Bakterien	17
4.4.	Puffer und Lösungen	19
4.4.1.	Herstellung elektrokompenter Zellen	19
4.4.2.	Puffer und Lösungen für β -Galactosidasetests (Miller 1992)	19
4.4.3.	Transportmessung	20
4.4.4.	Überexpression von verkürzten DcuS Konstrukten	20
4.4.5.	Proteinreinigung in mSPINE-Untersuchungen	20
4.4.6.	SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting	21
4.4.7.	Immunfärbung	21
4.4.8.	Antikörper	22
4.4.9.	Chemilumineszenz-Entwicklung	22
4.5.	Molekulargenetische Methoden	22
4.5.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
4.5.2.	Gerichtete Mutagenese	23

4.5.3.	Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	23
4.5.4.	Transformation mittels Elektroporation.....	24
4.5.5.	Klonierung.....	24
4.5.6.	Konstruktion der Plasmide.....	24
4.5.7.	Identifikation von Membranproteinen.....	27
4.6.	Biochemische Methoden.....	27
4.6.1.	Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität.....	27
4.6.2.	Expression und Reinigung von verkürzten DcuS Konstrukten (DcuS _{PK}).....	29
4.6.3.	Interaktionsstudien mittels mSPINE (Membrane Strep Interaction Experiment) 29	
4.6.4.	SDS-Page, Western-Blot und Antikörperfärbung.....	30
4.6.5.	Semi-dry Western-Blot.....	30
4.6.6.	Antikörperfärbung.....	31
4.6.7.	Transportmessung.....	31
4.6.8.	Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS).....	32
4.7.	Bioinformatische Methoden.....	33
4.7.1.	Gruppierung und Analyse der Migrationsprofile.....	33
4.7.2.	Bioinformatische Programme und Datenbanken.....	33
5.	Ergebnisse.....	35
5.1.	Die Funktionsweise des aeroben Transporters DcuA.....	35
5.2.	DauA fungiert durch die Interaktion mit DctA als Signalgeber.....	37
5.3.	Signaltransduktion über die PAS _C -Domäne des Sensors DcuS.....	38
5.3.1.	Punktmutationen und Funktionsstudien geben ersten Hinweis auf die Signaltransduktion.....	38
5.3.2.	HDX-MS zur Untersuchung von Strukturveränderungen in PAS _C während der Signaltransduktion.....	40
5.3.3.	T25-Fragmente der Adenylatzyklase erzeugen einen künstlichen ON- Phänotypen.....	42
5.3.4.	Strukturelle Veränderung in der N-terminalen Helix und den β -Faltblättern....	43
5.3.5.	Vergleichende HDX-MS Messungen der DcuS _{PK+T25} -Konstrukte.....	48
5.3.6.	Fusionen mit T25 Fragment verhalten sich verschieden gegenüber verkürzten DcuS Konstrukten.....	50
5.4.	Das Dcu-Interaktom von <i>Escherichia coli</i>	51

5.4.1. Complexome Profiling zur Identifizierung von Proteinuntereinheiten und Interaktionspartnern	51
5.4.2. Anwendung des Complexome Profilings für prokaryotische Membranproteine 52	
5.4.3. Validierung von Komplexen innerhalb des C ₄ -DC-Metabolismus mittels Complexome Profiling	54
5.4.4. Untersuchung der Interaktion der Dcu Transporter mittels Bacterial-Two-Hybrid-System (BACTH)	57
5.4.5. Die Sandwichkonstrukte DcuA und DcuC sind nicht funktional	59
5.4.6. Validierung des Dcu-Interaktoms durch das <i>membrane strep protein Interaction experiment</i> (mSPINE)	60
5.4.7. Funktionelle Untersuchung eines möglichen Dcu-Transporterkomplexes	62
6. Diskussion	64
6.1. Signalweiterleitung in DcuS durch die PAS _C Domäne.....	64
6.1.1. Verkürzte PAS _C -Kinase Konstrukte weisen keine effektorunabhängige Aktivität auf	65
6.1.2. Strukturveränderungen lokalisieren sich auf einen eingeschränkten Bereich....	67
6.1.3. Die Signaltransduktion im Sensor DcuS	70
6.2. Die Funktion des C ₄ -DC-Transporters DcuA als [N]- <i>shuttle</i> im aeroben Stoffwechsel	71
6.2.1. DcuA ist verantwortlich für die Aufnahme von L-Aspartat unter aeroben Wachstumsbedingungen.....	72
6.2.2. Der [N]- <i>shuttle</i> von DcuA.....	73
6.3. Die unterschiedlichen Funktionen der homologen Transporter DcuA und DcuB.	74
6.4. Das Dcu-Interaktom von <i>Escherichia coli</i>	77
6.4.1. Validierung des Complexome Profiling für Membranproteine von <i>E. coli</i>	77
6.4.2. Protein-Interaktionen aus dem Dcu-Interaktom können nur teilweise verifiziert werden	80
6.4.3. Indizien einer Protein-Interaktion der C ₄ -DC-Transporter DcuA, DcuB & DcuC	80
6.4.4. Verifizierung der Interaktion zwischen DcuA, DcuB und DcuC.....	81
6.4.5. Die Transporter DcuA, DcuB und DcuC bilden keinen funktionellen Komplex aus	82
7. Ausblick.....	84

7.1.	Die Signaltransduktion in DcuS über PAS _C	84
7.2.	DcuA als <i>[N]-shuttle</i> unter aeroben Bedingungen.....	84
8.	Acknowledgements	85
9.	Literatur	86
10.	Anhang	101
10.1.	Anhang zu Material und Methoden	101
10.1.1.	Stämme	101
10.1.2.	Plasmide.....	102
10.1.3.	Primer	105
10.1.4.	Chemikalienliste	106
10.2.	Anhang zu Ergebnisse.....	108
10.2.1.	Strukturelle Veränderung in der N-terminalen Helix und den β -Faltblättern 108	
10.2.2.	Vergleichende HDX-MS Messungen der DcuSPKT25 Konstrukte	109
10.2.3.	Anwendung des Complexome Profilings für prokaryotische Membranproteine 110	
10.2.4.	Untersuchung der Interaktion der Dcu-Transporter mittels Bacterial-Two- Hybrid-System (BACTH)	113
10.2.5.	Die Sandwichkonstrukte DcuA und DcuC sind nicht funktional.....	114
10.2.6.	Validierung des Dcu-Interaktoms durch das membrane strep protein Interaction experiment (mSPINE).....	115
11.	Veröffentlichungen und Präsentationen	139
11.1.	Veröffentlichungen	139
11.2.	Poster.....	139
12.	Lebenslauf	141
13.	Danksagung	142

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aerobe Stoffwechselwege von C ₄ -DC in <i>E. coli</i>	5
Abb. 2: Anaerobe Stoffwechselwege von C ₄ -DC in <i>E. coli</i>	6
Abb. 3: Topologiemodell für DctA.....	7
Abb. 4: Topologiemodell für DcuB.....	9
Abb. 5: Topologiemodell für DcuA.....	10
Abb. 6: Signalerkennung, Stoffwechsel und Transport von C ₄ -DC in <i>E. coli</i>	12
Abb. 7: Schematischer Aufbau der Sensorkinase DcuS im DcuS/DcuS Dimer.....	13
Abb. 8: Plasmid für die Expression des Sandwichkonstrukts DcuA _{SW-T25}	25
Abb. 9: Vorhersage der DcuC-Topologie durch <i>in silico</i> Analysen.....	26
Abb. 10: Verschiedene ON-Varianten im Strukturmodell des PAS _C /PAS _C Dimers DcuS.....	39
Abb. 11: Expression der Reporterfusion <i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i> in verkürzten DcuS Konstrukten.....	42
Abb. 12: Auftrennung der Proteine des DcuS _{PK} -Konstrukts im SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	44
Abb. 13: Relative Deuterium-Aufnahme von DcuS _{PK} (WT).....	45
Abb. 14: Relative Deuterium-Aufnahme von DcuS _{PK} (N304D).....	46
Abb. 15: Vergleich der relativen Deuterium-Aufnahme von DcuS _{PK} (WT) gegenüber DcuS _{PK} (N304D).....	47
Abb. 16: Auftrennung der Proteine von DcuS _{PK+T25} in einem SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	48
Abb. 17: Vergleich der relativen Deuterium-Aufnahme von DcuS _{PK+T25} (WT) gegenüber DcuS _{PK+T25} (N304D).....	49
Abb. 18: Vergleich der relativen Deuterium-Aufnahme der ON-Variante (N304D) und des (WT) von DcuS _{PK} (A) und DcuS _{PK+T25} (B) am Strukturmodell von DcuS.....	50
Abb. 19: Migrationsprofile der UE A, H, K, L, N der NADH-Chinon-Oxidoreduktase NuoA-N.....	53
Abb. 20: Migrationsprofile der aeroben C ₄ -DC-Transporter DctA und DauA.....	55
Abb. 21: Migrationsprofile der anaeroben C ₄ -DC-Transporter DcuA, DcuB und DcuC.....	56
Abb. 22: Interaktion zwischen den Transportern DcuA, DcuB und DcuC unter anaeroben Bedingungen.....	58
Abb. 23: Wachstumskomplementation des Dcu-Transporter defizienten Stammes IMW505 mit plasmidkodiertem DcuA _{SW}	59

Abb. 24: <i>In vivo</i> Bindung von DcuB-PhoA an DcuC-Strep und Ko-Reinigung mittels Strep-Tactin.....	61
Abb. 25: Aufnahme von [¹⁴ C]-Aspartat in verschiedenen <i>dcu</i> -negativen Stämmen.	63
Abb. 26: Übersicht der DcuS-Konstrukte mit den Ergebnissen der Reportergentests.....	66
Abb. 27: Vergleiche der relativen Deuterium-Aufnahme von DcuS _{PK} mit DcuS _{PK} (N304D). 68	
Abb. 28: Vergleiche der relative Deuterium-Aufnahme von DcuS _{PK+T25} mit DcuS _{PK+T25} (N304D).	69
Abb. 29: Strukturveränderungen während der Signaltransduktion in DcuS.	70
Abb. 30: Funktion von DcuA im aeroben Transport..	73
Abb. 31: Vergleich der Transporter DcuA/DcuB in der Sequenz (A) und Topologie (B).	75
Abb. 32: Funktionsweise der homologen Transporter DcuA und DcuB.	76
Abb. 33: Schematische Darstellung des <i>Redox-[H]-Shuttle</i> aus Mitochondrien (A) und des <i>[N]-shuttle</i> zwischen Leguminosen und Rhizobien.	77
Abb. 34: Bildung von Subkomplexen infolge der BN-PAGE in Proteinkomplexen aus der Atmungskette von <i>E. coli</i>	79
Abb. 35: Schematische Darstellung der Transporter und des DcuS-DcuR ZKS aus dem C ₄ -DC-Metabolismus.	83
Abb. 36: Auftrennung der Proteine des DcuS _{PK} -Konstrukts (N304D) im SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromotographie.....	108
Abb. 37: Peptide Coverage Map von DcuS _{PK}	109
Abb. 38: Auftrennung der Proteine von DcuS _{PK+T25} (N304D) in einem SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromotographie.....	109
Abb. 39: Migrationsprofile der UE C,D,B,I des Enzyms NADH-Chinon-Oxidoreduktase. .	110
Abb. 41: Interaktion von DcuA und DcuC mit DcuB unter aeroben Bedingungen.....	113
Abb. 42: Wachstumskomplementation des Dcu-Transporter defizienten Stamms IMW505 mit plasmidkodiertem DcuC _{SW}	114
Abb. 43: <i>In vivo</i> Bindung von DcuB-PhoA an DcuA-Strep und Co-Reinigung mittels Strep-Tactin.....	115

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Antibiotika	19
Tab. 2: PCR-Protokoll.....	23
Tab. 3: Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> K12 mit jeweiligem Genotyp.....	101
Tab. 4: Stämme für die Wachstumskomplementation, mSPINE, Transportmessungen und Funktionsuntersuchungen.....	101
Tab. 5: Plasmide für die Funktionsuntersuchung und Überproduktion der verkürzten DcuS Konstrukte	102
Tab. 6: Plasmide für das BACTH-System	103
Tab. 7: Plasmide für die mSPINE Untersuchungen.....	104
Tab. 8: Primer zur Konstruktion von BACTH-Fusionen, Strep-Fusionen und verkürztem DcuS.....	105
Tab. 9: Primer für gerichtete Mutagenesen.....	106
Tab. 10: Verwendete Chemikalien.....	106
Tab. 11: Zusammenfassung des Complexome Profilings der Proteinkomplexe.	111

IV. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	Bacterial two-hybrid
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	catabolite activator protein
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC	Dicarboxylate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E ₀ '	Redoxpotential
H ₂ Odest.	destilliertes Wasser
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
lacZ	Gen der β-Galaktosidase
MCS	Multiple Cloning Site
MOPS	N-Morpholino-Propansulfonsäure
MU	Miller-Units
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte

ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	polymerase chain reaction
QH ₂	Ubichinol
SOB	Super Optimal Broth
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _M	Schmelztemperatur
UpM	Umdrehung pro Minute
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Zip	Leucin-Zipper

1. Abstract

The two-component-system DcuS-DcuR of *Escherichia coli* regulates the C₄-dicarboxylate metabolism and consists of the membrane-integrated sensor DcuS and the response regulator DcuR. C₄-dicarboxylates are detected by DcuS and transferred into a signal. After signal sensing via PAS_P, signal transduction occurs by a piston type movement of the transmembrane helix 2 across the membrane to the PAS_C domain. For the signal transduction in the cytoplasm, a transmission via the reduction of the dimerization of the PAS_C domain is postulated. In this work, structural changes between two functional states of DcuS (transition from responsive to activated state of the sensor) were investigated by hydrogen/deuterium mass spectrometry (HDX-MS). During signal transduction the accessibility of deuterium is increased in α -helix 1 and decreased in β -sheets 3 & 4. Thus, the structural changes are localized in the dimerization surface of PAS_C. HDX-MS studies validate the hypothesis of reduction of PAS_C dimerization during signal transduction.

In addition to DctA and DcuB, *Escherichia coli* has other Dcu transporters for the uptake of C₄-dicarboxylates. In this work an interaction within the Dcu transporters was investigated. An interaction between DcuA, DcuB, DcuC was identified by complexome profiling and confirmed by BACTH and mSPINE. A function for the interaction of the transporters could not be identified.

DcuA is an alternative transporter of the main transporter DcuB for the uptake of C₄-dicarboxylates under anaerobiosis. Since *dcuA* is constitutively expressed under aerobic and anaerobic conditions, DcuA has been postulated to function as an anaerobic transporter or as a transporter for the transition between aerobic and anaerobic conditions. In this work, DcuA was shown to be important for aerobic growth with L-aspartate as the sole nitrogen source, while DctA metabolizes L-aspartate as a carbon source. The transport of L-aspartate occurs via a symport or an antiport with C₄-dicarboxylates. DcuA prefers L-aspartate to succinate in transport ($K_M = 43$ and $844 \mu\text{M}$, respectively) while DctA has a higher affinity for succinate compared to L-aspartate. When L-aspartate was the only source of nitrogen and glycerol the carbon source, L-aspartate was consumed, and equimolar amounts of fumarate or L-malate were excreted. These reactions were dependent on DcuA. L-aspartate was taken up in the amounts required for nitrogen metabolism but not for carbon metabolism. DcuA catalyzes an L-aspartate/C₄-dicarboxylate antiport and thus serves as an [N]-shuttle under aerobic conditions, with L-aspartate as sole nitrogen source.

2. Zusammenfassung

Das Zweikomponentensystem DcuS-DcuR von *Escherichia coli* reguliert den C₄-Dicarboxylatstoffwechsel und besteht aus dem membranintegralen Sensor DcuS sowie dem Antwort-Regulator DcuR. C₄-Dicarboxylate werden von DcuS detektiert und in ein Signal transferiert. Nach der Signalperzeption über PAS_P erfolgt die Signalweiterleitung durch einen Kolbenhubmechanismus der Transmembranhelix 2 über die Membran zur PAS_C-Domäne. Für die Signaltransduktion im Cytoplasma wird eine Weiterleitung über eine Schwächung der Dimerisierung der PAS_C-Domäne postuliert. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der *hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry* (HDX-MS) strukturelle Veränderungen zwischen zwei Funktionszuständen von DcuS untersucht (Übergang vom responsiven zum aktivierten Zustand des Sensors). Während der Signaltransduktion ist die Zugänglichkeit von Deuterium in der α -Helix 1 erhöht und in den β -Faltblättern 3 & 4 erniedrigt. Die strukturellen Veränderungen lokalisieren sich somit in der Dimerisierungsfläche von PAS_C. HDX-MS Untersuchungen bestätigen die Hypothese einer Schwächung der Dimerisierungsstruktur von PAS_C während der Signalweiterleitung.

Escherichia coli besitzt neben DctA und DcuB weitere Dcu-Transporter für die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten. In dieser Arbeit wurde eine Interaktion innerhalb der Dcu-Transporter untersucht. Eine Interaktion zwischen DcuA, DcuB, DcuC wurde mit Hilfe von Complexome Profiling identifiziert und mit BACTH und mSPINE bestätigt. Eine Funktion für die Interaktion der Transporter konnte nicht identifiziert werden.

DcuA ist ein alternativer Transporter des Haupttransporters DcuB für die Aufnahme von C₄-Dicarboxylate unter Anaerobiose. Da *dcuA* konstitutiv unter aeroben und anaeroben Bedingungen exprimiert wird, wurde für DcuA eine Funktion als anaerober Transporter oder als Transporter für den Übergang zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen postuliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass DcuA für das aerobe Wachstum mit L-Aspartat als einzige Stickstoffquelle wichtig ist, während DctA L-Aspartat als Kohlenstoffquelle metabolisiert. Der Transport von L-Aspartat erfolgt dabei über einen Symport oder einen Antiport mit C₄-Dicarboxylaten. DcuA bevorzugt L-Aspartat gegenüber Succinat im Transport ($K_M = 43$ bzw. $844 \mu\text{M}$), während DctA für Succinat, verglichen zu L-Aspartat, eine höhere Affinität besitzt. Erfolgte die Kultivierung mit L-Aspartat als einzige Stickstoffquelle und Glycerin als Kohlenstoffquelle, wurde L-Aspartat aufgenommen und äquimolare Mengen an Fumarat oder L-Malat ausgeschieden. Diese Reaktionen waren abhängig von DcuA. L-Aspartat wurde hierbei in den Mengen aufgenommen, die für den Stickstoffstoffwechsel, aber nicht für den Kohlenstoffstoffwechsel notwendig sind. DcuA katalysiert einen L-Aspartat/C₄-Dicarboxylat-Antiport und dient daher unter aeroben Bedingungen, mit L-Aspartat als einzige Stickstoffquelle, als *[N]-shuttle*.

3. Einleitung

Escherichia coli (*E. coli*) wurde 1886 erstmals von Theodor Escherich aus dem menschlichen Darm isoliert und beschrieben (Escherich, 1886). *E. coli* ist ein gramnegatives, peritrich begeißeltes und stäbchenförmiges Gammaproteobakterium, welches zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Das kommensale Bakterium besiedelt als eines der ersten Bakterien, kurz nach der Geburt, die Schleimschicht des Säugerdarms. Die meisten Stämme von *E. coli* sind nicht pathogen und können sogar probiotisch wirken (Nissle, 1916), während andere Stämme pathogen für den Wirt sind (Kaper *et al.*, 2004).

3.1. Sauerstoffabhängige Regulation in *E. coli*

E. coli hat eine hohe Anpassungsfähigkeit. Es kann unter aeroben oder anaeroben Umweltbedingungen wachsen und eine Vielzahl an Substraten verwerten. Um die vorhandenen Substrate effizient zu nutzen, ist es bei der kleinen Größe des Bakteriums unabdingbar nur diejenigen Proteine und Enzyme zu synthetisieren, die für den Stoffwechsel unter den verschiedenen Lebensbedingungen notwendig sind. In der anaeroben und aeroben Atmung werden Elektronenakzeptoren verwendet, die sich in ihrer Energieausbeute unterscheiden. Die Expression der verschiedenen Atmungsketten wird hierarchisch reguliert (Gunsalus, 1992). Sauerstoff ist der bevorzugte Elektronenakzeptor und reprimiert die Expression anaerober Stoffwechselwege. In Abwesenheit von Sauerstoff werden alternative Elektronenakzeptoren wie Nitrat ($E_0' = + 0,43 \text{ V}$) bis zu Dimethylsulfoxid ($E_0' = + 0,16 \text{ V}$), Trimethylaminoxid ($E_0' = + 0,13 \text{ V}$) und Fumarat ($E_0' = + 0,03 \text{ V}$) genutzt. Nitrat reprimiert die Synthese der anderen Elektronenakzeptoren für Fumarat, DMSO und TMAO.

Das Fehlen von Sauerstoff führt zur Aktivierung des Einkomponentensystems FNR (*fumarate nitrate reductase regulator*) (Unden & Trageser, 1991; Shaw & Guest, 1982) und des Zweikomponentensystems (ZKS) ArcBA (*aerobic respiration control*) (Iuchi *et al.*, 1992). ArcBA misst indirekt den Redoxstatus der Elektronentransportkette und reprimiert die Expression der Enzyme der aeroben Atmung, während der Sauerstoffsensor FNR als Aktivator der Gene der anaeroben Atmung dient (Unden *et al.*, 1995; Spiro & Guest, 1990; Bueno *et al.*, 2012). Neben ArcBA und FNR sind je nach Elektronenakzeptor weitere Regulationsmechanismen aktiv. Die Regulatoren NarXL und NarQP stimulieren die Gene der Nitratatmung in Anwesenheit von Nitrat, bei simultaner Reprimierung der Gene für die anaeroben Atmungsformen und die der Fermentation (Rabin

& Stewart, 1993; Stewart, 2003; Jourlin *et al.*, 1996). Ein weiterer Regulator ist das ZKS DcuS-DcuR (*C₄-dicarboxylate uptake sensor/regulator*), welches im C₄-Dicarboxylat (DC)-Stoffwechsel die Expression der terminalen Reduktase für Fumarat, sowie deren Transporter aktiviert (Zientz *et al.*, 1998).

3.2. Der C₄-DC-Metabolismus von *E. coli*

E. coli metabolisiert bevorzugt Zucker wie z.B. Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Neben Glucose können ebenfalls C₄-Dicarboxylate (C₄-DC) wie z.B. L-Aspartat, Fumarat und Succinat verwertet werden (Unden *et al.*, 2016). Durch die direkte Verbindung zum zentralen Stoffwechsel spielt der Metabolismus von C₄-DC eine besondere Rolle. Der Metabolismus der C₄-DC unterscheidet sich grundlegend unter aeroben und anaeroben Umweltbedingungen. Unter Aerobiose werden die Substrate über die aeroben C₄-DC-Transporter DctA (*C₄-dicarboxylate transporter A*) und DauA (*Dicarboxylic acid uptake system A*) in die Zelle aufgenommen (Abb. 1). Unter neutralen pH-Werten werden C₄-DC hauptsächlich durch den Transporter DctA transportiert (Kay & Kornberg, 1971; Janausch *et al.*, 2002). Bei einem pH-Wert ≤ 5 übernimmt der Transporter DauA die Aufgabe des Transports von C₄-DC (Karinou *et al.*, 2013). Die aufgenommenen C₄-DC werden, mit Ausnahme von L-Aspartat und L-Tartrat, direkt in den Tricarbonsäurezyklus (Citratzyklus) eingeschleust und vollständig zu CO₂ oxidiert. Die Verwertung von L-Aspartat benötigt einen Zwischenschritt, bei dem L-Aspartat durch die Aspartase AspA zu Fumarat desaminiert wird. Die Aufnahme von Tartrat erfolgt über DctA (Kay & Kornberg, 1971). Der Stoffwechselweg vom L-Tartrat zum Citratzyklus ist nicht bekannt. Jedoch wird eine Verwertung über die Tartratdehydrogenase und Oxaloglycolatreduktase oder die Tartratdecarboxylase postuliert (Kohn & Jakoby, 1968; Kohn *et al.*, 1968; Furuyoshi *et al.*, 1991).

Essentiell für die Verwertung von C₄-DC im Citratzyklus ist die Verfügbarkeit von Acetyl-CoA. Dieses wird über die Phosphocarboxykinase und Pyruvatdehydrogenase bereitgestellt. In allen aeroben Verwertungen entstehen Reduktionsäquivalente in Form von Ubichinol (QH₂) und reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), die daraufhin in der aeroben Atmungskette oxidiert werden. Die freie Energie wird genutzt, um einen Protonengradienten über die Membran aufzubauen. Der elektrochemische Protonengradient wird anschließend von der ATP-Synthase zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) genutzt (Maloney *et al.*, 1974).

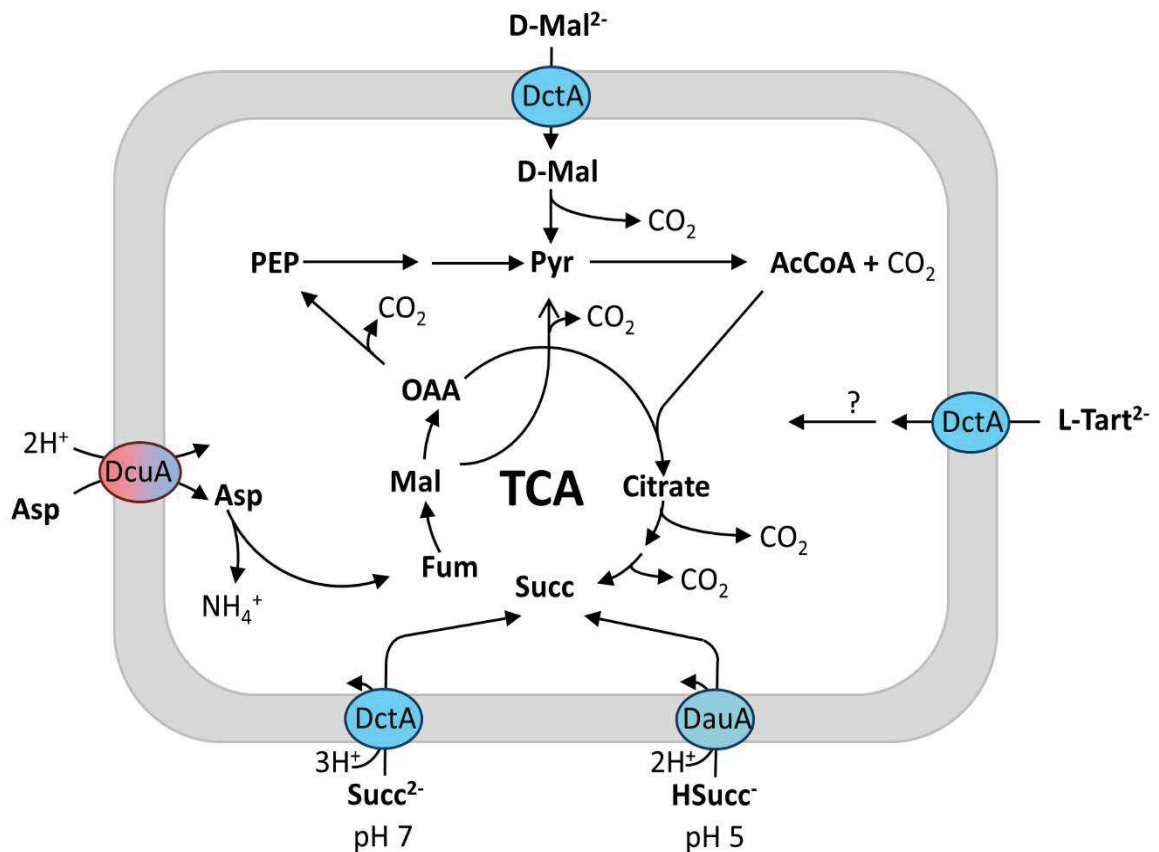


Abb. 1: Aerobe Stoffwechselwege von C₄-DC in *E. coli*. Dargestellt ist der Transport sowie die Verwertung der C₄-DC im Tricarbonsäurezyklus. AcCoA: Acetyl-Coenzym A; Asp: L-Aspartat; Fum: Fumarat; Mal, L-Malat; OAA: Oxalacetat; PEP: Phosphoenolpyruvat; Pyr: Pyruvat; Succ: Succinat; Tart: L-Tartrat. Modifiziert nach Unden *et al.* (2016)

Unter anaeroben Bedingungen werden in *E. coli* C₄-DC über die Fumaratrespiration mit Fumarat als Elektronenakzeptor metabolisiert. Für das Wachstum auf C₄-DC werden jedoch zusätzliche Substrate in Form von Glycerin oder Glucose benötigt. Diese stellen Glycerin-3-Phosphat oder NADH als Elektronendonatoren für die Fumaratatmung zur Verfügung (Guest, 1979). Die Fumaratreduktase (FrdABCD) katalysiert die Reduktion von Fumarat zu Succinat. Das entstandene Succinat kann aufgrund der fehlenden Funktionalität der Succinatdehydrogenase nicht weiter oxidiert werden und muss aufgrund des unvollständigen Citratzyklus aus der Zelle ausgeschleust werden (Wallace & Young, 1977; Guest, 1979). Des Weiteren werden die Gene für den anaeroben C₄-DC Metabolismus durch Sauerstoff reprimiert. Der Export von Succinat erfolgt im Antiport gegen C₄-DC mit einem der anaeroben C₄-DC-Transporter DcuA, DcuB und DcuC (*Dicarboxylate uptake transporter*) (Abb. 2). DcuB ist unter Anaerobiose der Hauptanti-

porter (Unden *et al.*, 2016; Engel *et al.*, 1994.) Alternative C₄-DC wie L-Aspartat, L-Malat, Citrat, aber auch L-Tartrat, D-Tartrat und D-Malat werden vorerst zu Fumarat verwertet und anschließend in die Fumaratatmung eingeschleust.

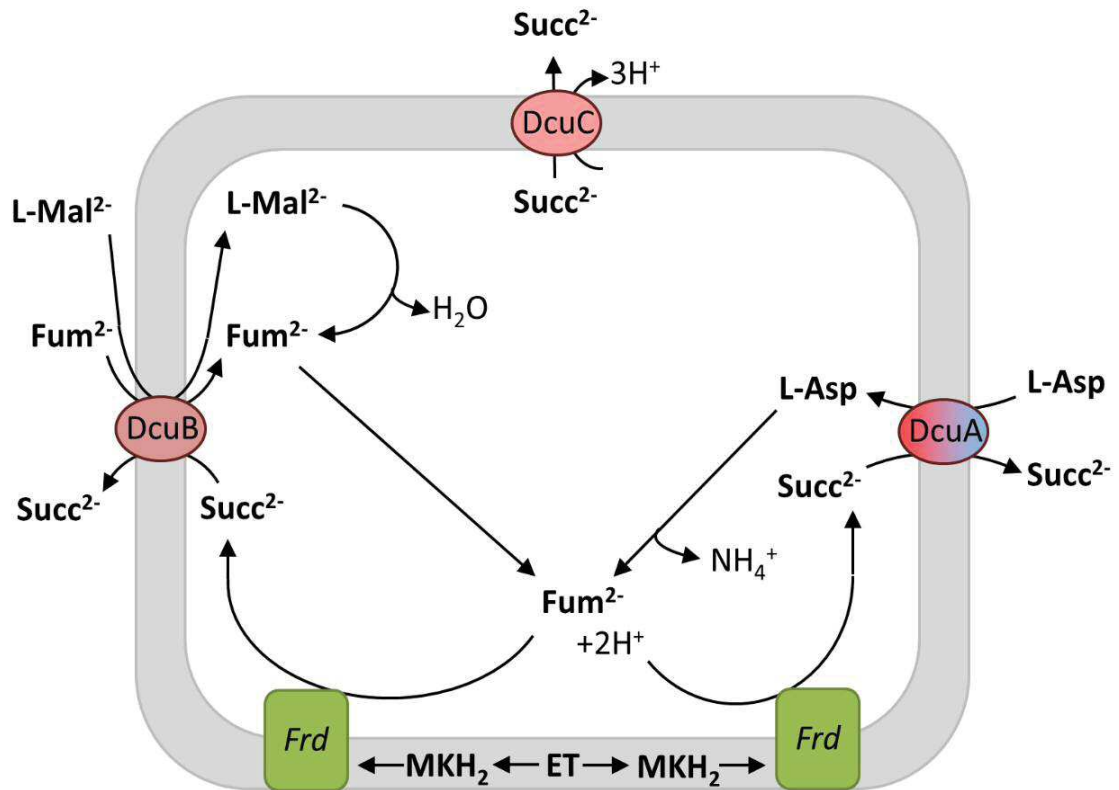


Abb. 2: Anaerobe Stoffwechselwege von C₄-DC in *E. coli*. Dargestellt ist der Transport sowie die Verwertung der C₄-DC in der Fumaratrespiration. Für weitere Informationen siehe Text. Asp: L-Aspartat; Fum: Fumarat; Mal, L-Malat; Succ: Succinat; Frd: Fumaratreduktase; MKH₂: Menaquinol; ET: Elektronentransport. Modifiziert nach Unden *et al.* (2016)

Die freie Energie der Fumaratatmung ist ausreichend für die Bildung eines Protonengradienten über die Membran ($\text{H}_2 + \text{Fumarat} \rightarrow \text{Succinat}$; $\Delta G_0 = -87 \text{ kJ/mol}$). Dieser Gradient kann für protonenpotenzial-abhängige Reaktionen genutzt werden wie z.B. zur Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP durch die ATP-Synthase. Das Protonenpotenzial der Fumaratatmung liegt bei $\Delta p \approx -140 \text{ mV}$ und ist damit ähnlich dem Potential der Nitratatmung, aber etwas schwächer als das der aeroben Atmung $\Delta p \approx -160 \text{ mV}$ (Tran & Unden, 1998).

3.3. Die C₄-DC-Transporter von *E. coli*

E. coli besitzt verschiedene Transporter zur Aufnahme der C₄-DC in die Zelle. Der Antiport, Symport und Export der C₄-DC erfolgt durch eine Vielfalt verschiedener aerober und anaerober Transporter. Die Transporter DctA, DauA, DcuA, DcuB und DcuC werden in vier verschiedene Familien eingeteilt (DAACS (*dicarboxylate amino acid:cation symporter*), SulP (*Solute carrier and sulfate transporter*), DcuAB, DcuC).

3.3.1. Die aeroben C₄-DC-Transporter in *E. coli*

In Anwesenheit von Sauerstoff stehen *E. coli* die Transporter DctA und DauA zur Verfügung. DctA hat ein breites Substratspektrum und transportiert bei neutralem pH-Wert C₄-DC wie Fumarat, Succinat, L-Malat, D-Malat, L-Aspartat, L-Tartrat und Orotat im Symport mit Na⁺ oder H⁺ in die Zelle (Kay & Kornberg, 1971; Gutowski & Rosenberg, 1975; Baker *et al.*, 1996). Die C₄-DC werden als Dianion im Symport mit 2-3 Protonen aufgenommen. DctA gehört zur DAACS Familie, die C₄-DC im Symport mit Na⁺ oder H⁺ in die Zelle transportieren. Topologieanalysen und Homologievergleiche mit Glt_{Ph} aus *Pyrococcus horikoshii* postulieren für DctA acht Transmembranhelices (TM 1-8) (Witan *et al.*, 2012).

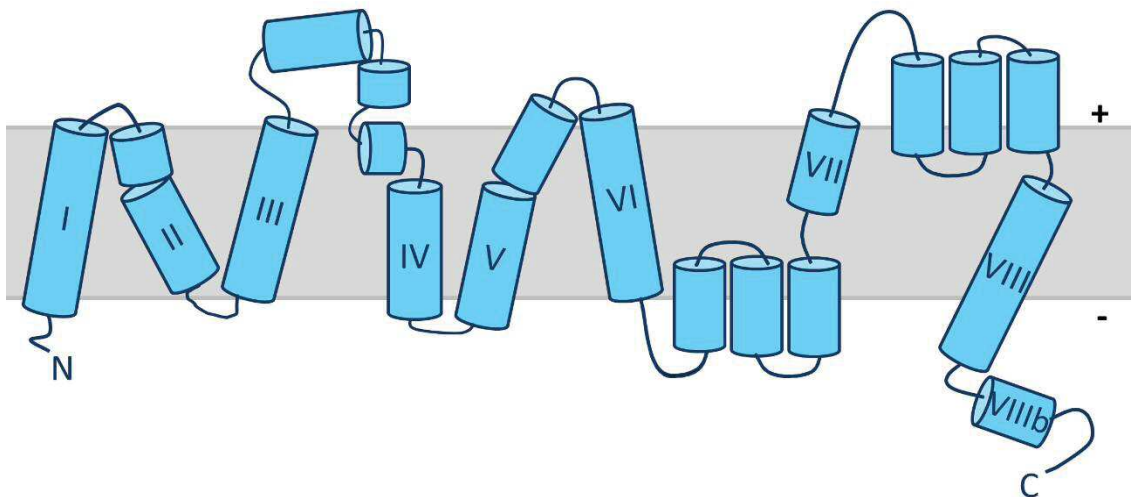


Abb. 3: Topologiemodell für DctA. DctA besitzt acht Transmembranhelices und die regulatorisch wichtige Helix 8b. Das Modell basiert auf experimentellen Befunden und Vorhersagen. Abb. nach Witan *et al.*, 2012.

Die Transkription von *dctA* unterliegt mehreren Voraussetzungen. Die Expression von DctA wird einerseits in Abwesenheit von Glucose durch CRP-cAMP (*cAMP receptor protein*) gesteigert und unter anaeroben Bedingungen durch das ZKS ArcBA reprimiert

(Davies *et al.* 1999). Ein weiterer Faktor für die Regulation der Transkription ist die Gegenwart von DauA und das ZKS DcuS-DcuR. DcuS wird durch eine direkte Interaktion mit der Helix 8b des Transporters DctA in die sensorisch kompetente Form überführt und stimuliert als DctA/DcuS-Komplex die Expression von Zielgenen (z.B. *dctA*) in Anwesenheit von C₄-DC. Das Fehlen von DauA beeinflusst die Transkription von *dctA* negativ (Witan *et al.*, 2012; Karinou *et al.*, 2013).

DauA ist der zweite aerobe Transporter für C₄-DC in *E. coli*. DauA ist im Gegensatz zu DctA nur unter sauren Umweltbedingungen aktiv ($\text{pH} \leq 5$) und ersetzt dann DctA. Dabei werden L-Aspartat, Fumarat und Succinat als Mono- oder Dicarboxylate im Symport mit Protonen in die Zelle transportiert (Karinou *et al.*, 2013). DauA gehört zur SulP Familie, welche sekundäre Aniontransporter beinhaltet. Die Transporter der SulP Familie sind ubiquitär in Bakterien bis zum Menschen konserviert. Sie sind durch ihre C-terminale cytoplasmatische STAS- (*sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist*) Domäne charakterisiert. Unter neutralen Umweltbedingungen ist DauA nicht als Transporter aktiv, besitzt aber eine regulatorische Funktion auf DctA. Eine Deletion von DauA führt zu einer Expressionsminderung von DctA. Bisher wird eine direkte Protein-Protein-Interaktion für diese Regulation postuliert (Karinou *et al.*, 2013). Die Expression von DauA ist unabhängig vom ZKS DcuS-DcuR (Karinou *et al.*, 2013).

3.3.2. Die anaeroben C₄-DC-Transporter DcuA, DcuB und DcuC

Unter anaeroben Bedingungen werden C₄-DC mit Hilfe der drei Transporter DcuA, DcuB und DcuC in die Zelle aufgenommen. Dabei erfolgt die Aufnahme von L-Malat, L-Aspartat und Fumarat vorwiegend im Antiport gegen Succinat. Dieser ist elektronenneutral und somit energie günstiger als ein Symport mit Protonen (Engel *et al.*, 1994). DcuA und DcuB gehören zu einer eigenständigen DcuAB Familie sekundärer C₄-DC-Transporter, die zu einer Fumaratatmung befähigt sind. DcuC ist ein Mitglied der DcuC Familie. Diese sind in Bakterien zu finden, die Hexosen fermentieren und Succinat produzieren. Bakterien, die nicht in der Lage sind Hexosen zu fermentieren, besitzen meist einen Transporter aus der DcuAB Familie (Janausch *et al.*, 2002).

Unter anaeroben Bedingungen ist DcuB hauptsächlich für den Transport von C₄-DC in der Fumaratatmung verantwortlich (Zientz *et al.*, 1996). Daneben ist DcuB zum Symport und Export von Substraten befähigt. Der elektronenneutrale Antiport übersteigt die

Aktivität des Symports oder Exports um das Zwei- bis Dreifache (Engel *et al.*, 1994). Der Symport von C₄-DC erfordert ein Protonenpotential. Aufgrund der Kotranskription und Kolokalisation mit Fumarase FumB wird L-Malat als physiologisch wichtigstes Substrat postuliert. Diese Annahme wird durch das höhere Vorkommen von L-Aspartat und L-Malat im natürlichen Habitat gegenüber Fumarat bestärkt.

In silico Vorhersagen und Topologiestudien zufolge besteht DcuB aus zwölf Transmembrandomänen und zwei cytoplasmatischen Schleifen. Die N- und C-terminalen Enden befinden sich im Periplasma (Abb. 4) (Bauer *et al.* 2011).

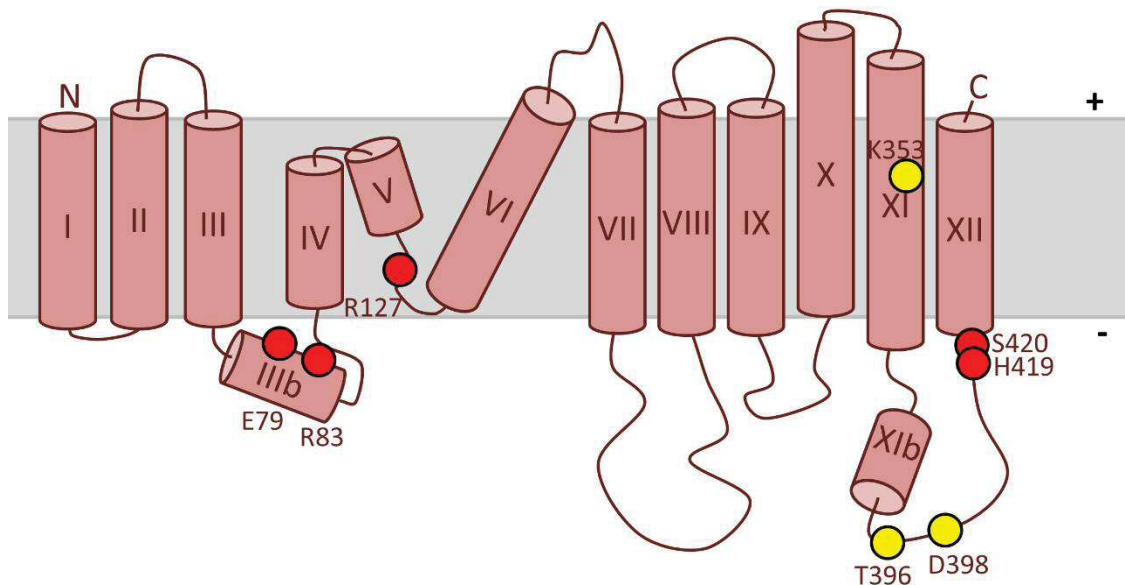


Abb. 4: Topologiemodell für DcuB. DcuB besteht aus 12 Transmembranhelices. Das Modell basiert auf experimentellen Befunden und Vorhersagen. Die für den Transport wichtigen Aminosäurereste E79, R83 und R127 sind rot eingefärbt. Die Reste für die Regulation des Sensors DcuS K353, T396 und D398 sind gelb eingezeichnet. Abb. nach Bauer *et al.*, 2011.

Die Transkription von *dcuB* wird durch das ZKS NarXL mit Nitrat unter Anaerobiose reprimiert. Die Induktion unterliegt dem Regulator FNR und in Abwesenheit von Glucose durch CRP-cAMP. Eine zusätzliche Transkriptionssteigerung erfolgt durch das ZKS DcuS-DcuR in Anwesenheit von C₄-DC. Hierbei interagiert der Transporter DcuB mit dem Sensor DcuS, wobei nur der DcuB/DcuS Komplex sensorisch kompetent ist. Durch Punktmutationen in der Helix 3b sowie in der Helix 11b konnte die Funktion des Transports und der Regulation voneinander getrennt werden (Abb. 4). In einer Deletionsmutante von DcuB wird *dcuB* konstitutiv exprimiert. Somit ist DcuB bifunktional

und dient, neben dem Transport von C₄-DC, durch Interaktion mit DcuS vermutlich als Koregulator von DcuS (Kleefeld *et al.*, 2009; Wörner *et al.*, 2016).

Neben DcuB dient der homologe Transporter DcuA unter anaeroben Bedingungen ebenfalls der Aufnahme von C₄-DC (Zientz *et al.*, 1996; Janausch *et al.*, 2002). DcuA transportiert, ebenso wie DcuB, C₄-DC vorwiegend über einen Antiport im Austausch mit Succinat in die Zelle. Des Weiteren vermag DcuA C₄-DC über einen Symport mit Protonen aufzunehmen. Der Transporter DcuA besitzt eine Sequenzidentität zu DcuB von 36 % und ähnelt ebenso dessen Struktur (Bauer, 2008). Topologiestudien mit Hilfe von DcuA-BlaM Fusionen ergaben eine Strukturvorhersage für DcuA mit zehn Transmembranhelices und einer großen cytoplasmatischen Schleife zwischen Helix 5 und 6. Die N- und C-terminale Enden befinden sich im Periplasma (Abb. 5) (Golby *et al.*, 1998).

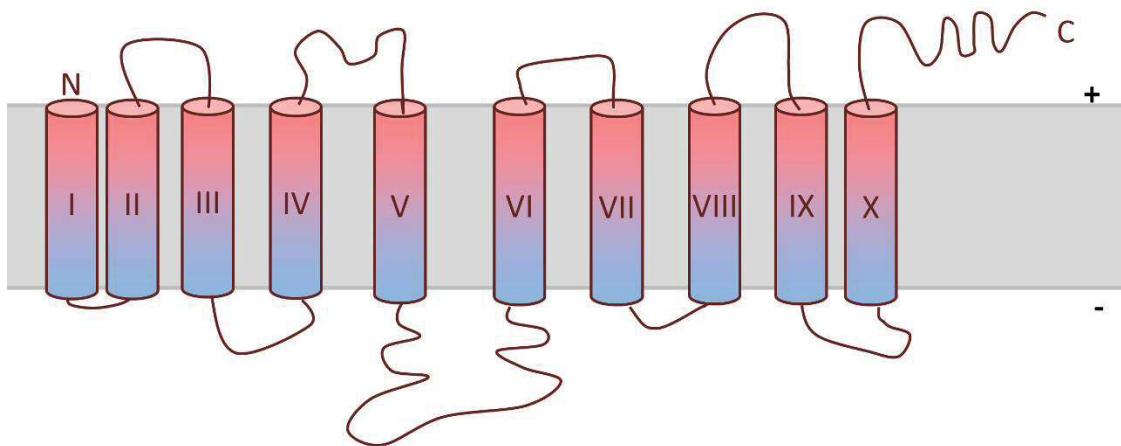


Abb. 5: Topologiemodell für DcuA. DcuA besitzt nach dem Topologiemodell von Golby (1998) zehn Transmembranhelices und eine große cytoplasmatische Schleife zwischen der Helix 5 und 6. Die terminale Enden befinden sich im Periplasma. Die Topologie beruht auf experimentellen Befunden und Vorhersagen. Abb. nach Golby *et al.*, 1998.

Das Gen *dcuA* liegt hinter dem Gen *aspA* der Aspartase in einem Kotranskript. *AspA* und *DcuA* werden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen weitgehend konstitutiv exprimiert. Obwohl *DcuA* konstitutiv exprimiert wird, ist *DcuA* unter aeroben Bedingungen nicht in der Lage den Verlust von *DctA* vollständig zu kompensieren (Golby *et al.*, 1998). Unter Anaerobiose kann *DcuA* dagegen den Verlust von *DcuB* im Antiport kompensieren. Somit wurden für *DcuA* zwei mögliche Funktionen postuliert. Einerseits könnte *DcuA* im Übergang zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen dienen und diesen erleichtern. Andererseits könnte *DcuA* unter aeroben Be-

dingungen die Aufnahme von C₄-DC, besonders L-Aspartat, katalysieren und nach Desaminierung C₄-DC für das Wachstum liefern.

Neben DcuA und DcuB vermag der Transporter DcuC unter Anaerobiose ebenfalls C₄-DC aufzunehmen. Die Transportaktivität ist jedoch im Gegensatz zu den anderen Symportern geringer. Somit kann DcuC den Verlust von DcuA und DcuB nicht kompensieren und führt in Wachstumsexperimenten zu einem verminderten Wachstum. Bisher wird dem Transporter DcuC eine Funktion im Efflux zugeschrieben. DcuC wird vor allem unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Glucose exprimiert und könnte bei der Gärung als ein Exporter von Succinat zur Verfügung stehen (Janausch *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu DcuB wird die Expression von DcuC nicht von C₄-DC stimuliert.

Die Topologie von DcuC ist nicht bekannt. Basierend auf computergestützten Topologievorhersagen besteht DcuC wahrscheinlich aus 12 Transmembranhelices mit periplasmatischen N- und C-terminalen Ende.

3.4. Signalperzeption und Regulation durch das ZKS DcuS-DcuR

Die Wahrnehmung und die Anpassung an sich stets wechselnden Umweltbedingungen macht es für die Bakterien unabdingbar sich an die große Variation anzupassen. Dies geschieht in Bakterien oftmals durch typische Anpassungsmechanismen wie den Zweikomponentensystemen, bestehend aus einer Sensorhistidinkinase und einem cytosolischen Antwort-Regulator. Dabei wird ein Reiz über eine periplasmatische Domäne im Sensor erkannt und als Signal an den Antwort-Regulator weitergegeben, der daraufhin als Transkriptionsregulator für Zielgene wirkt (Mascher *et al.*, 2006). Ein wichtiges ZKS in *E. coli* ist DcuS-DcuR. DcuS liegt als Oligomer in der Membran vor und fungiert als Sensor für C₄-DC, DcuR ist der Antwort-Regulator (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999). Extrazelluläre Effektoren werden über die periplasmatische Per-Arnt-Sim-Domäne (PAS_P-Domäne) des Sensors DcuS detektiert und gebunden. Dadurch kommt es zur Veränderung der Konformation der PAS_P-Domäne und das eingehende Signal wird über die Membran durch die Transmembranhelix 2 an die cytoplasmatische Per-Arnt-Sim-Domäne (PAS_C-Domäne) weitergeleitet (Scheu *et al.*, 2010). Diese wiederum übermittelt das Signal weiter an die Kinase-Domäne, die daraufhin den konservierten Histidinrest H349 autophosphoryliert. Durch einen Transfer der Phosphorylgruppe auf den konservierten Aspartatrest D56 des Antwort-Regulators DcuR dime-

riert dieser, bindet über ein *Helix-Turn-Helix*-Motiv an die Promotorregion der Zielgene und schaltet somit die Expression der Gene des C₄-DC-Metabolismus an (Abb. 6).

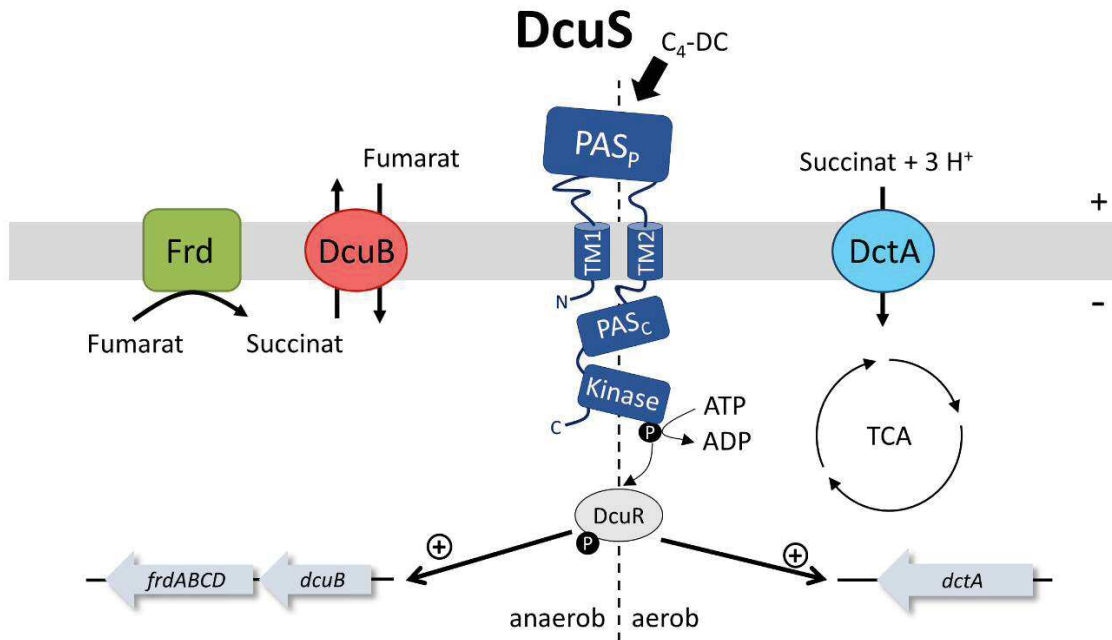


Abb. 6: Signalerkennung, Stoffwechsel und Transport von C₄-DC in *E. coli*. Detektion und Signalweiterleitung mittels Phosphorylgruppentransfer durch den Sensor DcuS. Weiterleitung auf den Antwort-Regulator DcuR. DcuR reguliert die Expression unterschiedlicher Gene für den an-/aeroben C₄-DC-Stoffwechsel. Modifiziert nach Monzel, 2014.

Unter aeroben Bedingungen wird das Gen für die Expression des aeroben Symporters DctA aktiviert, wohingegen in Abwesenheit von Sauerstoff die Gene des Antiporters *dcuB*, der Fumaratreduktase *frdABCD* und der Fumarase *fumB* für den anaeroben Metabolismus aktiviert werden (Abb. 6). Wird kein weiteres Signal übermittelt, autodephosphoryliert der Antwort-Regulator DcuR und nimmt wieder seine ursprüngliche responsive Form ein (Krämer, 2008).

3.5. Aufbau der Sensor-Histidinkinase DcuS von *Escherichia coli*

Zweikomponentensysteme bestehen aus einem Sensor und einem Regulator. Die Sensoren sind Histidinkinasen, die als Homodimer vorliegen (Stock *et al.*, 2000). Es wird zwischen cytosolischen und intermembranen Histidinkinasen unterschieden. In cytosolischen Histidinkinasen, wie CheA oder NtrB, liegt der Sensor und die Kinase-Domäne im Cytoplasma (Stock *et al.*, 1988; Jiang & Ninfa, 1999). In 83 % aller Sensor-Kinasen ist jedoch das Protein in der Membran verankert. Sie zählen zu den intermembranen

Histidinkinasen. Dabei kann die Sensor-Domäne mit der Kinase-Domäne sowohl im Cytoplasma (ArcB) oder wie in DcuS, durch eine Transmembrandomäne getrennt im Periplasma liegen (Cock & Whitworth, 2007). Die Sensor-Domäne von DcuS besteht aus einer periplasmatischen und cytoplasmatischen PAS-Domäne, zwei Transmembranhelices und einer Kinase-Domäne (Abb. 7). PAS-Domänen sind in Sensor-Histidinkinasen die häufigsten Sensor-Domänen (Ulrich & Zhulin, 2010).

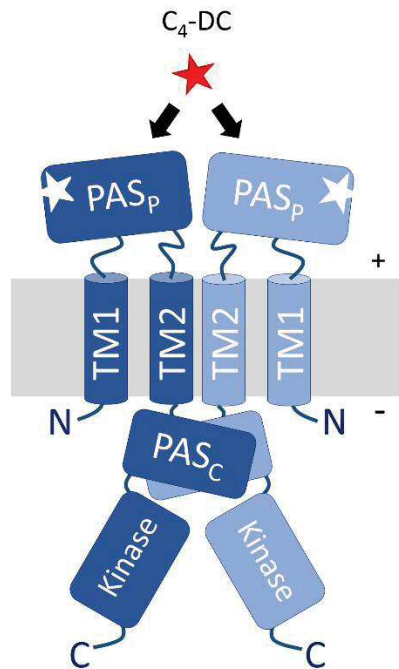


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Sensorkinase DcuS im DcuS/DcuS Dimer. DcuS liegt im Homodimer vor und setzt sich aus folgenden Domänen zusammen: TM1 & 2: Transmembranhelices 1 & 2; PAS_p: periplasmatische Per-Arnt-Sim-Domäne; PAS_c: cytoplasmatische Per-Arnt-Sim-Domäne und Kinase-Domäne. Für weitere Informationen siehe Text.

In der PAS_p-Domäne von DcuS wird stöchiometrisch pro Monomer ein C₄-DC gebunden. Die Affinität zum Effektor variiert je nach Sensor und liegt meist im ein- bis zweistelligen millimolaren Bereich (Kaspar *et al.*, 1999; Busch *et al.*, 2007; Wörner *et al.*, 2016). Die periplasmatische Sensor-Domäne wird von zwei membranintegralen Helices (Transmembranhelix TM1 und TM2) umspannt. Die Signalweiterleitung über die Membrangrenze hinweg, erfolgt über TM2 während TM1 DcuS in der Membran verankert. Zwischen der Transmembrandomäne und Kinase-Domäne befinden sich typischerweise weitere Domänen wie etwa eine GAF- (*cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA*) eine HAMP- (*Histidine kinases, Adenylate cyclases, Methyl accepting proteins and Phosphatases*), oder eine PAS-Domäne (Aravind & Pon-

ting, 1999; Galperin *et al.*, 2001, Krell *et al.*, 2010). Diese Domänen dienen meist einer Signalweiterleitung oder einem Interaktionspunkt mit weiteren Koregulatoren (Appelman & Stewart, 2003; Witan *et al.*, 2012).

Das Signal der Substratperzeption wird nach Signaltransduktion zur Kinase-Domäne über die PAS_C-Domäne an den Antwort-Regulator weitergeleitet. Die Kinase-Domäne lässt sich in die Subdomänen DHp (*dimerization and histidine phosphotransfer*) und HATPase (*histidine kinase ATPase*) gliedern. Die DHp Einheit steht aus zwei α -Helices und beinhaltet den konservierten Histidinrest. Die Helices bilden im Dimer durch hydrophobe Wechselwirkungen ein Vier-Helix-Bündel, welches essentiell für die Signalweiterleitung sind (Marina *et al.*, 2005; Dago *et al.*, 2012). Die HATPase-Domäne katalysiert eine ATP-abhängige Trans- oder Cis-Autophosphorylierung. Beide Typen sind für Transmitterdomänen möglich (Gao & Stock, 2009, Peña-Sandoval & Georgellis, 2010).

3.6. Signaltransduktion in DcuS

Durch die Bindung von C₄-DC in der PAS_P-Domäne wird die Signaltransduktion initiiert. In der Substratbindestelle werden L-Malat und Fumarat bevorzugt gebunden (Kneuper *et al.*, 2005). Nach der Bindung von C₄-DC ziehen sich die β -Faltblätter der PAS_P-Domäne zusammen und schließen das Substrat ein. Die PAS-Domäne des homologen Citratsensors CitA_{Kp} aus *Klebsiella pneumoniae* zeigt eine ähnliche Änderung der Struktur während der Signalperzeption. Die Bindung des Effektors führt zur Kompaktierung des β -Faltblattgerüsts. Wie in CitA_{Kp} bewegt sich die C-terminale α -Helix in PAS_P von DcuS, durch die Kompaktierung des β -Faltblattgerüsts, weg von der Membran (Sevvana *et al.*, 2008). Die C-terminale α -Helix 6 der PAS_P-Domäne und die TM2 bilden eine durchgehende Helix. Durch den Zug der Helix wird die TM2 eines Dimers parallel durch eine kolbenhubförmige Bewegung um 4-6 Å aus der Membran Richtung Periplasma heraus bewegt. Der Begriff der Kolbenhubbewegung ist an die Bewegung des Kolbens im Zylinder einer Verbrennungsmaschine angelehnt und wurde durch Chervitz und Falke (1996) für eine axiale und senkrechte Bewegung einer Transmembranhelix geprägt. Eine Kolbenhubbewegung wurde ebenfalls aufgrund von strukturellen Veränderungen in der periplasmatischen Sensordomäne der Sensorkinasen NarX, TorS und CitA postuliert (Cheung & Hendrickson, 2009; Moore & Hendrickson, 2009; Sevvana *et al.*, 2008). Auf die Kolbenhubbewegung der TM2 folgt über einen cyto-

plasmatischen Linker die Signalweiterleitung an die PAS_C-Domäne. In der PAS_C-Domäne konnte durch Funktionsanalysen eine veränderte quaternäre Struktur von PAS_C postuliert werden, die zur Schwächung der Dimerstruktur führt. Die Signifikanz einer geschwächten Dimerisierung zur Signalweiterleitung in PAS-Domänen konnte ebenfalls für NifL_{AV} aus *Azotobacter vinelandii* oder KinA_{Bs} aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden (Lee *et al.*, 2008; Slavny *et al.*, 2010). Die Signaltransduktion in DcuS und NifL_{AV} erfolgt somit möglicherweise in der cytoplasmatischen PAS-Domäne durch eine Veränderung der Quartärstruktur zwischen zwei Signalzuständen (Slavny *et al.*, 2010; Monzel *et al.* 2013). Die Signaltransduktion in PAS_C führt anschließend zur Autophosphorylierung der Kinase-Domäne von DcuS, die ebenfalls mit einer Schwächung der Quartärstruktur verbunden ist (Marina *et al.*, 2005; Dago *et al.*, 2012; Szurmant und Hoch, 2013). Genaue Konformationsänderungen in der Kinase-Domäne von DcuS sind nicht bekannt. Eine Drehung der α -Helices in der DHp-Domäne wie in *Thermotoga maritima* (Casino *et al.*, 2009; Stewart, 2010) oder eine Biegung der α -Helices wie für VicK_{Sm} aus *Streptococcus mutans* ist denkbar (Wang *et al.*, 2013).

3.7. Ziel der Arbeit

Anhand von Struktur- und Funktionsanalysen besteht eine Vorstellung für die Signaltransduktion in PAS_C von DcuS. Die Weiterleitung des Signals wird über eine Schwächung der Dimerisierung in PAS_C von DcuS postuliert (Monzel *et al.*, 2013). Anhand von *hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry* (HDX-MS) -Experimenten sollten strukturelle Veränderungen während der Signaltransduktion zwischen zwei funktionellen Zuständen untersucht werden. Dabei sollte die Zugänglichkeit von Deuterium in der ON-Variante (N304D) als aktiver Zustand gegenüber dem Wildtyp verglichen werden. Änderungen in der Zugänglichkeit sollten Rückschlüsse auf eine Schwächung der Dimerisierung geben.

Des Weiteren sollte die Methode des Complexome Profilings an Membranproteinen von *E. coli* eingesetzt werden. Dabei wurde die Validierung der Methode anhand von bekannten Komplexen in der anaeroben sowie aeroben Atmungskette von *E. coli* vorgenommen. Die gesammelten Erfahrungswerte beim Complexome Profiling sollten im Anschluss auf publizierte Protein-Interaktionen, innerhalb des C₄-DC-Stoffwechsels, angewandt werden. Des Weiteren sollten neue, mittels Complexome Profiling detektierte Komplexe bzw. Interaktionen mit Hilfe der etablierten Messmethode Bacterial-Two-

Hybrid-System (BACTH) und Membrane Strep Interaction Experiment (mSPINE), verifiziert werden.

Die Funktion von DcuA im C₄-DC-Stoffwechsel wurde bisher als ein Übergangstransporter zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen postuliert. Eine weitere Funktion des Transporters DcuA sollte bezüglich der Kolo-kalisation mit der Aspartase AspA identifiziert werden. Laut Postulat soll DcuA L-Aspartat in die Zelle transportieren, welches durch AspA zu Fumarat desaminiert wird und anschließend im Antiport über DcuA exportiert wird. Die Funktion von DcuA als L-Aspartat-Transporter oder als *[N]-shuttle* unter aeroben Bedingungen sollte mit Hilfe von Wachstumsexperimenten, radioaktiven Transportmessungen sowie Überstandsanalysen untersucht werden.

4. Material und Methoden

Die Materialien und Methoden der Arbeiten Strecker *et al.* (2018) sowie Karinou *et al.* (2017) sind in den jeweiligen Publikationen beschrieben. Alle erstellten Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gottfried Unden (Mainz) katalogisiert und zur Aufbewahrung in 1 ml LB-Medium mit gleichem Volumen Glycerin (50 % v/v) bei -80 °C gelagert.

4.1. Stämme, Plasmide und Primer

Stämme, Plasmide und Primer sind im Anhang 10.1.1 - 10.1.3 aufgelistet.

4.2. Chemikalien

Die Chemikalien sind im Anhang 10.1.4 aufgelistet.

4.3. Kultivierung von Bakterien

Alle Komponenten wurden mit demineralisiertem H₂O angesetzt. Alle Zuchtmedien und Zusätze wurden vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min.) oder falls nötig steril filtriert.

Die Bakterien wurden im Allgemeinen in LB-Medium gezüchtet (Sambrook & Russell, 2001). Wenn nötig, wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten ausgestrichen (LB-Agar + 15 g/l Agar-Agar, Kobe I). Für Wachstumsexperimente, Transportmessungen und Funktionstests wurden die Bakterien in eM9-Medium (pH 7) nach Miller (1992) und Kim *et al.* (2007) gezüchtet. Optionale Effektoren wurden 20 mM hinzugefügt.

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde die Hauptkultur 2 %ig mit einer Übernachtskultur inokuliert und in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37 °C auf dem Schüttler in LB-Medium bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,7 gezüchtet.

Nach einer Transformation wurden die Bakterien in Regenerationsmedium (SOC-Medium) für 1,5 h inkubiert. Das SOC-Medium besteht aus einem SOB-Fertigmedium (Roth) sowie 20 mM Glucose.

Für molekulargenetische Arbeiten erfolgte die Zucht von *E. coli* aerob bei 37 °C über Nacht unter Schütteln (EXCELLA E24, New Brunswick Scientific) in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium.

Für das BACTH-System erfolgte die Anzucht der Bakterien (*E. coli* BTH101) nach Kotransformation mit den Plasmiden der T18- und T25-Fusionen für 48 h bei 30 °C auf KAXI-Platten. Die aerobe Anzucht der Vor- und Hauptkultur erfolgte in 48-*well*-Platten (VWR) in einem Kulturvolumen von 500 µl mit den Zusätzen Dimethylsulfoxid (DMSO, 20 mM), Ampicillin, Kanamycin und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (0,5 mM IPTG) bei 30 °C. Die anaerobe Anzucht von Vor- und Hauptkultur erfolgte in 96-*deep-well*-Platten (VWR International) mit analogen Zusätzen. Die semianaeroben Vorkulturen wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Nach mindestens 7 h Wachstum bei 30 °C wurden die Hauptkulturen mit der Vorkultur inokuliert. Die Positivkontrolle wurde 5 %ig inokuliert, wohingegen die Negativkontrolle und die Proben 10 %ig inokuliert worden sind. Die Zucht der Hauptkulturen erfolgten teilweise aerob unter Schütteln (Titramax 1000, Heidolph) oder anaerob im Anaerobentopf (OXOID) nach 15-minütigem Anaerobisieren und anschließendem Begasen mit Stickstoff. Die Hauptkulturen wurden bis zu einer OD₅₇₀ von 0,3 - 0,6 (96-*well-reader* EL808, Biotek) gezüchtet und anschließend in den β-Galactosidasetest eingesetzt.

Anaerobe Zuchten wurden in eM9 in Anwesenheit von Effektoren (50 mM) durchgeführt. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C gezüchtet. Die Hauptkultur wurde 1 %ig inokuliert und in sterilen Müller-Krempelflaschen (250 ml) gezüchtet. Die Müller-Krempelflaschen wurden mit einem Gummistopfen und einer Metallkrempe luftdicht verschlossen und 45 Minuten an einer Vakuumpumpe angeschlossen. Nach jeweils 15 Minuten wurde das Medium mit Stickstoff begast und geschüttelt. Anschließend wurden die Zuchten bei 30 °C im Wasserbad kultiviert. Nach regelmäßigen Abständen wurde die OD₅₇₈ der Kulturen bestimmt. Die Entnahme der Zellen für die Messungen der OD₅₇₈ erfolgte anaerob mit einer sterilen Kanüle und einer 1 ml Spritze. Bei hohen Zelldichten (OD₅₇₈ > 0,5) wurden die Proben vor der Messung mit eM9 verdünnt. Zur Selektion und Zucht gezielter Bakterien wurden Antibiotika eingesetzt. In dieser Arbeit verwendeten Antibiotikastammlösungen und deren Endkonzentration sind in Tab. 1 angegeben. Bei der Nutzung von zwei Antibiotika wurde die Endkonzentration halbiert.

Tab. 1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml

Die Überproduktion von DcuS erfolgte in BL21DE3. Die Zellen wurden bis zur exponentiellen Phase bei einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8 gezüchtet und anschließend mit 500 µM IPTG für 5 h bei 30 °C induziert.

Die Zucht für die mSPINE Untersuchungen erfolgte im *dcu*-negativen Stamm IMW160 mit den zu untersuchenden plasmidkodierten Dcu-Transporter. Die Plasmide wurden bei einer OD₅₇₈ von 0,8 entsprechend des Promotors mit 100 µM Anhydrotetracyclin (AHT) oder 250 µM Arabinose für 5 h bei 30 °C induziert.

4.4. Puffer und Lösungen

4.4.1. Herstellung elektrokompenter Zellen

Glycerin-MOPS

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

15 % (v/v) Glycerin

4.4.2. Puffer und Lösungen für β-Galactosidasetests (Miller 1992)

β-Galactosidase Reaktionspuffer (pH 7)

100 mM Kaliumphosphat-Puffer

10 mM KCl

1 mM MgCl₂

8 mM Dithiothreitol (DTT)

0,005 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

0,0025 % (w/v) Natriumdesoxycholat (SDC)

Lösungen für den β -Galactosidasetest4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)1 M Na₂CO₃**4.4.3. Transportmessung****Na/K-Pi-Puffer**100 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer1 mM MgSO₄, pH 7**Stopplösung**

0,1 M LiCl (0°C)

4.4.4. Überexpression von verkürzten DcuS Konstrukten

Puffer 1 (Resuspension)	Puffer 2 (Homogenisierung)	Puffer 3 (Elution)
50 mM Tris/HCl, pH 7,7	50 mM Tris/HCl, pH 7,7	50 mM Tris/HCl, pH 7,7
10 mM MgCl ₂	20 mM Imidazol, pH 7	500 mM Imidazol, pH7
	0,5 M NaCl	0,5 M NaCl
	10 % Glycerin	10 % Glycerin

4.4.5. Proteinreinigung in mSPINE-Untersuchungen

Puffer A	Puffer B (Waschpuffer)	Puffer C (Elutionspuffer)
20 mM Tris/HCl, pH 8	100 mM Tris-HCl pH 8	100 mM Tris-HCl pH 8
2 % Empigen zur homogenisierten Membranfraktion in Puffer A	150 mM NaCl	150 mM NaCl
	1 mM EDTA	1mM EDTA
	0,05 % LDAO	0,05 % LDAO
		2,5 mM Desthiobiotin

Die *in vivo* Vernetzung wurde mit 0,6 % Formaldehyd (Roth, 37 %) für 10 Minuten bei 37 °C durchgeführt.

4.4.6. SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting

Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
8 ml Acrylamid-Mix (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid) 6,5 ml H ₂ O 5 ml Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8) 0,2 ml SDS (10 % (w/v)) 0,02 ml TEMED 0,2 ml APS (10 %)	1,9 ml Acrylamid-Mix (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid) 4,7 ml H ₂ O 2,1 ml Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8) 0,081 ml Natriumdodecylsulfat (SDS) (10 % (w/v)) 0,022 ml TEMED 0,033 ml APS (10 %)
Laufpuffer (10 x)	SDS-Probenpuffer (2 x)
250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)	100 mM Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM Dithiothreitol (DTT) 4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin
SDS-Proteinfärbung	Transferpuffer
0,5 % Coomassie brilliant blue 10 % (v/v) Eisessig 50 % (v/v) Ethanol	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Ethanol (v/v)

4.4.7. Immunfärbung

Blockingpuffer	Waschpuffer	Antikörperlösung
5 % (w/v) BSA 0,1 % (v/v) Tween 20 in 1 x PBS	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS	3 % (w/v) BSA 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS 1:10000 Antikörper

4.4.8. Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Western-Blot für entsprechende Tags verwendet: Penta-Anti-His/Hexa-Anti-His (aus Maus) gegen C- und N-terminale His-Tags gerichtet (Sigma-Aldrich), Verdünnung 1:10000; Strep-HRP gekoppelt (IBA Lifesciences), Verdünnung 1:10000; Anti-IgG-Mouse, HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich), Verdünnung 1:10000.

4.4.9. Chemilumineszenz-Entwicklung

Substrat: Immobilon Western HRP Substrat (Merck Millipore)

4.5. Molekulargenetische Methoden

4.5.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifizierung gewünschter DNA-Abschnitte wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Für die PCR wurde DNA-Polymerase PhusionTM-Polymerase mit Korrekturlesefunktion (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Bestandteile der PCR-Ansätze und das PCR-Protokoll der Phusion-Polymerase sind in Tab. 2 aufgeführt. Die Reaktionen wurden in den Thermocyclern iCycler (Bio-Rad) und MyCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Die Elongationszeit und die Anlagerungstemperatur variierten mit der Länge des Amplifikats und der Schmelztemperatur der Primer. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem PCR Purification-Kit von Sigma-Aldrich. Parentale DNA wurden mit dem Enzym FD DpnI laut Herstellerangaben restringiert (Thermo Fisher Scientific). Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Clone Manager und oligocalc (siehe 4.7.2) erstellt und von der Firma MWG Biotech oder Sigma-Aldrich synthetisiert.

Tab. 2: PCR-Protokoll

PCR-Komponenten		PCR-Protokoll
PCR-Puffer	10 µl HF-Puffer (5 x)	1. Init. Denaturierung 98°C / 30 s
dNTP Mix (10 mM)	1 µl	2. Denaturierung 98°C / 20 s
1 M Dimethylsulfoxid	1 µl	3. Annealing T _m + 3°C, 30 sec
Primer (10 µM)	Je 2,5 µl	4. Elongation 72°C / 15-30 s/kb
Template DNA	50-200 ng	5. finale Elongation 72°C / 10 min
Polymerase	0,5 µl	Zyklenzahl der 30
destilliertes H ₂ O	ad 50 µl	Schritte 2-4

4.5.2. Gerichtete Mutagenese

Für die Erstellung neuer Restriktionsschnittstellen, ON-Varianten für DcuS oder His-Tags für Dcu-Sandwich-Konstrukte wurde eine gerichtete Mutagenese analog zum QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Die Mutationen wurden durch eine PCR mit Mutageneseprimer (Anhang, Tab. 8) erstellt. Nach einem Restriktionsverdau parentaler DNA mit FD DpnI (Thermo Fisher Scientific) wurden die PCR-Produkte in elektrokompente Zellen XL-1 Blue transformiert.

4.5.3. Herstellung elektrokompenter Zellen

Die Vorkultur wurde aerob bei 37 °C in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht gezüchtet. Nach einer 1-2 %igen Inokulation der Hauptkultur, wurde diese in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 gezüchtet und das Wachstum auf Eis gestoppt. Im Anschluss daran, wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 UpM, 4 °C, 10 min) geerntet und drei Mal mit 10 ml Glycerin-MOPS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 1 µl Glycerin-MOPS-Puffer pro 1 ml Zellkultur resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

4.5.4. Transformation mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein Ansatz aus 1-5 µl Plasmid-DNA und 50-60 µl elektrokompenter Zellen gemischt und in einer sterilen Elektroporationsküvette mit einem Eporator (Eppendorf) transformiert. Anschließend wurde der Ansatz in 1 ml vorgewärmten SOC-Medium resuspendiert und bei 37 °C im Schüttler für 1,5 h inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert oder pelletiert, in 50 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.5.5. Klonierung

Die DNA-Moleküle wurden nach der PCR mit dem „PCR Purification“-Kit (Sigma Aldrich) gereinigt und mit Restriktionsenzymen (Thermo Fisher Scientific) laut dem Hersteller-Protokoll geschnitten. Die Überprüfung der Restriktion erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Zur Vermeidung einer Ligation des restringierten Vektors, wurde dieser mit der Fast Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) nach dem Herstellerprotokoll dephosphoryliert und durch Hitze bei 75 °C für 20 Minuten inaktiviert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente und der dephosphorylierte Vektor in einem Verhältnis von 1:5 ligiert. Die Ligation erfolgte mit der T₄-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C. Das Enzym wurde mittels Hitze inaktiviert (70 °C für 5 min.). Die benötigten Mengen von Vektor und DNA-Fragment wurden mit Hilfe des Programms Ligation Calculator ermittelt (siehe 4.7.2).

4.5.6. Konstruktion der Plasmide

Verkürzte Konstrukte von DcuS

Die Klonierung von DcuS erfolgte aus genomischer DNA des *E. coli*-Stamms AN387. Der Vektor pET28a mit einem C- und N-terminalen His-Tag wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SacI geschnitten und dephosphoryliert. Der Genabschnitt für den cytoplasmatischen Teil des Sensors DcuS (DcuS_{PK}) wurde von Aminosäure 212 - 543 mit Primern aus Tab. 8 (Anhang, 10.1.3) vom Stamm AN387 amplifiziert, mit identischen Restriktionsenzymen geschnitten und in den Vektor ligiert. Die Konstrukte wurden nach der Erstellung durch Sequenzierung bestätigt. Die Generierung von ON-Varianten erfolgte mittels gerichteter Mutagenese (siehe 4.5.2).

Sandwichkonstrukte für BACTH

Für die Sandwich-Konstrukte von DcuA wurde aus dem Plasmid pMW 449 mit den Primern $p_{KNT25/pUT18-BamHI}DcuA_{1-207-}for$ und $p_{KNT25/pUT18-DcuA_{1-207-EcoRI-}rev$ amplifiziert, mit BamHI und EcoRI restringiert und mit dem Vektor pKNT25 zu $DcuA_{1-207-T25}$ und mit pUT18 zu $DcuA_{1-207-T18}$ ligiert. Anschließend wurden durch Mutagenese mit den Primern $p_{KNT25-KpnI-}for$ und $p_{KNT25-KpnI-}rev$ bzw. $p_{UT18-NheI-}for$ und $p_{UT18-NheI-}rev$ Schnittstellen für die Restriktionsenzyme KpnI und NheI eingeführt und das Stoppcodon von T25 bzw. T18 entfernt. Das Plasmid wurde nach der Einführung neuer Schnittstellen mit der zweiten Genhälfte von *dcuA* ligiert, nachdem diese aus pMW449 mit den Primern $p_{KNT25/pUT18-ClaI}DcuA_{208-433-}for$ und $p_{KNT25-DcuA_{208-433-KpnI-}rev}$ bzw. $p_{UT18-DcuA_{208-433-NheI-}rev}$ amplifiziert und mit ClaI und KpnI bzw. ClaI und NheI geschnitten wurde. Somit kodieren die DcuA-Sandwich-Konstrukte für die N-terminale Hälfte von DcuA, gefolgt von T25 oder T18 und der C-terminalen Hälfte von DcuA (Abb. 8).

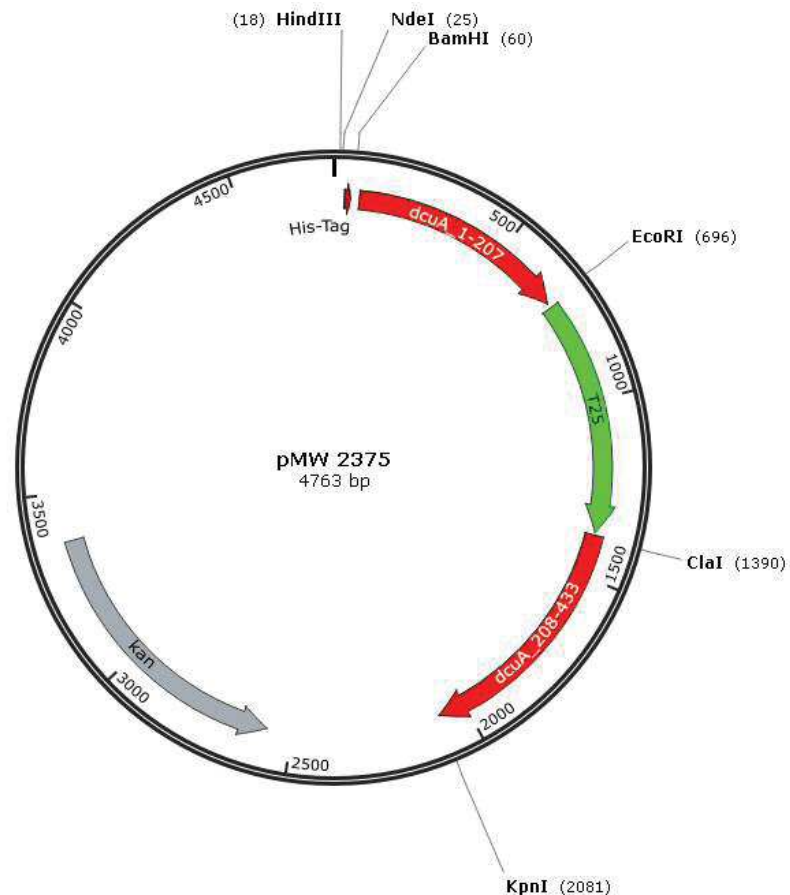


Abb. 8: Plasmid für die Expression des Sandwichkonstrukts DcuA_{sw-T25}. Dargestellt sind die verwendeten Restriktionsenzyme, das T25-Fragment sowie die Fragmente des Gens *dcuA*. Das Plasmid pMW2375 enthält eine Kanamycinresistenz und kodiert für die N-terminale Hälfte von DcuA, gefolgt von T25 und der C-terminalen Hälfte von DcuA. Als Vektor wurde pKNT25 verwendet.

Die Wahl der Insertionslokation des T25- und T18-Fragments erfolgte für DcuC aufgrund von computergestützten Topologievorhersagen (Abb. 9).

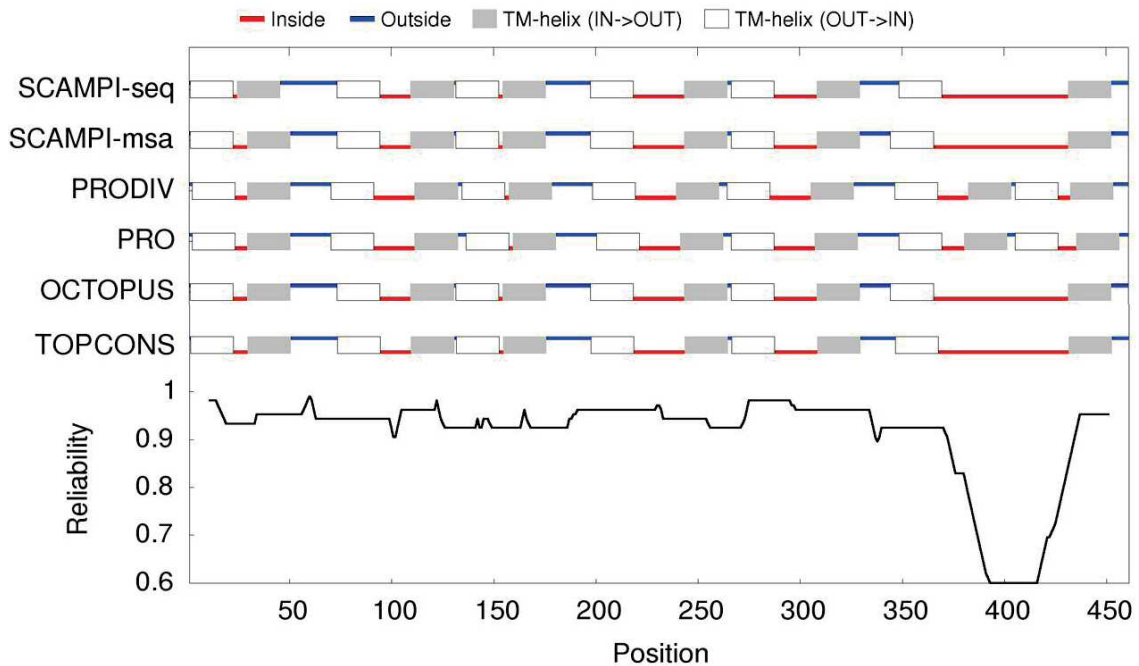


Abb. 9: Vorhersage der DcuC-Topologie durch *in silico* Analysen. Transmembranhelices sind als graue bzw. weiße Balken entsprechend ihrer Orientierung dargestellt. Perplasmatische und cytoplasmatische Aminosäurereste sind durch blaue bzw. rote Linien angegeben. Die Positionen der Aminosäurereste sind auf der Abszisse dargestellt. Auf der Ordinate sind die verwendeten Programme sowie die Zuverlässigkeit der vorhergesagten Lokalisationen angegeben.

Aufgrund der unterschiedlichen Vorhersagen für den Bereich zwischen der Helix XI und XII wurde die cytoplasmatische Schleife zwischen Helix VII und VIII für die Insertion des T25- und des T18-Fragments ausgewählt. Die Konstruktion der DcuC-Sandwich-Konstrukte erfolgte analog zur DcuA-Sandwich-Konstruktion.

Plasmide für mSPINE

Für die Interaktionsuntersuchungen mittels mSPINE wurden die C-Termini von DcuA und DcuC einem Strep-Tag versehen. Die Gene wurden mit Primern aus Tab. 8 (Anhang, 10.1.3) vom Stamm AN387 amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA3plus (Anhang, 10.1.2, Tab. 7) kloniert. Die Konstrukte wurden nach der Erstellung durch Sequenzierung bestätigt. Für die Untersuchung einer Interaktion mit DcuB wurde ein Konstrukt mit C-terminaler PhoA Fusion aus Bauer *et al.* (2011) verwendet.

4.5.7. Identifikation von Membranproteinen

Die Identifikation von Membranproteinen von *E. coli* wurde von der Arbeitsgruppe Functional Proteomics, SFB 815 Core Unit (Dr. I. Wittig) an der Universität in Frankfurt durchgeführt.

400 µg isolierte Membranen wurden in 40 µl Mg²⁺-Solubilisierungspuffer resuspendiert, jeweils 8 µl Digitonin hinzupipettiert und für 20 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C bei 22000 G pelletiert. Neben den zu untersuchenden Proben wurde zur Bestimmung des Molekulargewichts 400 µg Rinderherz Mitochondrien verwendet. Nach der Isolierung der Membranproteine wurden diese jeweils in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 3 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 und 5 µl Ponceau S versetzt. Die Proteinkomplexe wurden anschließend in der Blau-Nativ-Gelelektrophorese in einem Gradientengel (3 - 18 %) für anfangs bei 600 V und 10 mA und nach 30 Minuten bei 15 mA getrennt (Wittig *et al.*, 2006). Anschließend wurde das Gel parallel zur Lauffront in 60 gleichgroße Gelschnitte zerteilt und in einer *well*-Platte mit der Serinprotease Trypsin verdaut. Nach dem Trypsinverdau wurden die Peptide mit Hilfe einer gekoppelten labelfreien quantitativen nano-Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (nano-LC-MS/MS) analysiert. Die Peptide wurden mit dem Programm Mascot abgeglichen und ein Maß für die im Gelschnitt enthaltene Menge des Proteins bestimmt. Neben der relativen Menge wurde die Deckung (*coverage*) der ermittelten Peptide mit dem Protein ermittelt, sowie die Anzahl der *Unique peptides*, die charakteristisch für jedes Protein sind, bestimmt. Durch die Identifizierung jedes Proteins und seiner relativen Menge wurde für jedes gefundene Protein ein Migrationsprofil erstellt. Diese wurden in darauffolgenden Schritten weiter analysiert (siehe 4.7.1).

4.6. Biochemische Methoden

4.6.1. Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität

***In vivo* Komplementationsstudien mit verkürztem DcuS und dessen ON-Varianten**

Für die Messung anaerober *dcuB'*-*lacZ* Reporterergenaktivitäten im *dcuS*-negativen Stamm IMW260 wurden die Zellen bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8 gezüchtet. Die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität wurde nach Monzel *et al.* (2013) durchgeführt. Der Test zur quantitativen Bestimmung β-Galactosidaseaktivität wurde in 96-*well*-

Platten von drei unabhängigen Kulturen in einer Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 570 nm vor Testbeginn und die Extinktionmessung nach des β -Galactosidasetests zur Bestimmung des gebildeten ortho-Nitrophenols, erfolgte im Mikrotiterplattenphotometer (EL808, BioTek Instruments, Gen5-Software). Der Zellaufschluss von 0,2 ml Zellkultur erfolgte in 96-*deep-well*-Platten mit 0,8 ml β -Galactosidase-Puffer pro *well* durch mehrmaliges Mischen mit einer automatischen Mehrkanalpipette (Rainin, E4 XLS 100 - 1200 μ l LTS). Anschließend wurden vier Aliquots à 150 μ l in 96-*well*-Platten pro *well* überführt und bei 30 °C für 5 Minuten vorgewärmt. Der Test wurde durch Zugabe von 30 μ l frisch angesetztem ONPG pro *well* gestartet und nach 20-minütiger Inkubation bei 30 °C durch 70 μ l Natriumcarbonat (1 M Na₂CO₃) abgestoppt. Anschließend wurde die Extinktion der Proben im Mikrotiterplattenphotometer bestimmt und die Miller Units berechnet.

Bacterial-Two-Hybrid (BACTH)-System

Das BACTH-System dient zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen durch eine funktionale Rekonstitution der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis*. Die Domäne setzt sich aus einem T25- und T18-Fragment zusammen und katalysiert die Reaktion von ATP zu cAMP. Werden die T25- und T18-Fragmente durch Fusionen an zwei interagierenden Proteinen in räumliche Nähe zusammengebracht, kann die katalytische Funktion der Adenylatcyclase wiederhergestellt werden. Die Abwesenheit einer katalytischen Aktivität kann somit auf eine fehlende Interaktion oder auf sterische Effekte zurückführen. Die Interaktionsmessungen erfolgten im *cya*-(Adenylatcyclase)-negativen *E. coli*-Stamm BTH101. Die Plasmide, die T18- und T25-Fusionsproteine enthielten, wurden zu 30 ng mittels Elektroporation in den Stamm BTH101 kotransformiert. Die Kultivierung erfolgte für 48 h bei 30 °C. Als Positivkontrolle in den Interaktionsmessungen wurde eine Kombination aus zwei Leucinzipper-Domänen (T25zip und T18zip) verwendet, die eine starke Interaktion unter anaeroben und aeroben Bedingungen aufweisen. Als Negativkontrolle wurde eine Kombination aus einer fusionierten Leucinzipper-Domäne und einer DcuA-Fusion gewählt (T25zip und DcuA_{sw}).

4.6.2. Expression und Reinigung von verkürzten DcuS Konstrukten (DcuS_{PK})

Die Expression von DcuS_{PK} erfolgte nach Transformation mittels Elektroporation in *E. coli* BL21(DE3). DcuS_{PK} wurde in dem Vektor pET28a exprimiert und besitzt zur Isolation einen N- und C-terminalen His-Tag. Die Zellzucht erfolgte wie in Abschnitt 4.3 beschrieben. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 Upm (Beckman JA-10 Rotor, 4 °C). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml Puffer 1 aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte in 2 Durchgängen mittels French Press bei 20000 Psi. Nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min bei 10000 Upm). Die Proteine im Überstand wurden mittels Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Säule (Nickel-Nitrilotriacetat-Säule, Qiagen) isoliert. Das Säulenvolumen betrug 1,5 ml. Zuvor wurde die Säule mit 5 ml Puffer 2 äquilibriert. Der Überstand wurde in zwei Durchgängen auf die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend drei Mal mit 5 ml Puffer 2 gewaschen. Die Elution erfolgte in 5 Schritten à 1 ml durch Zugabe von 500 mM Imidazol in Puffer 3. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde in der SDS-PAGE überprüft.

4.6.3. Interaktionsstudien mittels mSPINE (Membrane Strep Interaction Experiment)

Die Interaktionsstudien mittels mSPINE wurden nach Müller *et al.* (2011) durchgeführt. Zwei Dcu-Proteine wurden durch Kotransformation in den *dcu*-negativen Stamm IMW160 gebracht und wie in 4.3 beschrieben gezüchtet. Für die *in vivo* Vernetzung wurden die Zellen für 10 min bei 37 °C mit 0,6 % Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min bei 6000 Upm, Beckman JA-10 Rotor, 4 °C) geerntet, zweimal in 20 ml Puffer A gewaschen und abschließend in 20 ml Puffer A resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press bei 20000 Psi in 3 Durchgängen. Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 10000 Upm). Die im Überstand enthaltene Membranfraktion wurde mittels Ultrazentrifugation pelletiert (65 min bei 45000 Upm, 4 °C, Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38). Nach Homogenisierung des Membranpellets in 2 ml Puffer A, wurden zur Solubilisierung von Membranproteinen 2 % Empigen BB (N, N-Dimethyl-N-dodecylglycin-betain, 35 % in H₂O, Fluka) zugefügt und auf Eis für 60 Minuten mit einem Rührfisch gerührt. Nicht solubilisierbare Membranproteine sowie

weitere Bestandteile aus der Membran wurden durch Zentrifugation (50 min bei 50000 Upm, 4 °C, Beckman Coulter Optima LE-80K, Rotor TFT 70.38) von Membranproteinen getrennt. Die im Überstand enthaltenen Membranproteine wurden mit Hilfe der Affinitätschromatographie durch eine Strep-Tactin-Säule (1,5 ml Superflow Strep-Tactin Sepharose, IBA, Göttingen) bei 4 °C isoliert. Nach Zugabe von 3 ml Strep-Tactin wurde die Säule mit 5 ml Puffer B äquilibriert. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben und 3 x 5 ml Puffer B gewaschen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgte mit 5 x 1 ml Puffer C. Das Eluat wurde mittels Zentrifugation in Konzentratröhrchen (Vivaspin 6, MWCO 10000, Sartorius stedim) auf ein Volumen von 20 µl konzentriert. Die kovalente Bindung durch Formaldehyd wurde durch Aufkochen der Proben bei 95 °C für 10 min gelöst. Die Proteine im konzentrierten Eluat wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot nachgewiesen.

4.6.4. SDS-Page, Western-Blot und Antikörperfärbung

Zur Kontrolle der Expression der verkürzten DcuS-Konstrukte sowie zur Detektion von koeluierten Proteine im mSPINE wurden die Proben mit 2-fachem SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C im Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf) inkubiert. 10 µl der Elutionsfraktionen von DcuSPK oder 10 µl der konzentrierten Elutionsfraktion aus den mSPINE Untersuchungen wurden bei einer konstanten Spannung von 120 V für 70-90 Minuten in der SDS-Gelelektrophorese anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Nach der Auftrennung wurden die Gele entweder zur Überprüfung der Reinheit mit Coomassie gefärbt oder zur Detektion der fusionierten Tags im Semi-dry Western-Blot verwendet.

4.6.5. Semi-dry Western-Blot

Nach der Auftrennung wurden die Proteine mittels *semi-dry* Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman, GE Healthcare) transferiert, um die Konstrukte anschließend mittels Antikörperfärbung nachzuweisen. Dazu wurden zwei Lagen Chromatographiepapier (2043B, Schleicher & Schüll), die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und wiederum 2 Lagen Chromatographiepapier im Sandwich-Verfahren zwischen die Anode und Kathode des Pierce Fast Semi-Dry Blotters (Thermo Scientific) platziert. Alle Komponenten wurden kurz vorher mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer er-

folgte für 45 Minuten bei konstanter Stromstärke, die zuvor mit folgender Formel berechnet wurde.

A=Fläche der Nitrocellulosemembran

n= Anzahl der Membranen

4.6.6. Antikörperfärbung

Für die Antikörperfärbung nach dem Proteintransfer wurden freie Bindungsstellen auf der Membran durch eine Inkubation mit 20 ml Blockingpuffer auf dem Taumelschüttler über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Anschließend erfolgte die Bindung des primären Antikörpers und des sekundären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur. Der Strep-Antikörper war direkt an HRP gekoppelt und musste nicht mit einem sekundären Antikörper inkubiert werden. Zwischen den Inkubationen wurde nichtgebundener Antikörper durch jeweils 3 Waschschriffe von 10 Minuten mit 20 ml Waschpuffer entfernt. Während den Inkubations- sowie Waschschriffen wurden die Ansätze auf einem Plattformschüttler (Polymax 1040; Heidolph) geschüttelt. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Blots vorsichtig mit einem Kosmetiktuch abgetrocknet. Der sekundäre Antikörper ist mit einer *horseradish peroxidase* gekoppelt und wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Dazu wurde 350 µl Immobilon Western HRP Substrat (Millipore) mit 350 µl der entsprechenden Peroxidlösung gemischt, die Blots für 5 Minuten bedeckt und nach der Inkubation überschüssiges Substrat entfernt. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (LucentBlue X-ray film, Advansta) aufgelegt und die Lumineszenz detektiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit dem Röntgenfilm-Prozessor SRX-101 A (Konica Minolta).

4.6.7. Transportmessung

Die Zucht der Bakterien erfolgte wie in 4.3 für die Transportmessung beschrieben. Nach Erreichen der spätlogarithmischen Phase bei einer OD₅₇₈ von 1 wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation (6000 UpM) geerntet, zwei Mal in Na/K-Pi-Puffer (pH 7) gewaschen und in selbigem Puffer auf eine OD₅₇₈ von 7 - 8 eingestellt. Zur Messung der Transportaktivität wurden die Zellen mit 100 µM [¹⁴C] Aspartat inkubiert. Die Aufnahme wurde durch Überführen von 100 µl Zellen zu 900 µl eisgekühlter Lithiumchlorid-Lösung (LiCl 0,1 M) gestoppt. Zur Vermeidung einer weiteren Aufnahme

wurden die Zellen mit einem Vakuum-Filtrationsgerät (FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Pharmacia Biotech) durch Glasfaserfilter (APFF, Ø25 mm, Porengröße 0,7 µm, Millipore) filtriert und zwei Mal mit Lithiumchlorid-Lösung (0,1 M, 0 °C) gewaschen. Zur Bestimmung der Radioaktivität in der Zelle wurden die Membranfilter in Scintillationsröhrchen mit 4 ml Scintillationslösung (Rotiszint® eco plus, Roth) überführt. Die Radioaktivität wurde mit dem Scintillationszähler (Perkin Elmer) bestimmt und die Aufnahmeaktivität nach Engel *et al.* (1992) berechnet.

4.6.8. Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS)

Die Probenvorbereitung für die HDX-MS wurde durch einen zweiarmigen Roboter (Autosampler, LEAP Technologies) unterstützt. Der H/D-Austausch wurde durch Verdünnen von DcuSPK oder DcuSPKL (6,5 µl; 50 mM) mit 58,5 µl D₂O-haltigem SEC-Puffer (20 mM HEPES-Na pH 7,5, 500 mM NaCl) gestartet und bei 25 °C für 10/30/95/1000/10000 Sekunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Mischen von 60 µl der H/D-Reaktion mit gleichem Volumen an Quench-Puffer (400 mM KH₂PO₄/H₃PO₄, 2 M Guanidin-HCl, pH 2,2) bei 1 °C gestoppt und 100 µl der Mischung direkt in ein ACQUITY UPLC M-Klassensystem mit HDX-Technologie (Waters) injiziert (Wales *et al.*, 2008). Undeuterierte Proben von DcuSPK und DcuSPKL wurden durch 10-fache Verdünnung in H₂O-haltigem SEC-Puffer inkubiert, gestoppt und in das LC-MS-System injiziert. Der Verdau wurde unter Verwendung von immobilisiertem Schweinepepsin bei 12 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 100 µl/min (Wasser + 0,1% (v/v) Ameisensäure) durchgeführt. Die resultierenden Peptide wurden bei 0,5 °C an eine C18-Säule (ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm 1,0 x 100 mm Säule (Waters)) gebunden. Nach drei Minuten wurden die Peptide bei 0,5 °C unter Verwendung eines Gradienten von H₂O + 0,1 % (V/V) Ameisensäure (A) mit Acetonitril + 0,1 % (V/V) Ameisensäure (B) bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min wie folgt eluiert: 0-7 min/95-65 % A, 7-8 min/65-15 % A, 8-10 min/15 % A, 10-11 min/ 5% A, 11-16 min/95 % A. Massenspektren wurden auf einem G2-Si HDMS (Waters) Massenspektrometer in High Definition MS (HDMS) bzw. in Enhanced High Definition MS (HDMSE) mit positivem Ionenmodus für deuterierte bzw. undeuterierte Proben aufgenommen (Geromanos *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2009). Die Massenkorrektur wurde unter Verwendung des [Glu1]-Fibrinopeptids B-Standards (Waters) durchgeführt. Für jede Inkubationszeit wurden drei Replikate gemessen. Zwischen jedem Durchlauf wurde die

Pepsin-Säule dreimal mit 80 µl 4 % (v/v) Acetonitril und 0,5 M Guanidinhydrochlorid gewaschen. Zur Reduzierung einer Verschleppung von Peptiden wurde zusätzlich jeweils ein Leerlauf ohne Probe durchgeführt. Die Peptididentifizierung und die Bestimmung der Deuteriumaufnahme wurde mit Hilfe der Programme PLGS und DynamX 3.0 durchgeführt (Steinchen *et al.*, 2015, Schaper & Steinchen, 2017, Karniel, 2018).

4.7. Bioinformatische Methoden

4.7.1. Gruppierung und Analyse der Migrationsprofile

Das angewandte Verfahren des Complexome Profiling basiert auf der Annahme, dass Proteine, die als Komplex zusammen durch das Gradientengel gewandert sind, ähnliche Migrationsmuster (Migrationsprofile) aufweisen. Der Datensatz von 1272 Proteinen und 60 Gelschnitten je experimentellem Ansatz wurde mit dem Programm NOVA© analysiert. Mit dem Programm ist es möglich die Daten direkt nach der Identifizierung der Proteine in das Programm einzuspeisen. Die Normalisierung, das Clustering und die Visualisierung der Proteine konnte in einem Schritt durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden die Profile der Proteine mit einer agglomerativen Clusteranalyse gruppiert. Dabei werden ähnliche Elemente gesucht und schrittweise in Cluster anwachsender Größe zusammengefasst. Als etabliertes Clusterverfahren kam der Fusionsalgorithmus Average-Linkage in Kombination mit einem auf dem unzentrierten Pearsonkorrelation basierten Distanzmaß (*correlation uncentered*) zum Einsatz. Nach dem Zusammengruppieren wurden die Migrationsprofile der Proteine der Enzymkomplexe der Atmungskette, sowie die Proteine des C₄-DC-Stoffwechsels identifiziert und analysiert.

4.7.2. Bioinformatische Programme und Datenbanken

Datenbanken

EcoCyc: <http://www.ecocyc.org>

EcoGene: <http://www.ecogene.org>

KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Uniprot: <http://www.uniprot.org>

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Sequenzierungskontrolle

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ClustalW2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Vorhersage von Transmembrandomänen

TOPCONS: <http://topcons.cbr.su.se/>

Vorhersage von Interaktionspartner

STRING-DB: <https://string-db.org/>

Weitere Programme

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

Ligation Calculator: http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html

Clone Manager 5.0, Sci-Ed Software

UCSF Chimera, Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI),

UCSF

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse für die Funktionsanalyse des aeroben Transporters DcuA und für DauA als Signalgeber durch die Interaktion mit DctA sind in den Publikationen Strecker *et al.*, 2018 und Karinou *et al.*, 2017 beschrieben und werden hier nur kurz zusammengefasst. Die Ergebnisse für die Signaltransduktion in DcuS durch die cytoplasmatische PAS-Domäne sowie die Identifikation neuer Interaktionspartner im C₄-DC-Metabolismus sind bisher nicht publiziert und werden detaillierter behandelt.

5.1. Die Funktionsweise des aeroben Transporters DcuA

Unter aeroben Bedingungen kann *Escherichia coli* (*E. coli*) C₄-Dicarboxylate (C₄-DC) metabolisieren. Diese werden dabei über das Zweikomponentensystem (ZKS) DcuS-DcuR perzipiert und über den aeroben Transporter DctA in die Zelle transportiert. Ein weiterer Transporter, der ebenfalls unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen exprimiert wird, ist der C₄-DC Transporter DcuA. In Deletionsstudien von Golby *et al.* (1998), konnte gezeigt werden, dass der Verlust des aeroben Transporters DctA nicht vollständig durch den Transporter DcuA komplementiert werden kann. Aufgrund der konstitutiven Expression wurde DcuA als Übergangstransporter zwischen aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen postuliert. In der Arbeit Strecker *et al.* (2018) konnte eine weitere neue Funktion von DcuA unter aeroben Wachstumsbedingungen gezeigt werden. In Deletionsstudien von unterschiedlichen aeroben Transportern, in denen L-Aspartat als einzige Stickstoffquelle diente, konnte ein Hinweis für die Funktionsweise von DcuA identifiziert werden. Die Deletion des Transporters DcuA führte zu einem drastischen Wachstumsverlust. Der Verlust von anderen aeroben Transportern, wie z.B. DauA oder Glp, zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli*. Somit konnte DcuA als Haupttransporter für L-Aspartat unter aeroben Bedingungen, in denen nur L-Aspartat als Stickstoffquelle diente, ermittelt werden. Dabei wird das aufgenommene L-Aspartat durch die Transaminase AspA, welche sich in einem Operon mit DcuA befindet, desaminiert. DctA spielt unter diesen Wachstumsbedingungen nur eine kleine Rolle und kann L-Aspartat als Stickstoffquelle nicht in ausreichenden Mengen transportieren. Die unterschiedlichen Transportraten für C₄-DC unter aeroben Bedingungen wurden für die Transporter DctA und DcuA mit Hilfe von radioaktiv markierten Substraten untersucht. Während DcuA bevorzugt L-Aspartat transportierte, konnte für DctA, wie bereits von Kay und Kornberg (1971) gezeigt, eine Präferenz für die Substrate Suc-

cinat und Fumarat bestätigt werden. Diese Unterschiede konnten durch Bestimmung der K_M -Werte und durch Konkurrenzexperimente zusätzlich bestätigt werden. DcuA hat für L-Aspartat und Succinat einen K_M von 43 μM bzw. 844 μM . DctA präferiert Succinat gegenüber Aspartat und besitzt einen K_M von 24 μM für Succinat gegenüber 148 μM für L-Aspartat. In Konkurrenzexperimenten wurden die Substratspezifitäten verdeutlicht. Während Fumarat und Succinat nur eine geringe Konkurrenz für den L-Aspartat-Transport durch DcuA bewirkte, war der Transport durch DctA deutlich beeinflusst. Ein weiterer Unterschied der aeroben Transporter konnte durch die Energetisierung während den Transportmessungen mit Glucose oder Glycerin gezeigt werden. Der Transport von L-Aspartat über DcuA wird durch die Energetisierung begünstigt, wohingegen der Transporter DctA höhere Transportraten unter nicht energetisierenden Bedingungen zeigt. DcuA ist somit hoch spezifisch für den aeroben Transport von L-Aspartat in Stickstoffabwesenheit, während DctA für den Transport von C₄-DC in komplexen Medien verantwortlich ist.

Unter anaeroben Bedingungen werden neben dem Transporter DcuA, der Haupttransporter für C₄-DC, DcuB sowie der Succinatexporter DcuC exprimiert. DcuA und DcuB sind homolog und gehören zu einer Proteinfamilie. Die anaeroben Dcu-Transporter können den Verlust eines Transporters untereinander kompensieren. Alle Transporter können sowohl Symport, Antiport als auch Export betreiben. In weiteren Experimenten wurde somit der Antiport von DcuA unter aeroben Bedingungen untersucht. Durch die Kollokalisierung von AspA mit DcuA wurde ein Antiport nach der Desaminierung von L-Aspartat für das entstehende Fumarat postuliert. Der Antiport von L-Aspartat gegenüber Fumarat konnte sowohl durch Transportmessungen, als auch durch enzymatische Überstandsmessungen verifiziert werden. Dabei konnte Fumarat in äquimolaren Mengen zum Verbrauch von L-Aspartat im Überstand detektiert werden. Während dem Wachstum bis zu einer OD₅₈₇ von 1 wurde 3 mM Aspartat metabolisiert. Bei dieser optischen Dichte hat *E. coli* eine Masse von 281 mg pro Liter. Stickstoff macht dabei einen Anteil von ca. 14 % aus. Der Verbrauch von 3 mM Aspartat entspricht in der Bilanz somit sehr genau der Bildung von 42 mg Stickstoff während dem Wachstum bis zu einer OD von 1. Daraus ergibt sich eine neue Funktion von DcuA unter aeroben Bedingungen als *[N]-shuttle*. Das aufgenommene Aspartat wird über die Transaminase AspA zu Fumarat desaminiert. Das entstehende Ammoniumion wird für den Anabolismus verwendet, wohingegen das Fumarat über DcuA in einem Antiport mit Aspartat exportiert wird.

5.2. DauA fungiert durch die Interaktion mit DctA als Signalgeber

Unter sauren Wachstumsbedingungen werden C₄-DC über den aeroben Transporter DauA transportiert und unter neutralen Wachstumsbedingungen über DctA. Die Regulation der Expression des Transporters DctA wird einerseits über das ZKS DcuS-DcuR reguliert, andererseits konnte ein Einfluss von DauA auf die Expression von DctA gezeigt werden (Karinou *et al.*, 2013). In der Arbeit von Karinou *et al.* (2017) konnte erstmals der Einfluss von DauA auf die Proteinaktivität und Produktion von DctA sowie eine direkte Protein-Protein Interaktion der Transporter gezeigt werden. In Wachstumsexperimenten führte die Deletion des Transporters DauA zu einem verringerten Wachstum und einer niedrigeren Transportrate von radioaktiv markiertem Fumarat unter neutralen pH-Werten. Die Reduktion der Expression des Transporters DctA durch einen Verlust von DauA konnte in einem Immuno-Blot nachgewiesen werden. Dabei wurden die Transporter DctA und DauA chromosomal mit einem His-Tag versehen. Nach Kultivierung und Isolation der Membran wurde die Menge an gebildetem Protein anhand der Bandenintensität in verschiedenen Deletionsmutanten verglichen. Der Verlust des Transporters DctA hat keinen Einfluss auf die Bandenintensität von DauA im Vergleich zum Wildtyp. Wird jedoch hingegen DauA deletiert, reduziert sich die Expression des Transporters DctA. Die Regulation findet hierbei wahrscheinlich über eine direkte Protein-Protein Interaktion statt, welche mittels BACTH und *pull down assay* bestätigt werden konnte. Die Interaktion findet hierbei über die Transmembrandomänen der Proteine statt. Eine weitere Bestätigung einer direkten Proteininteraktion wurde *in vivo* durch die Lokalisation des Transporters DauA in der Zelle geliefert. Das ZKS DcuS-DcuR liegt im Komplex mit DctA an den Polen der Zelle vor (Steinmetz *et al.*, 2014). Plasmidkodierte DauA wurde mit einem Fluoreszenzprotein markiert und die Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie in der Zelle untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Anhäufung des Proteins an den Polen der Zelle. Somit entsteht unter aeroben Wachstumsbedingungen ein Komplex, bestehend aus dem ZKS DcuS-DcuR, DctA und DauA. DctA versetzt durch die direkte Interaktion den Sensor in einen responsiven Zustand, wohingegen DauA über eine direkte Interaktion mit DctA dessen Aktivität und Expression reguliert.

5.3. Signaltransduktion über die PAS_C-Domäne des Sensors DcuS

5.3.1. Punktmutationen und Funktionsstudien geben ersten Hinweis auf die Signaltransduktion

Der Sensor DcuS liegt unabhängig vom Signalzustand als Homodimer oder höheres Oligomer in der Zelle vor (Scheu *et al.*, 2010; 2012). DcuS besteht aus zwei Transmembranhelices, welche den Sensor in der Membran verankern und das Signal über die Membran weiterleiten, einer periplasmatischen Per Arnt Sim (PAS_P)-Domäne für die Signalerkennung, einer cytoplasmatischen PAS-Domäne sowie einer Kinase-Domäne für den Signalausgang. Die PAS_C-Domäne befindet sich zwischen der zweiten Transmembranhelix und der Kinase-Domäne. Sie weist typische Faltungen einer PAS-Domäne auf und besteht aus einer N-terminalen Helix, einem zentralen β -Faltblattgerüst sowie weiteren α -Helices im Zentrum. Die Signaltransduktion findet nach dem Signaleingang an der PAS_P-Domäne über einen Kolbenhub-Mechanismus der zweiten Transmembranhelix durch die Membran zur PAS_C-Domäne statt. Die Domäne leitet das Signal über eine Konformationsänderung an die Kinase-Domäne weiter, dessen Aktivierung eine Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest auslöst (Abo Amer *et al.*, 2004, Monzel *et al.*, 2013; Monzel *et al.*, 2015).

Die Untersuchung der Signaltransduktion über die PAS_C-Domäne erfolgte bereits in vorherigen Untersuchungen mittels Interaktions- und Funktionsstudien verschiedener Punktmutanten in der PAS_C-Domäne von DcuS (Monzel *et al.*, 2013). Dabei wurden anhand von Homodimerisierungsstudien von PAS_C und Expressionsmessungen des Reportergens *dcuB* unterschiedliche Phänotypen festgestellt. Während einige Punktmutationen zu einem Verlust der Homodimerisierung führten, konnte in anderen Mutanten trotz der Verfügbarkeit eines Signals keine Signalweiterleitung festgestellt werden. Die unterschiedlichen Phänotypen wurden in vier verschiedene Klassen eingeteilt (Monzel *et al.*, 2013). Die OFF-Varianten waren nicht mehr in der Lage, trotz der Verfügbarkeit von C₄-DC, ein Signal weiterzuleiten und die Expression der Zielgene zu induzieren. Die ON-Varianten wurden in zwei Gruppen geteilt, wobei die zweite Gruppe in zwei Subgruppen untergliedert wurde. Die ON-Varianten vom Typ I zeigten effektorunabhängig, d.h. in An- und Abwesenheit von C₄-DC, Aktivität und führen zur Expression der Zielgene. Der Verlust einer Homodimerisierung des Sensors DcuS konnte mittels BACTH gezeigt werden. Eine Homodimerisierung in der PAS_C-Domäne ist essentiell für die Signaltransduktion. Es wurde postuliert, dass ON-Mutationen in PAS_C ihren

Aktivitätszustand über die Reduktion der Dimerstabilität ihren Aktivitätszustand an DcuS vermitteln (Etzkorn *et al.*, 2008). ON-Varianten vom Typ II sind in ihrer Homodimerisierung intakt. Untersuchungen mittels BACTH zeigen, dass die Interaktion zwischen dem Transporter DctA und DcuS essentiell ist und DcuS in einen responsiven Zustand bringt (Witan *et al.*, 2012). Während Typ IIa Varianten keine Interaktion mit DctA aufwiesen, wurden Varianten, die weiterhin mit DcuS direkt interagierten der Klasse IIb zugeordnet. Die verschiedenen Varianten sind im Strukturmodell von DcuS, basierend auf einem Homologiemodell von CitA_{Gt} von *Geobacillus thermodentrificans*, dargestellt (Abb. 10).

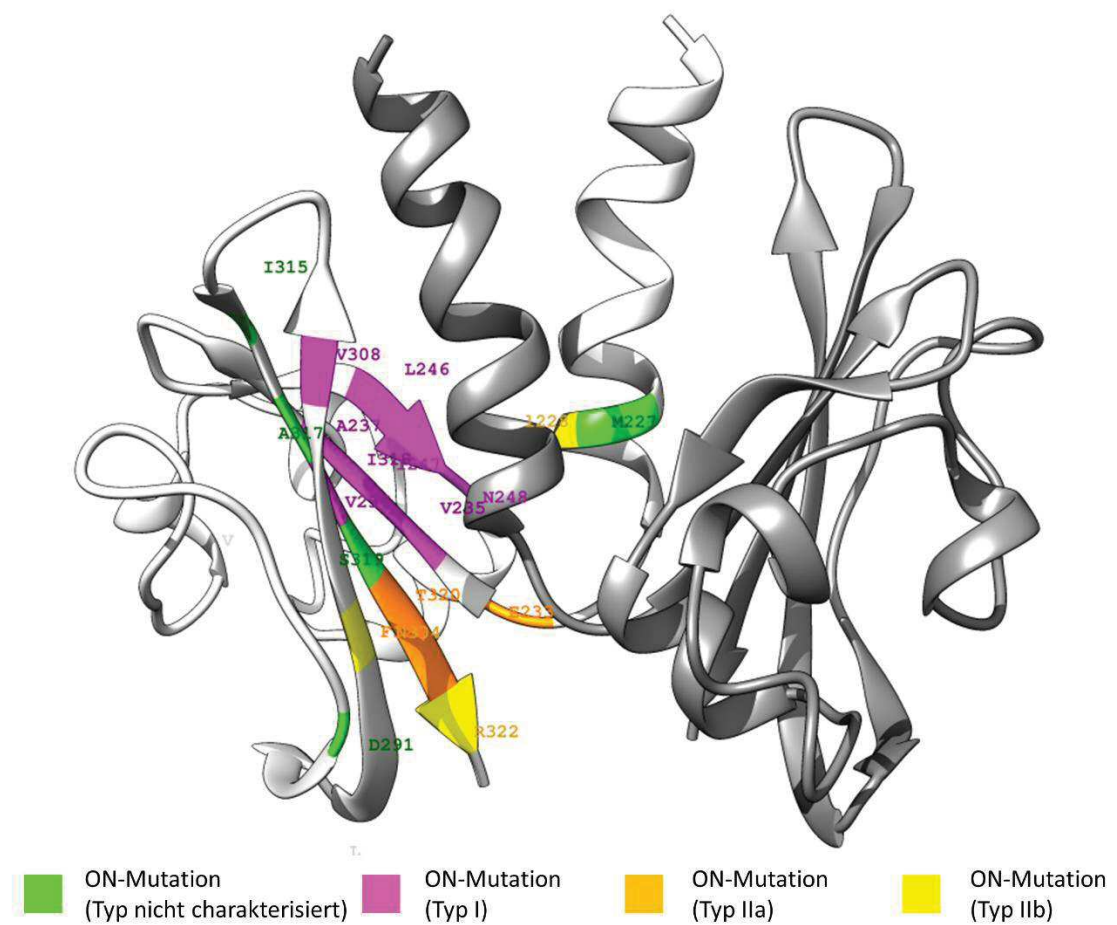


Abb. 10: Verschiedene ON-Varianten im Strukturmodell des PASc/PASc Dimers von DcuS. Das Modell basiert auf der Struktur von CitA_{Gt} und zeigt verschiedene ON-Varianten entsprechend ihrer Phänotypen. Die ON-Varianten weisen alle eine effektorunabhängige Expression der Zielgene auf und sind farblich entsprechend ihrer Charakteristika unterschiedlich markiert. Grün: nicht weiter charakterisiert; Magenta: Verlust der Homodimerisierung; orange: Homodimerisierung vorhanden, jedoch Verlust der Interaktion mit dem Transporter DctA; Gelb: Homodimerisierung und Interaktion mit DctA vorhanden. Die Zahl gibt den Aminosäurerest im Protein an.

Deutlich zu erkennen ist die abgegrenzte Fläche in PAS_C, in der sich der Hauptteil der Mutationen befindet. Diese Fläche beinhaltet die V-förmige Tasche eines PAS_C-Monomers zwischen N-terminaler Helix und den ersten β -Strängen sowie der Fläche zum C-Terminus der Domänen. Des Weiteren ist eine deutliche Trennung der Bereiche zu erkennen, in denen Typ I und Typ II ON-Varianten zu finden sind. Während ON-Varianten des Typ I sich in der V-förmigen Tasche anhäufen, sind die ON-Varianten vom Typ II nahe dem C-Terminus gruppiert. Der Rest N248D aus der ON-Variante Typ I sowie der Rest N304D aus der ON-Variante Typ II nehmen hierbei eine mögliche wichtige Rolle zur Signaltransduktion ein. Der Aminosäurerest N248 reagiert empfindlich auf Substitutionen bezüglich der Größe, Ladung und Polarität. Des Weiteren besitzt dieser Rest eine besondere Lage außerhalb der Dimerisierungsfläche, in einer Position zwischen der α - Helix und den ersten β -Strängen, in der eine Verknüpfung von Signaleingang und Ausgang durch vier Wasserstoffbrückenbindung mit den Aminosäuren L228, E233, V235 und A251 erfolgt. Aufgrund dieser Lage und der Konservierung der Aminosäure in homologen Proteinen, wird für diesen Rest eine wichtige Schanierfunktion für die Übersetzung des Signals vom Kolbenhub in eine horizontale Konformationsänderung postuliert. Diese Konformationsänderung führt vermutlich zur Schwächung der Dimerisierung und zur Signalweiterleitung zur Kinase-Domäne (Monzel *et al.*, 2013). Die Substitution des Rests N304 führt zu einem Typ IIb Phänotyp, welcher die Homodimerisierung des Sensors als auch die Interaktion zwischen DcuS und DctA unberührt lässt. Somit verhält sich dieser Phänotyp am Ähnlichsten zum Wildtyp. Dennoch kommt es zur effektorunabhängigen Expression der Zielgene. Daher könnte dieser Rest eine essentielle Rolle bei der Signalweiterleitung spielen und Hinweise auf die Signaltransduktion in DcuS liefern.

5.3.2. HDX-MS zur Untersuchung von Strukturveränderungen in PAS_C während der Signaltransduktion

Nach den bisherigen Studien von Etkorn *et al.* (2008) und Monzel *et al.* (2013) spielt die hohe Plastizität der N-terminalen α -Helix sowie die schanierförmige Bewegung in der V-förmigen Tasche von PAS_C eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion zur Kinase-Domäne. Um die Strukturveränderungen während eines Signaltransfers zu untersuchen, sollten die strukturellen Veränderungen von PAS_C im aktiven und nicht aktiven Zustand verglichen werden. Dazu wurden strukturelle Änderungen in einem PAS_C-

Kinase-Konstrukt (DcuS_{PK}) mit Hilfe der *hydrogen-deuterium-exchange* (HDX)-Massenspektrometrie analysiert. Das DcuS_{PK}-Konstrukt besteht aus der PAS_C- und der Kinase-Domäne. Es wird davon ausgegangen, dass die verschiedenen Phänotypen unterschiedliche Konformationen während der Signaltransduktion darstellen.

Bei der HDX-MS Methode wird der Austausch von Amidprotonen im Protein gegen Deuterium (D₂O) untersucht. Während der HDX-MS wird ein Protein für definierte Zeitspannen einem Überschuss an D₂O ausgesetzt. Dabei werden Protonen aus ungefalteten Regionen sehr schnell ausgetauscht, wohingegen Sekundärstrukturen oder abgeschirmte Regionen einen langsameren Austausch erlauben. Die vorwiegend Basenkatalysierte Reaktion wird durch die Absenkung des pH-Wertes auf 2,5 und dem Absenken der Temperatur auf 0 °C gestoppt. Anschließend werden die Proteine mit Pepsin verdaut. Nach dem proteolytischen Verdau werden die Peptide massenspektrometrisch analysiert und die Veränderung der Masse, die durch den Austausch von H gegen D verursacht wird, mit dem Programm DynamiX® ausgewertet. Nach einer manuellen Validierung können die Daten anschließend visualisiert werden. Somit lassen sich Unterschiede im Deuterium-Einbau zwischen zwei Varianten vergleichen und erlauben Rückschlüsse auf die strukturelle Veränderung, die jeweils einen Funktionszustand des Proteins repräsentiert.

2.3 Verkürzte DcuS ON-Varianten zeigen weitgehendst einen OFF-Phänotyp

Für die HDX-MS Untersuchungen wurde PAS_C-Kin von DcuS beginnend ab Aminosäure G211 in den IPTG induzierbaren Vektor pET28a kloniert (DcuS_{PK}). Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Punktmutationen L288A, E233G, L246R, N248D sowie N304D für die ON-Varianten eingeführt. Der Phänotyp der Punktmutanten wurde mittels *dcuB'* – *'lacZ* Reporterfusion überprüft. Dabei wurden die verschiedenen Konstrukte in einen *dcuS* negativen Stamm transformiert, anaerob gezüchtet und die β -Galactosidaseaktivität als Maß einer *dcuB* Expression gemessen (Abb. 11)

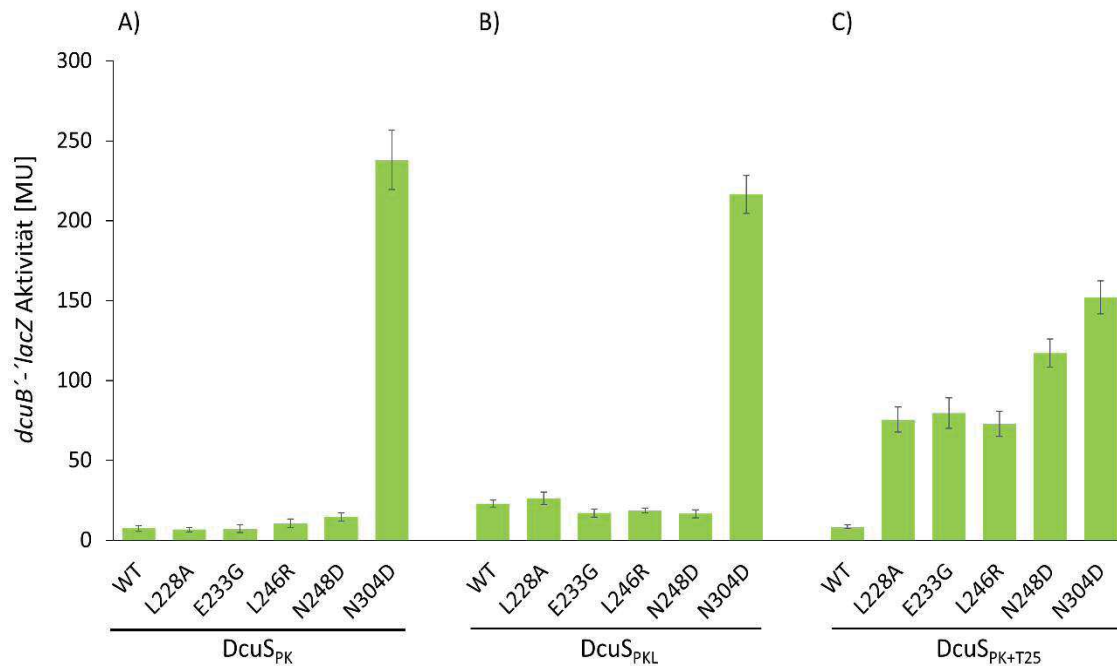


Abb. 11: Expression der Reporterfusion *dcuB'*-*lacZ* in verkürzten DcuS Konstrukten.

Die Expression der Reporterfusion wurde in dem *dcuS*-negativem Stamm IMW260 untersucht. Die β -Galactosidaseaktivität [MU] wurde für DcuS_{PK} (WT), DcuS_{PKL} (WT), DcuS_{PK+T25} (WT) sowie für die jeweiligen ON-Varianten (L228A, E233G, L246R, N248D, N304D) nach anaerober Zucht bei 37 °C bestimmt.

Das Konstrukt DcuS_{PK} weist im Wildtyp-Zustand im Expressionstest nur eine geringe Aktivität auf. Ähnliche Werte zeigen die Varianten L228A, E233G, L246R und N248D. Lediglich das Konstrukt mit der Punktmutation N304D erreicht eine hohe Aktivität von 200 MU. Die Varianten L228A, E233G, L246R und N248D unterscheiden sich damit von entsprechenden Varianten der Vollängenkonstrukte von DcuS, sowie den DcuS_{PK+T25} Konstrukten mit einem C-terminalen T25-Fragment. Diese Varianten besitzen eine Aktivität von mindestens 100 MU (Monzel *et al.*, 2013) und wurden als ON-Varianten eingestuft.

5.3.3. T25-Fragmente der Adenylatzyklase erzeugen einen künstlichen ON-Phänotypen.

Zur Klärung der Diskrepanz der Aktivitäten der L228A, E233G, L246R und N248D Varianten, die in DcuS_{PK+T25} von Monzel *et al.* (2013) Aktivität zeigten, aber in DcuS_{PK} (Abb. 11A) inaktiv waren, wurden verschiedene Konstrukte hergestellt und verglichen.

Zum einen wurden die Varianten in dem Konstrukt von Monzel *et al.* (2013) erneut vermessen ($\text{DcuS}_{\text{PK}+\text{T25}}$) und zusätzlich mit einem Konstrukt (DcuS_{PKL}) verglichen. Letzteres unterschied sich von DcuS_{PK} durch den Linker V202 bis F210, der unmittelbar vor PAS_{C} liegt und PAS_{C} mit TM2 verbindet. Untersuchungen aus Arbeiten von M. Stopp (unveröffentlicht) weisen auf eine wichtige Funktion des Linkers für die Signalweiterleitung hin. Diese Konstrukte wurden wie in den vorhergehenden Untersuchungen getestet (Abb. 11B, C).

Das Konstrukt DcuS_{PKL} weist für den WT und die Varianten nur eine geringe Aktivität auf (Abb. 11B). Die Variante N304D zeigt wieder eine hohe Aktivität (200 MU) auf. In dem Konstrukt $\text{DcuS}_{\text{PK}+\text{T25}}$ nimmt die Aktivität in allen Varianten gegenüber dem WT deutlich zu (ON-Varianten), insbesondere in der N248D und der N304D Variante. Diese Daten bestätigen die Messungen von Monzel *et al.* (2013).

Der Vergleich der verschiedenen DcuS Konstrukte zeigt, dass nur die Variante N304D eine echte ON-Variante darstellt. Die Aktivierung der Varianten L228, E233, L246 und N248 scheint in unbekannter Weise durch den T25-Tag verursacht zu sein. Sie stellen aber keine PAS_{C} -typischen ON-Varianten dar.

5.3.4. Strukturelle Veränderung in der N-terminalen Helix und den β -Faltblättern

In den HDX-MS-Untersuchungen wurde DcuS_{PK} als Wildtyp mit DcuS_{PK} (N304D) als ON-Variante verglichen. Die Proteine wurden in *E. coli* BL21DE3 überproduziert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Reinheit der Proteine wurde im SDS-Gel kontrolliert (Abb. 12). Die Kontrolle der Reinheit der Variante DcuS_{PK} (N304D) mittels SDS-Page ist im Anhang zu finden.

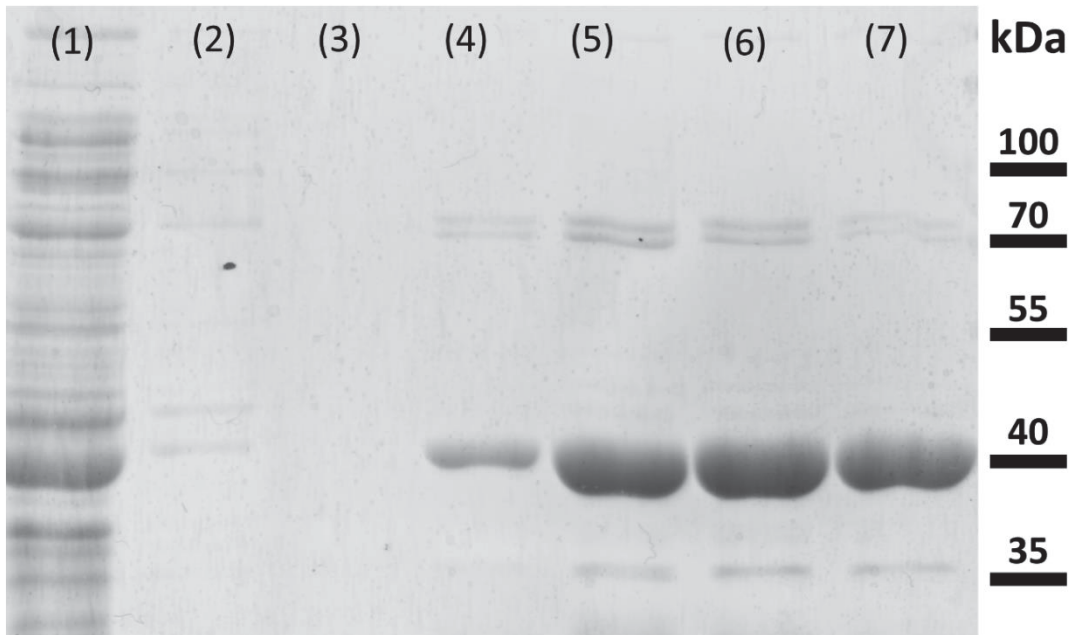


Abb. 12: Auftrennung der Proteine des DcuSPK-Konstrukts im SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Das DcuSPK-Konstrukt wurde in den Überproduktionsstamm BL21DE3 transformiert und überexprimiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte aerob für 5 h bei 20 °C nach Erreichen der exponentiellen Phase nach aerober Zucht bei 30 °C. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Proteine über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt und die Reinheit einer Fraktion mittels der SDS-Page durch ein 10% SDS-Gel überprüft. Aufgetragen sind 1): Durchfluss nach der Säulenbindung 2): Durchfluss nach fünf Waschstritten (Waschfraktion) 3-7): Elutionsfraktionen mit erhöhtem Imidazol (500 mM) zur Ablösung der gebundenen Proteine.

Neben der Hauptbande von ca. 41 kDa des DcuSPK-Konstrukts, ist eine Bande von 70 kDa zu erkennen.

Das Protein wurde durch Verdünnen mit Elutionspuffer auf eine Konzentration von 50 μ M eingestellt und in Aliquots à 250 μ l für die HDX-MS Messungen eingesetzt. Die Proben wurden bei 25 °C in zehnfachem Überschuss an Deuterium für 10, 30, 100, 1000 und 10000 Sekunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Quencherpuffer auf pH 2,5 eingestellt sowie rapider Absenkung der Temperatur auf 0 °C gestoppt. Anschließend wurden die Proteine mit Pepsin proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch bei 0,5 °C analysiert. Dabei wurden 111 Peptide bei einer Abdeckung von 94 % sowie einer Wiederholungsrate von 3,26 für jedes Peptid gemessen. Eine *Peptide Coverage Map* ist im Anhang dargestellt (Anhang 10.2.1, Abb. 37). Die genaue Analyse der Masse der Peptide und die Zunahme der Masse einzelner Peptide nach D₂O Inkubation erlaubt eine Aussage über das Ausmaß und die Kinetik der Deuterierung der einzelnen Peptide. Die relative Deuterium-Aufnahme wird durch Regenbogenfarben

verdeutlicht (Abb. 13, 14). Blau deutet auf eine niedrige, Rot auf eine starke Deuterium-Aufnahme hin. Der Farbcode wird in unterschiedlichen Zeilen, entsprechend der Dauer des Aussetzens der Deuterium-Exposition, Fragmentweise anhand überlappender Peptide angeben.

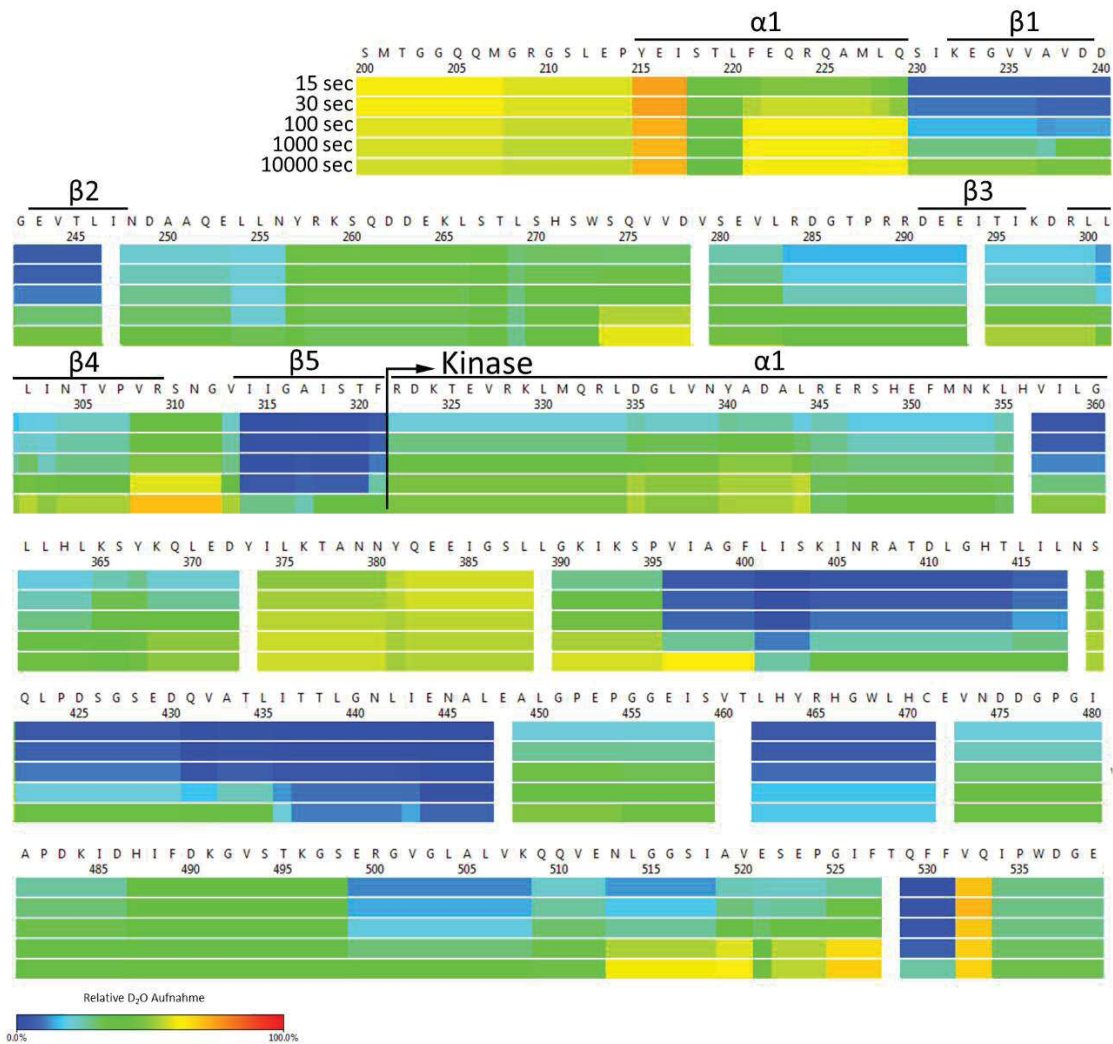


Abb. 13: Relative Deuterium-Aufnahme von DcuSPK (WT). Die Proteine wurden für die Messungen bei 25 °C einem zehnfachen Überschuss an Deuterium für 10, 30, 100, 1000 und 10000 Sekunden ausgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Quenching Puffer (pH 2,2) bei 0 °C gestoppt. Die Proteine wurden mit Pepsin proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch bei 0,5 °C analysiert. Nach der Auswertung der Aufnahme von Deuterium wird die relative Deuterium-Aufnahme durch die Regenbogenfarben verdeutlicht. Der Farbcode wird in unterschiedlichen Zeilen, entsprechend der Dauer des Aussetzens mit Deuterium, für jeden Aminosäurerest angeben. Blau: niedrige Deuterium-Aufnahme, Rot: starke Deuterium-Aufnahme.

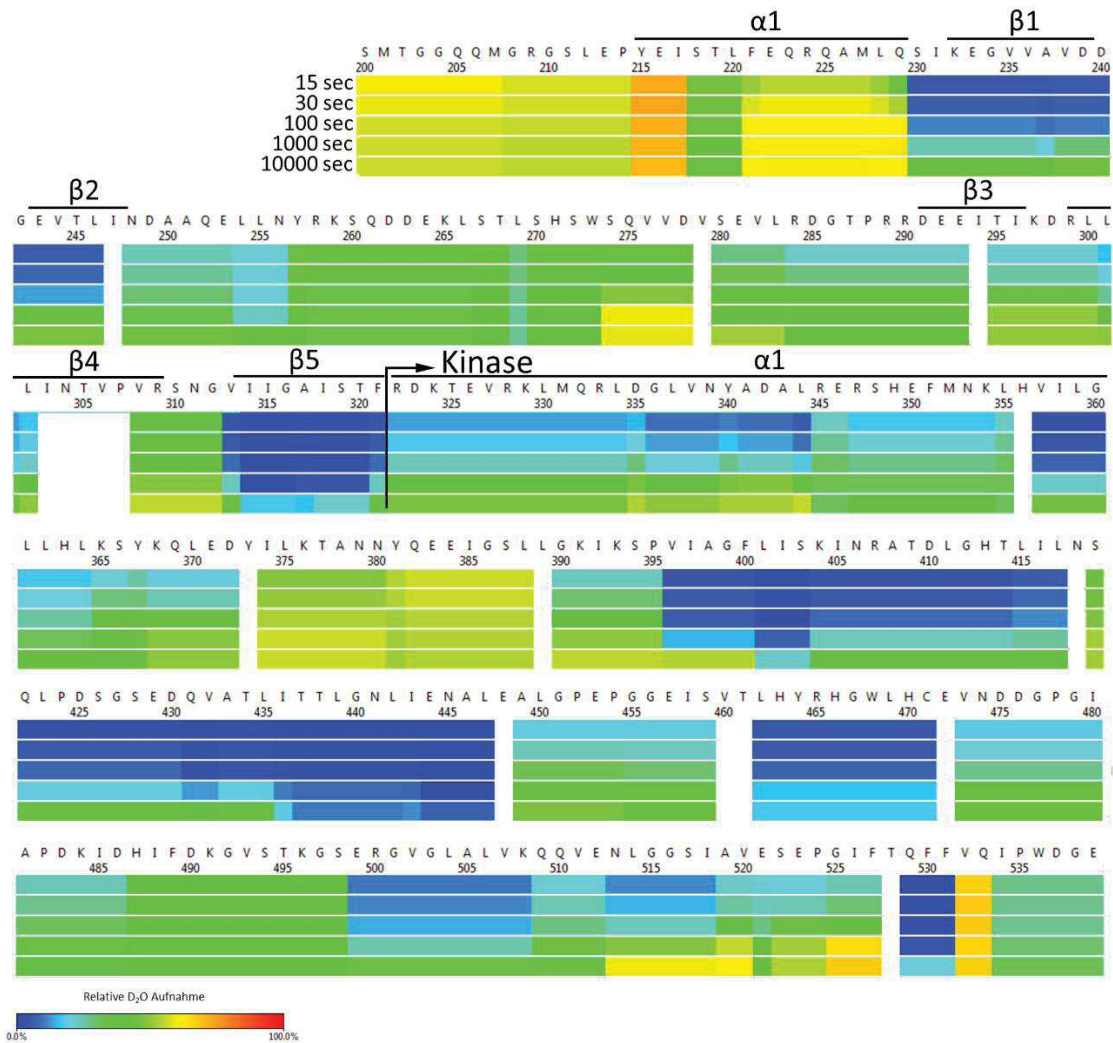


Abb. 14: Relative Deuterium-Aufnahme von DcuSPK (N304D). Die Proteine wurden für die Messungen bei 25 °C einem zehnfachen Überschuss an Deuterium für 10, 30, 100, 1000 und 10000 Sekunden ausgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Quenching Puffer (pH 2,2) bei 0 °C gestoppt. Die Proteine wurden mit Pepsin proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch bei 0,5 °C analysiert. Nach der Auswertung der Aufnahme von Deuterium wird die relative Deuterium-Aufnahme durch die Regenbogenfarben verdeutlicht. Der Farbcode wird in unterschiedlichen Zeilen, entsprechend der Dauer des Aussetzens mit Deuterium, für jeden Aminosäurerest angegeben. Blau: niedrige Deuterium-Aufnahme, Rot: starke Deuterium-Aufnahme.

Im Aminosäure-Bereich 215 bis 229, der der N-terminalen Helix von PAS_C entspricht, ist eine Deuterium-Aufnahme (gelb-orange) zu sehen (Abb. 13, 14), während in den β -Faltblättern (AS 230 - 247) die Aufnahme von D₂O vermindert ist (blau). Das C-terminale Ende der PAS_C-Domäne (AS 313 - 321) sowie α Helix 1 der Kinase-Domäne (AS 322 - 344) lassen kaum einen Deuterium-Austausch zu. Die Unterschiede zwischen dem WT und der ON Variante N304D werden erst richtig deutlich, wenn die Zugänglichkeiten miteinander verglichen werden (Abb. 15). Der Unterschied in der

Aufnahme zwischen den Varianten wird in den Farben des Regenbogens dargestellt. Eine geringere Aufnahme der ON-Variante gegenüber dem Wildtyp wird in blau dargestellt, wohingegen Rot eine Zunahme der gemessenen Deuterium-Menge der ON-Variante gegenüber dem WT veranschaulicht.

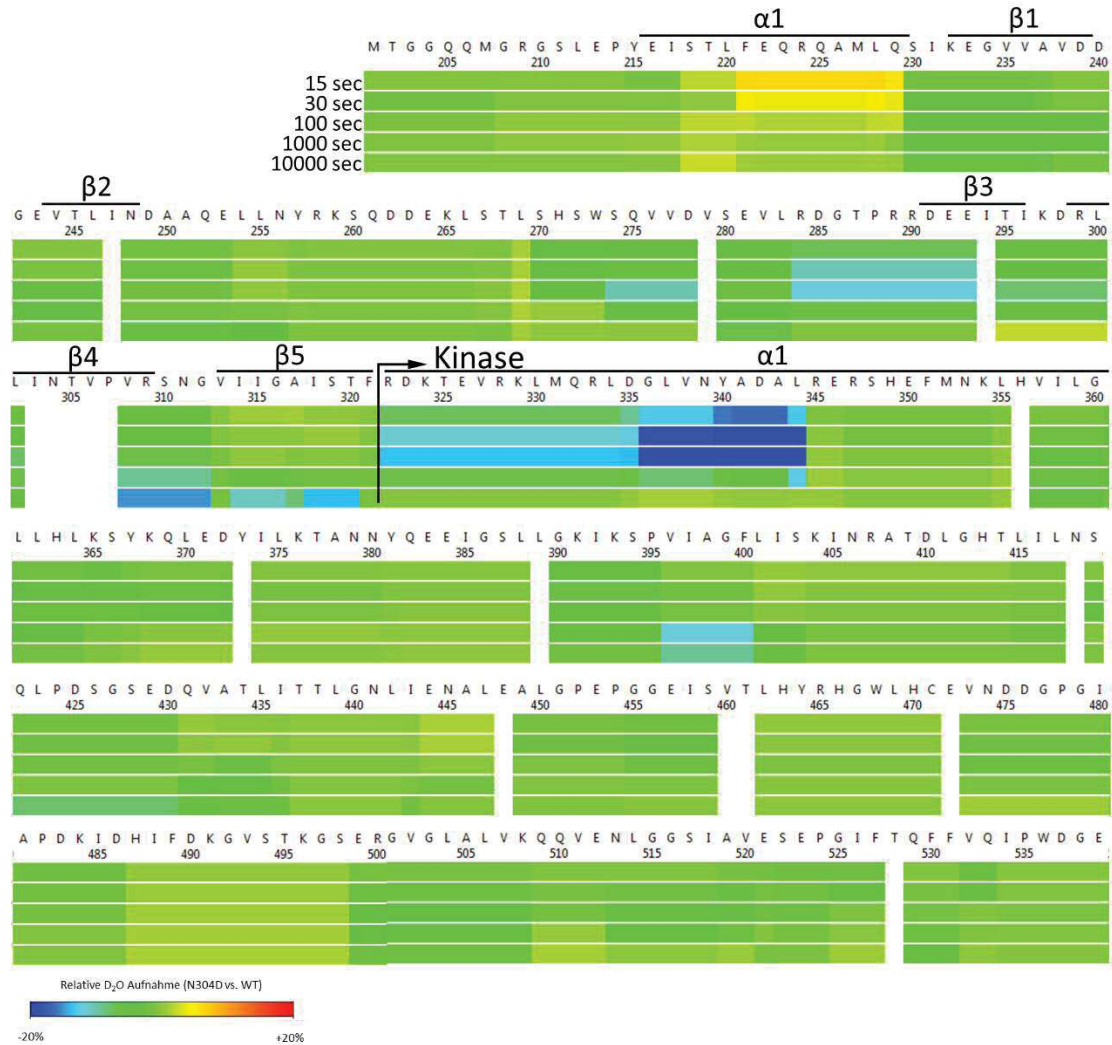


Abb. 15: Vergleich der relativen Deuterium-Aufnahme von DcuSPK (WT) gegenüber DcuSPK (N304D). Die Proteine wurden für die Messungen bei 25 °C einem zehnfachen Überschuss an Deuterium für 10, 30, 100, 1000 und 10000 Sekunden ausgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Quenching Puffer (pH 2,2) bei 0 °C gestoppt. Die Proteine wurden mit Pepsin proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch bei 0,5 °C analysiert. Die Aufnahme von Deuterium wurden von DcuSPK (WT) mit der ON-Variante (N304D) verglichen und der Unterschied der relativen Deuterium-Aufnahme durch die Regenbogenfarben verdeutlicht. Der Farbcode wird in unterschiedlichen Zeilen, entsprechend der Dauer des Aussetzens mit Deuterium, für jeden Aminosäurerest angegeben. Blau: niedriger Unterschied in der Deuterium-Aufnahme (-20%), Rot: starker Unterschied in der Deuterium-Aufnahme (+20%).

In der ON-Variante N304D ist gegenüber dem WT in der N-terminalen α -Helix 1 von PASc eine Steigerung von 10-15 % zu sehen. Die Faltblätter β 3-5 weisen im Vergleich

eine 5-10 % niedrigere D₂O-Aufnahme der ON-Variante gegenüber dem WT auf. Eine verstärkte Verminderung um 15-20 % ist ebenfalls in der N-terminalen α -Helix 1 der Kinase-Domäne zu erkennen.

5.3.5. Vergleichende HDX-MS Messungen der DcuS_{PK+T25}-Konstrukte

Die Expressionsmessungen aus Monzel *et al.* (2013) mit DcuS_{PK+T25} wiesen eine Diskrepanz in der Aktivität gegenüber DcuS_{PK} auf. Die Deuterium-Zugänglichkeiten konnten bisher nur zwischen DcuS_{PK} (WT) und DcuS_{PK} (N304D) verglichen werden. Um weitere ON-Varianten in die Analyse zu integrieren, sollte die Veränderung in der Deuterium-Zugänglichkeit zwischen DcuS_{PK+T25} mit den bisherigen Messungen an DcuS_{PK} verglichen werden. Die Proteinexpression und die Kontrolle der Reinigung erfolgte analog zu den vorherigen Konstrukten (Abb. 16). Die Kontrolle der Reinheit der Variante DcuS_{PK+T25} (N304D) mittels SDS-Page ist im Anhang zu finden.

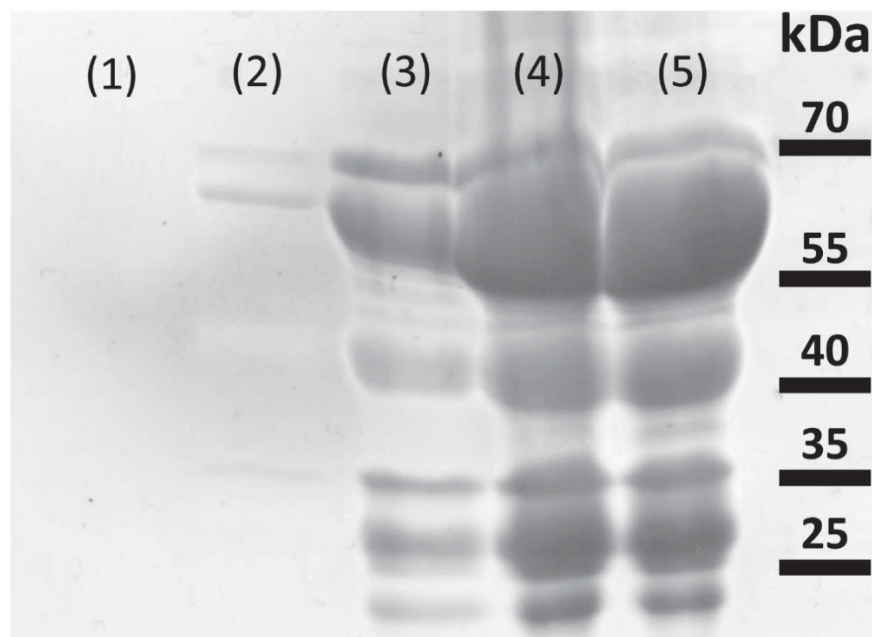


Abb. 16: Auftrennung der Proteine von DcuS_{PK+T25} in einem SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. DcuS_{PK+T25} wurde in den Überproduktionsstamm BL21DE3 transformiert und überexprimiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte aerob für 5 h bei 20 °C nach Erreichen der exponentiellen Phase nach aerober Zucht bei 30 °C. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Proteine über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt und die Reinheit einer Fraktion mittels der SDS-Page durch ein 10 % SDS-Gel überprüft. Aufgetragen sind 1-5): Elutionsfraktionen mit erhöhtem Imidazol (500 mM) zur Ablösung der gebundenen Proteine.

Neben einer Hauptbande von 65 kDa, des DcuS_{PK+T25} Konstrukts, sind weitere Banden auf der Höhe von 25 kDa und 40 kDa zu erkennen, welche auf Fragmente des Konstrukts hindeuten. Das Abspalten des T25-Fragmentes bei später Wachstumsphase sowie hoher Proteinexpression wurde in vorherigen Arbeiten bereits gezeigt (Klein, 2018; Barth, 2018).

Die Proben wurden anschließend analog zu den vorherigen Experimenten mit der HDX-MS analysiert und die Unterschiede in der Deuterium-Aufnahme zwischen DcuS_{PK+T25} (WT) und der Variante N304D dargestellt (Abb. 17).

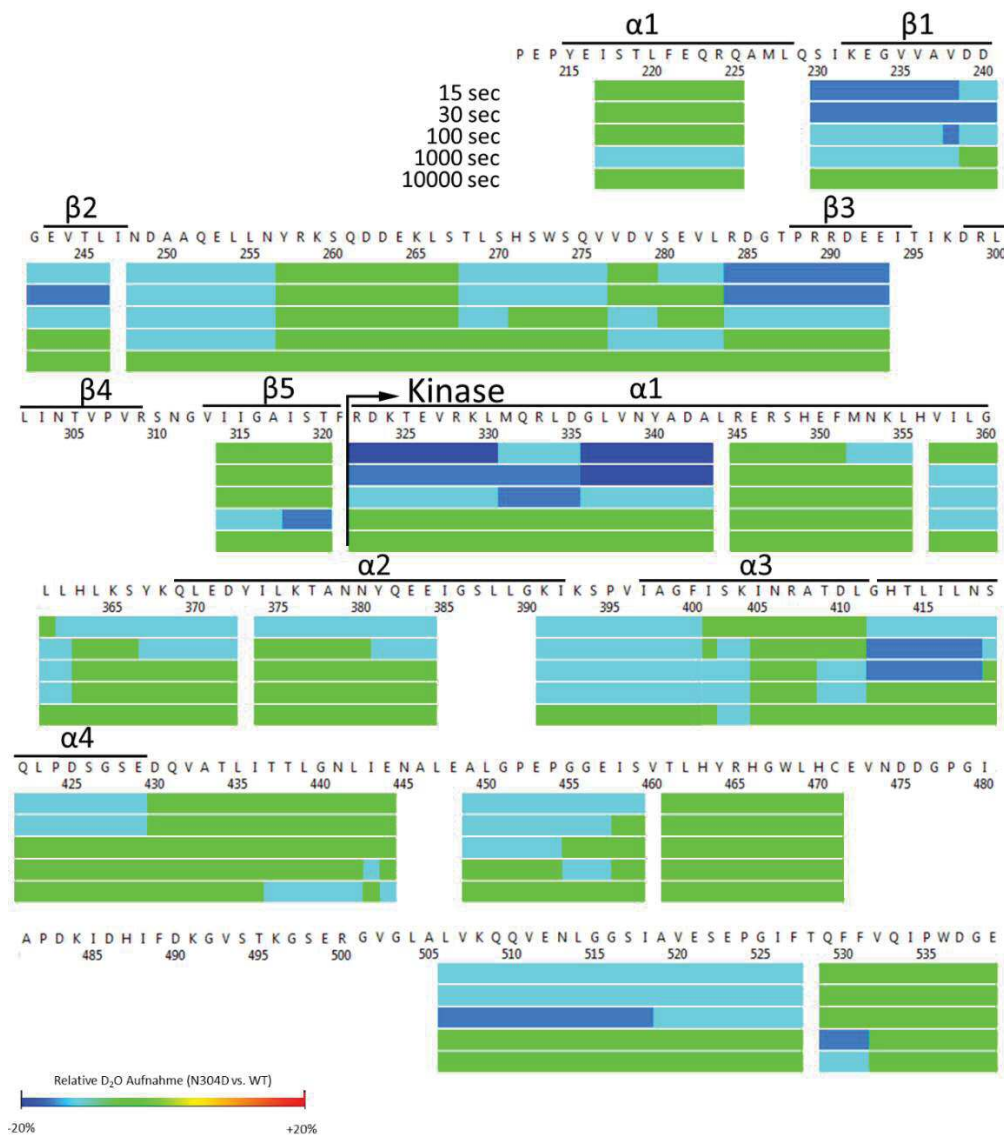


Abb. 17: Vergleich der relativen Deuterium-Aufnahme von DcuS_{PK+T25}(WT) gegenüber DcuS_{PK+T25} (N304D). Die HDX-MS Durchführung erfolgte analog zum vorherigen Experiment. Die Aufnahme von Deuterium wurde von DcuS_{PK+T25} (WT) mit der ON-Variante (N304D) verglichen und der Unterschied der relativen Deuterium-Aufnahme durch die Regenbogenfarben verdeutlicht. Der Farbcode ist analog zu Abb. 15.

In den β -Faltblättern 1-3 von PAS_C sowie in der Region zwischen den Faltblättern (AS 248 – 283) und in der α -Helix 1 der Kinase-Domäne konnte in der ON-Variante gegenüber dem WT 10-20% weniger Deuterium aufgenommen werden. Die Bereiche einer geringeren Deuterium-Aufnahme treten zusätzlich in den α -Helices 2-4 in der Kinase-Domäne vermehrt auf.

5.3.6. Fusionen mit T25 Fragment verhalten sich verschieden gegenüber verkürzten DcuS Konstrukten

Werden die bisherigen Ergebnisse der HDX-MS Messungen gegenübergestellt und auf das Strukturmodell von DcuS, basierend auf der CitA_{Gt} Struktur von *Geobacillus thermodenitrificans*, übertragen, sind die Unterschiede in der Deuterium-Aufnahme deutlich zu erkennen (Abb. 18).

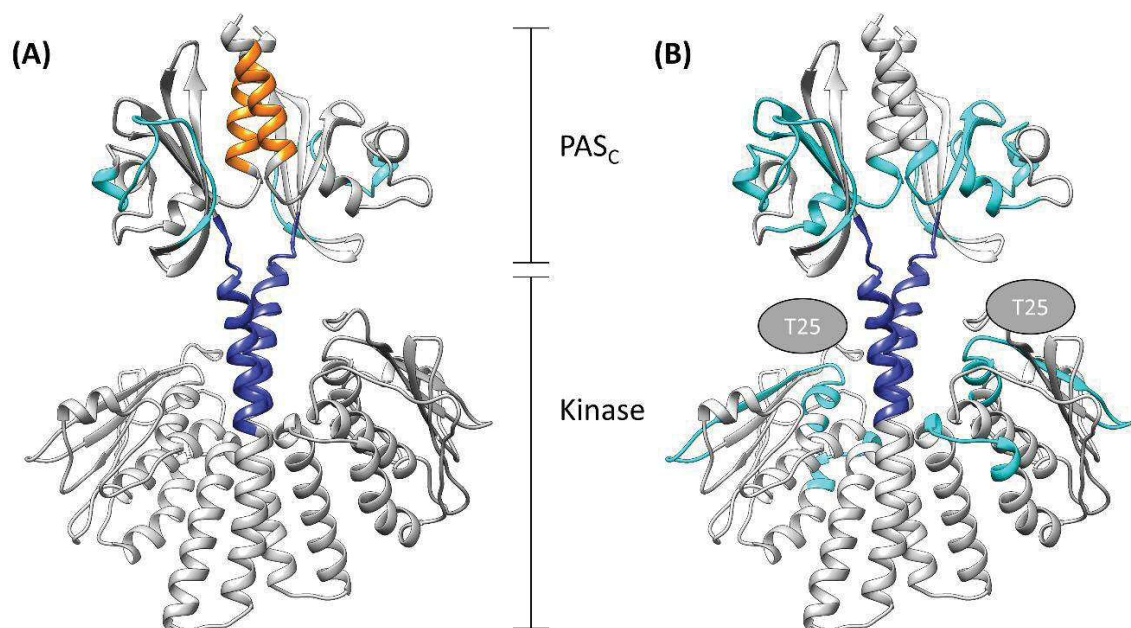


Abb. 18: Vergleich der relativen Deuterium-Aufnahme der ON-Variante (N304D) und des (WT) von DcuSPK (A) und DcuSPK+T25 (B) am Strukturmodell von DcuS. Das Modell basiert auf einer Fusion der Struktur von CitA_{Gt} und einer I-Tasser Strukturvorhersage und zeigt die Änderungen der Deuterium-Aufnahme zwischen Wildtyp und der ON-Variante im DcuS Dimer. Die Farben entsprechen den vorherigen Darstellungen. Hellblau: 10-15% niedrigere Deuterium-Aufnahme; Blau: 20% niedrigere Deuterium-Aufnahme; orange: 10-15% stärkere Deuterium-Aufnahme.

Anhand Abb. 18 werden einerseits die Unterschiede in der Deuterium-Aufnahme zwischen den Funktionszuständen (ON und WT) ersichtlich, andererseits visualisiert die

Darstellung am Strukturmodell deutlich die Unterschiede zwischen den Konstrukten Dcu_{SPK} und Dcu_{SPK+T25}. Die gesteigerte Zugänglichkeit von Deuterium am N-terminalen Ende ist nur ohne T25 Fragment zu detektieren (A). Des Weiteren weist das Konstrukt keine verringerte Deuterium-Zugänglichkeit in der Kinase-Domäne auf, welche im Konstrukt mit Fragment (B) stellenweise immer wieder vorhanden sind. Trotz des unterschiedlichen Aufbaus der Konstrukte, weisen beide Konstrukte jedoch auch Gemeinsamkeiten auf. In (A) und (B) sind die Verringerungen der Deuterium-Aufnahme in den β -Faltblättern der PAS_C-Domäne zu erkennen sowie die starke Reduktion der Deuterium-Aufnahme in der α -Helix 1 der Kinase Domäne.

5.4. Das Dcu-Interaktom von *Escherichia coli*

5.4.1. Complexome Profiling zur Identifizierung von Proteinuntereinheiten und Interaktionspartnern

Proteine können aus vielen Untereinheiten (UE) bestehen oder mit anderen Proteinen einen Komplex eingehen. Durch die Methode des „Complexome Profiling“ können potenzielle UE oder Interaktionspartner identifiziert werden. Die Methode beruht auf der Annahme, dass Proteine, die gemeinsam in einem Komplex durch ein nicht-denaturierendes Gradientengel gewandert sind, ähnliche Migrationsmuster (Migrationsprofile) aufweisen. Dabei ist von einem möglichen Komplex die Rede, falls in den Migrationsprofilen der Proteine ein gemeinsames Maximum (Peak) zu ermitteln ist, die eine Zusammenlagerung von zwei UE oder Monomeren repräsentieren und außerdem einen ähnlichen Verlauf innerhalb des hochmolekularen Bereichs aufweisen, welcher für die Gruppierung mit weiteren Untereinheiten oder Proteinen steht (Heide *et al.*, 2012). Mit Hilfe der Auswertungssoftware NOVA®, die im Prozess der Etablierung dieser Methode entwickelt wurde, ist es möglich diese Migrationsmuster zu Gruppen (Clustern) zusammenzufassen und somit große Daten in kleine übersichtliche Cluster einzelner Proteine zu generieren, um diese sowohl besser als auch schneller zu analysieren. Die Software NOVA® ermöglicht dem Nutzer mit unterschiedlichen Algorithmen aus der Bioinformatik die Migrationsprofile zu clustern. Die Auswertung der Profile erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der agglomerativen Clusteranalyse. Dabei werden ähnliche Elemente identifiziert und schrittweise in Gruppen mit anwachsender Größe zusammenge-

fasst. Dieses Verfahren ist an die molekularen Vorgänge angelehnt, bei der die Proteine Aggregate bilden und gemeinsam als Komplex oder funktionelle Einheit fungieren.

5.4.2. Anwendung des Complexome Profilings für prokaryotische Membranproteine

Zur Validierung der Methode wurden bereits bekannte und verifizierte Komplexe aus der aeroben und anaeroben Atmungskette des Prokaryoten *E. coli* untersucht. Dafür wurden die Membranproteine aus Membranen von fünf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen von *E. coli* isoliert und analysiert. Dies erfolgte anhand einer Auflösung der Membran mit dem Detergenz Digitonin, sowie einer anschließenden Auftrennung mittels nativer Gradienten-Gelelektrophorese (Wittig *et al.*, 2006). In den darauffolgenden Schritten wurden das Gel von der Lauffront bis zur Auftragsstelle in 60 Fragmente geschnitten, extrahiert, tryptisch verdaut und die Peptide durch Massenspektrometrie (nano-LC-MS/MS) analysiert. Mit Hilfe des etablierten Suchalgorithmus Mascot® wurden die Proteine über die Massen der Peptide sowie proteinspezifische *Unique Peptides* identifiziert. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte im nativen Gel anhand von Eichproteinen des mitochondrialen Komplexes I-V aus Rinderherz Mitochondrien.

Bei der Validierung der Methode konnten viele UE von Enzymkomplexen aus der Atmungskette identifiziert und analysiert werden. Einige UE eines Komplexes konnten jedoch in allen fünf Datensätzen (unter verschiedenen Wachstumsbedingungen) nicht identifiziert werden. So besteht das Enzym NADH-Chinon-Oxidoreduktase (NuoA-N) aus 14 UE, von dem nur 12 identifiziert werden konnten. Des Weiteren konnten von der Chinoloxidase bo_3 CyoABCD lediglich zwei von vier UE (CyoAB), sowie bei der Nitratreduktase NarZYV nur zwei von drei UE (NarZY) identifiziert werden. Ein weiteres Phänomen zeigte sich bei der Gruppierung der UE nach der Analyse mit dem Programm NOVA®. Die identifizierten, geclusterten Untereinheiten der NADH-Chinon-Oxidoreduktase wurden nicht einer Gruppe zugeordnet, sondern aufgrund des nicht einheitlichen Laufverhaltens in verschiedene Subkomplexe eingeteilt. Offensichtlich bilden NuoAHKLN, NuoBCDI sowie NuoEFG kleinere Subkomplexe aus. In Abb. 19 ist exemplarisch die Gruppierung der UE NuoAHKLN der NADH-Chinon-Oxidoreduktase dargestellt. Die Gruppierung weiterer UE des Enzyms sowie Gruppierungen weiterer Enzyme aus der Atmungskette sind im Anhang zu finden (Anhang 10.2.3, Abb. 39).

Eine tabellarische Auflistung aller identifizierten Komplexe aus der Atmungskette unter verschiedenen Wachstumsparametern ist im Anhang hinterlegt (Anhang 10.2.3, Tab. 11).

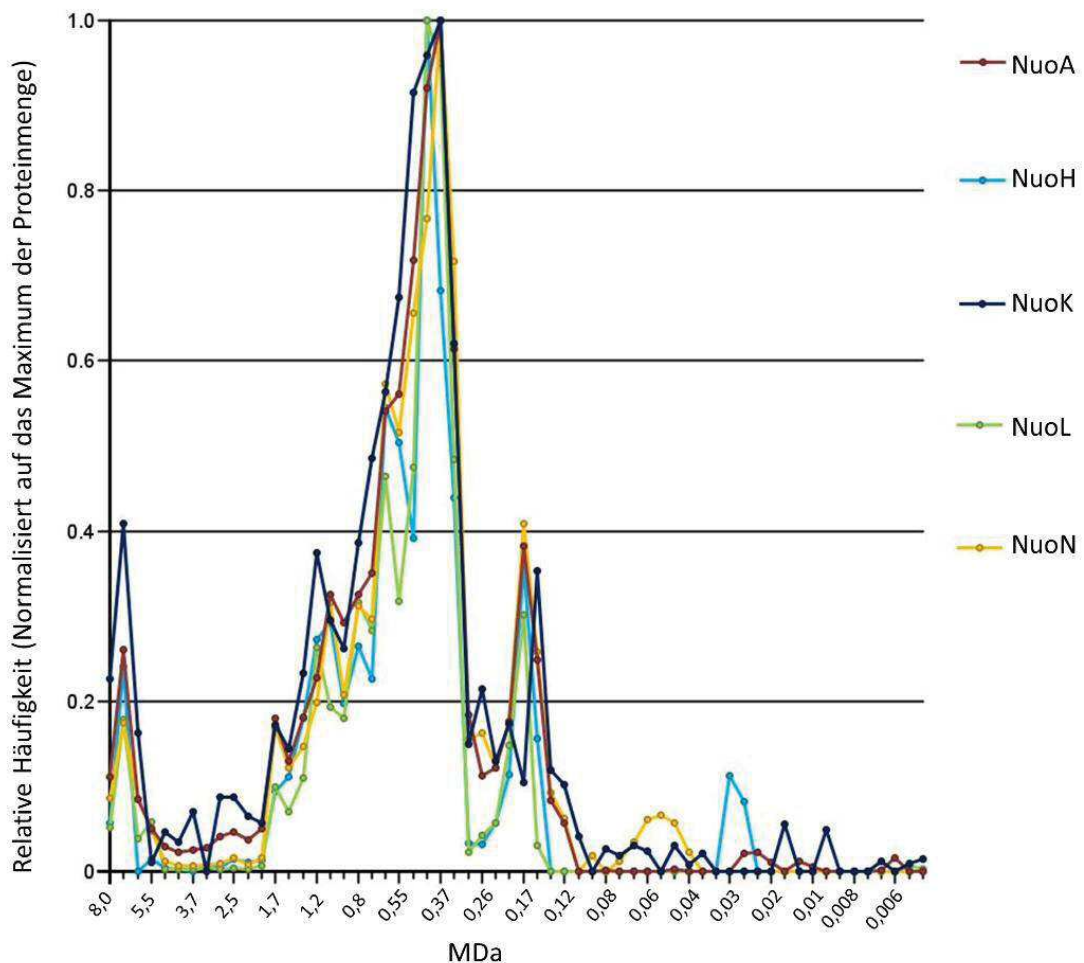


Abb. 19: Migrationsprofile der UE A, H, K, L, N der NADH-Chinon-Oxidoreduktase NuoA-N. Die Isolierung der Membranproteine erfolgte nach einer aeroben Zucht in eM9-Medium mit 10 mM Glycerin bei 37 °C. Nach der Solubilisierung mit Digitonin und der Auftrennung der Proteine in einem Gradientengel (3 - 18 %) wurden die Proteine in einem Gelfragment mittels Massenspektrometrie analysiert und zugeordnet. Die Migrationsprofile wurden in einem 2-D Schaubild via NOVA® visualisiert. Die Zuordnung der Massen erfolgte mit Proteinen der mitochondrialen Komplexe I–V.

Die Migrationsprofile der UE A, H, K, L, N der NADH-Chinon-Oxidoreduktase NuoA-N besitzen einen Peak im Bereich von 535 kDa, der der gesamten Masse des NuoA-N Komplexes entspricht (Friedrich *et al.*, 1995; Yagi *et al.*, 1998; Friedrich & Scheide, 2000). Die relative Häufigkeit der Untereinheiten ist im Gesamtkomplex bei 535 kDa am stärksten vertreten. Die Profile besitzen neben dem gemeinsamen maximalen Peak einen kleinen Peak bei 180 kDa. Dieser passt zu der berechneten molekularen Masse der Untereinheiten NuoA, H, K, L, N, welcher sich als kleiner Subkomplex ab-

gelöst hat und durch seine Größe als kleiner Gipfel vor dem Gesamtkomplex im Profil erscheint.

5.4.3. Validierung von Komplexen innerhalb des C₄-DC-Metabolismus mittels Complexome Profiling

Neben der Identifizierung von UE innerhalb eines Enzymkomplexes, kann die Methode des Complexome Profilings ebenso dazu dienen, auf Protein-Protein-Interaktion oder eine Komplexbildung hinzuweisen (Heide *et al.*, 2012).

Die Interaktionspartner, welche am C₄-DC-Metabolismus beteiligt sind, wurden bisher in mehreren Arbeiten untersucht (Witan *et al.*, 2012; Karinou *et al.*, 2013; Wörner *et al.*, 2016) und bieten daher eine gute Grundlage für die Analyse der Interaktion von Membranproteinen mit Hilfe des Complexome Profilings. Der Sensor DcuS des ZKS DcuS-DcuR benötigt zur optimalen Antwort auf vorhandene C₄-DC den aeroben Transporter DctA, bzw. unter anaeroben Bedingungen den Antiporter DcuB. Erst eine direkte Interaktion von DctA bzw. DcuB mit dem Sensor DcuS versetzt DcuS in einen responsiven Zustand und bewirkt eine korrekte Signalantwort auf die Anwesenheit von C₄-DC (Wörner *et al.*, 2016). Diese Interaktionen wurden in vorherigen Arbeiten durch BACTH-Experimente sowie durch mSPINE, FRET und Fluoreszenzmikroskopie gezeigt (Witan *et al.*, 2012; Scheu *et al.*, 2014; Wörner *et al.*, 2016). Die Analyse der Migrationsprofile im Complexome Profiling ergab unter fünf verschiedenen Wachstumsbedingungen keine Gruppierung bereits identifizierter Protein-Interaktionen aus dem C₄-DC-Metabolismus. Die Profile von DctA, DcuB sowie DcuS waren für eine Gruppierung mittels agglomerativer Clusteranalyse zu unterschiedlich, sodass eine positive Interaktion mit dieser Methode nicht verifiziert werden konnte. Weiterhin konnte eine Gruppierung der Sensorkinase DcuS mit dem Antwort-Regulator DcuR in keiner der fünf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen festgestellt werden. Andererseits konnte eine Interaktion zwischen den aeroben Transportern DctA und DauA verifiziert werden (Karinou *et al.*, 2017). Eine Deletion von DauA führt außerdem zu einer Reduktion der Expression von DctA. Somit besitzt DauA offensichtlich eine regulatorische Funktion auf DctA, die sich auf die Funktion von DcuS-DcuR auswirkt (Karinou *et al.*, 2017). In Abb. 20 sind die Migrationsprofile der aeroben C₄-DC-Transporter DctA und DauA dargestellt.

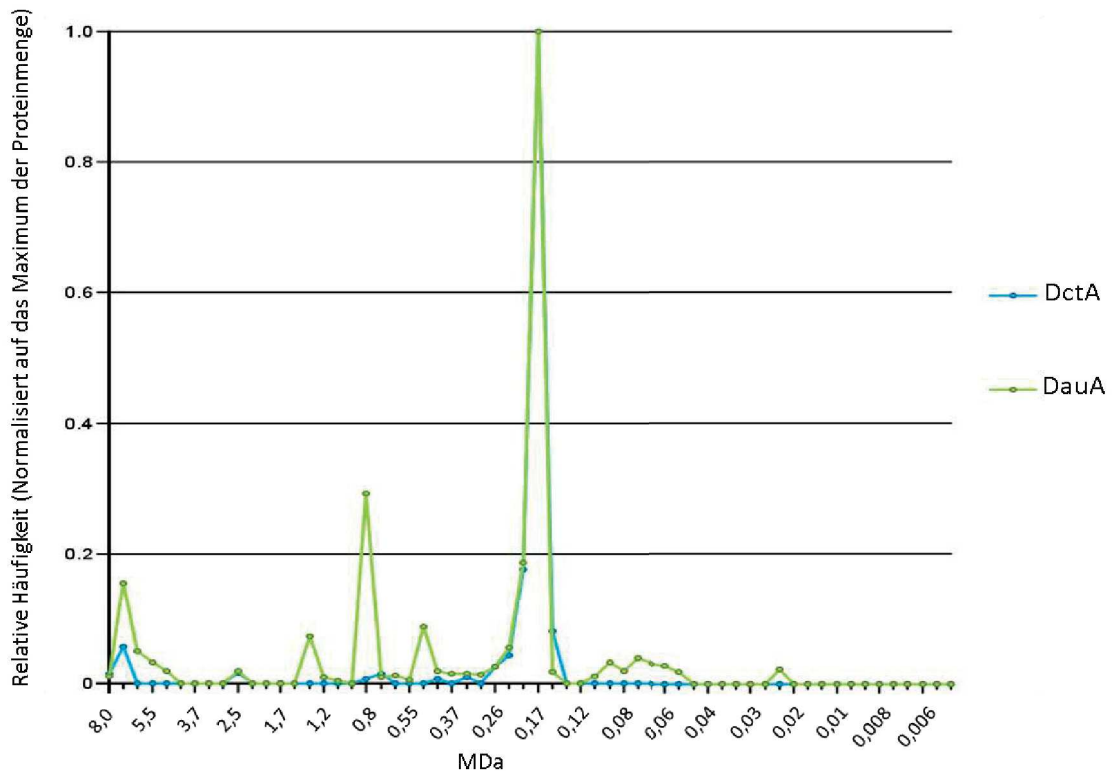


Abb. 20: Migrationsprofile der aeroben C₄-DC-Transporter DctA und DauA. Die Isolierung der Membranproteine erfolgte nach einer aeroben Zucht in eM9-Medium mit 10 mM Glycerin bei 37 °C. Nach der Solubilisierung mit Digitonin und der Auftrennung der Proteine in einem Gradientengel (3 - 18 %) wurden die Proteine in einem Gelfragment mittels Massenspektrometrie analysiert und zugeordnet. Die Migrationsprofile wurden in einem 2-D Schaubild via NOVA® visualisiert. Die Zuordnung der Massen erfolgte mit Proteinen der mitochondrialen Komplexe I–V.

Die Masse der Transporter DctA und DauA liegt im monomeren Zustand bei 50,3 kDa bzw. 59,4 kDa. In dem Migrationsprofil wurde in diesem Massenbereich keiner der Transporter identifiziert. Jedoch ist ein gemeinsamer Gipfel beider Proteine im Bereich von 170 kDa zu erkennen (Abb. 20). Im hochmolekularen Bereich deutet die gemeinsame Migration von DctA und DauA an verschiedenen Positionen auf das Vorliegen weiterer hochmolekularer DctA/DauA Komplexe hin. Die Komigration von DctA und DauA wurde nur bei aerobem Wachstum mit Glycerin festgestellt.

Für die anaeroben Transporter DcuA, DcuB und DcuC wurde unter anaeroben Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von Fumarat ebenfalls eine Kopräsenz in ähnlichen Profilen festgestellt (Abb. 21).

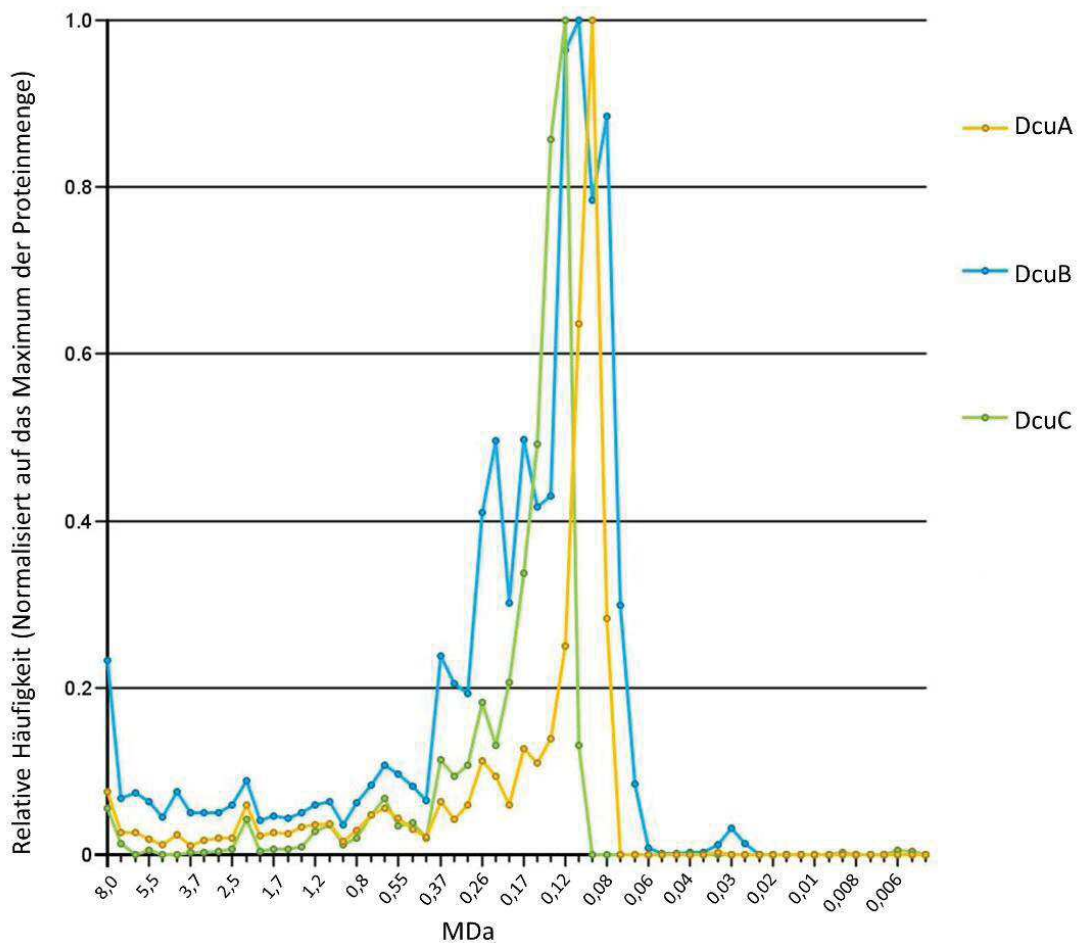


Abb. 21: Migrationsprofile der anaeroben C₄-DC-Transporter DcuA, DcuB und DcuC.

Die Isolierung Membranproteine erfolgte nach einer anaeroben Zucht in eM9-Medium mit 20 mM Glycerin und 10 mM Fumarat bei 37°C. Nach der Solubilisierung mit Digitonin und der Auftrennung der Proteine in einem nativen Gradientengel (3-18%) wurden die Proteine in einem Gelfragment mittels Massenspektrometrie analysiert und zugeordnet. Die Migrationsprofile wurden in einem 2-D Schaubild via NOVA® visualisiert. Die Zuordnung der Massen erfolgte mit Proteinen der mitochondrialen Komplexe I–V.

Die Transporter wiesen einen Hauptgipfel bei 120 kDa auf. Das Profil der Hauptgipfel ist in Lage und Aussehen für DcuA, DcuB und DcuC nur ähnlich, aber nicht identisch. Die Hauptgipfel entsprechen formal einem Di- oder Trimer der Proteine (Masse für das Monomer von: DcuA = 46 kDa, DcuB = 48 kDa, DcuC = 48 kDa). Im höhermolekularen Bereich ist das Profil für die drei Proteine sehr ähnlich mit mehreren Maxima unter anderem bei 0,26, 0,6 und 2 MDa. Diese gemeinsamen Peaks könnten auf Komplexe der Transporter-Trimere hindeuten. Die Profile wiesen nur nach anaerober Zucht mit Fumarat eine deutliche Komigration der Dcu-Transporter auf (Anhang 10.2.3, Tab. 11).

5.4.4. Untersuchung der Interaktion der Dcu Transporter mittels Bacterial-Two-Hybrid-System (BACTH)

Zur Ermittlung von Protein-Interaktionen in *Escherichia coli* wurden verschiedene Methoden entwickelt. Das Bacterial-Two-Hybrid-System (BACTH) stellt ein wichtiges Testsystem dar, das bereits erfolgreich für andere Dcu-Proteine eingesetzt wurde (Witan *et al.*, 2012; Karinou *et al.*, 2017). Die Methode basiert auf der funktionalen Rekonstitution der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* in dem Adenylatcyclase-negativen Stamm BTH101 von *E. coli*. Die Adenylatcyclase besteht aus den Domänen T25 und T18, die an die zu untersuchenden Interaktionspartner kloniert werden. In räumlicher Distanz voneinander oder durch Behinderung aufgrund von sterischen Effekten ist die Adenylatcyclase inaktiv. Befinden sich beide Proteine und somit die T25/T18 Fragmente in räumlicher Nähe, kommt es zur Umsetzung von ATP zu cAMP. cAMP bindet an CRP (*cAMP receptor protein*) und steigert die Expression des *lac*-Operons. Die β -Galactosidaseaktivität gibt dann einen Wert für das Vorhandensein und für die Stärke der Interaktion an. Für die Refunktionalisierung der Adenylatcyclase ist die cytoplasmatische Lokalisation der T18- und T25-Fragmente unabdingbar, während eine periplasmatische Lage zu einer inaktiven Adenylatcyclase bzw. zum Ausbleiben der β -Galactosidase führt (Witan *et al.*, 2012)

Eine Fusion der T18- und T25-Fragmente der Adenylatcyclase an die Transporter DcuA, DcuB und DcuC konnte aufgrund der periplasmatischen Ausrichtung der N- oder C-terminalen Enden der Transporter nur über ein Sandwichkonstrukt erfolgen. Somit wurden die Domänen der Adenylatcyclase in eine cytoplasmatische Schleife des Transporters integriert und Sandwichkonstrukte ähnlich zu dem DcuB-Sandwichkonstrukt von Witan *et al.* (2012) konstruiert. Nach der Kotransformation zweier unterschiedlichen Konstrukte in den *cya*-defizienten Stamm BTH101, erfolgte eine aerobe als auch eine anaerobe Kultivierung in LB-Medium ohne Effektor oder mit 50 mM Fumarat bzw. 50 mM L-Aspartat bei 30 °C. Die Bildung der Fusionsprodukte wurde mit IPTG induziert. Im Anschluss erfolgte die Messung der β -Galactosidaseaktivität. Die Messungen zeigten nur unter anaeroben Bedingungen eine Aktivität und somit eine Interaktion zweier Dcu-Proteine (Abb. 22). Die Aktivitäten unter aeroben Bedingungen sind im Anhang zu finden (Anhang, 10.2.4, Abb. 41). Das Vorhandensein sowie die Stärke einer Interaktion wurde mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle verglichen. Dabei wurde die Kombination eines Leucin-Zipperpaars (T25-Zip/T18-Zip), welche eine starke Interaktion aufweist, als Positivkontrolle und die Kombination T25-Zip mit DcuA_{sw}.

T25, die nicht interagieren, als Negativkontrolle verwendet. Die dadurch bestimmte Hintergrundaktivität wurde durch eine schwarze gestrichelte Linie visualisiert.

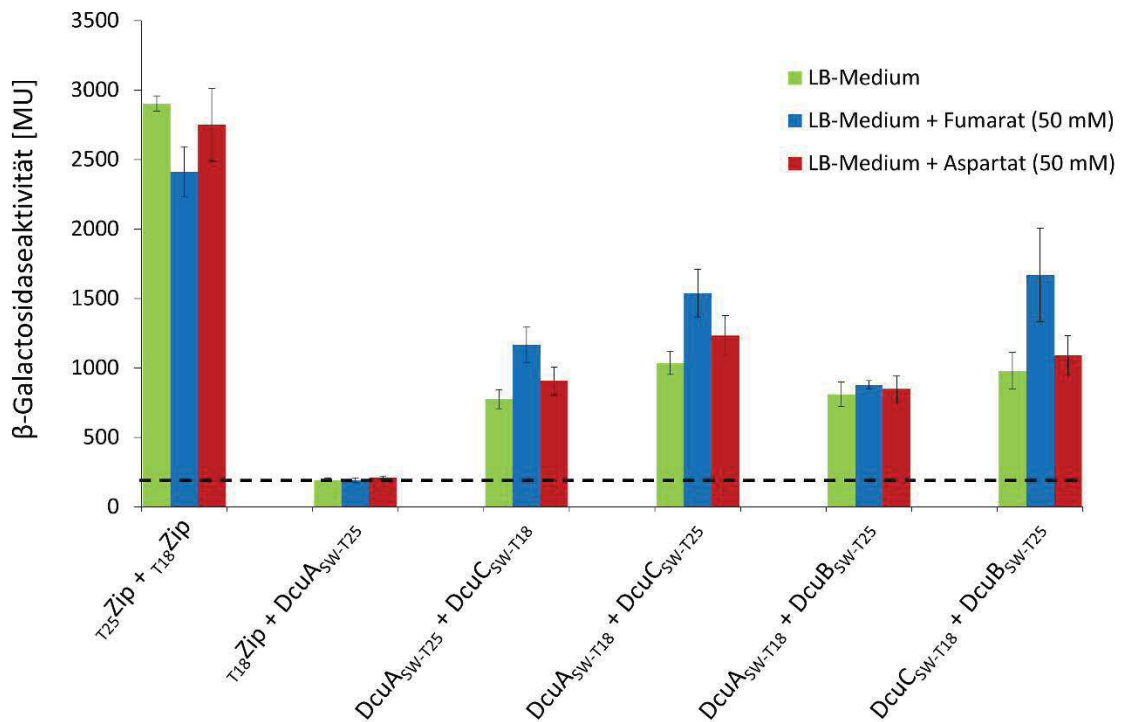


Abb. 22: Interaktion zwischen den Transportern DcuA, DcuB und DcuC unter anaeroben Bedingungen. DcuA, DcuB und DcuC lagen als Sandwichkonstrukte mit internem T18- oder T25-Fragment vor. Die T18/T25-Konstrukte wurden mittels Kotransformation durch Elektroporation in den Stamm BTH101 eingebracht. Die anaerobe Zucht erfolgte bei 30 °C in LB-Medium ohne Effektor (grün) oder mit je 50 mM Fumarat (blau) oder L-Aspartat (rot). Die Expression der Konstrukte wurde durch 0,5 mM IPTG induziert. Die β -Galactosidaseaktivität wurde innerhalb der exponentiellen Phase bei OD_{578} 0,5 - 0,8 in Miller-Units bestimmt. Die gestrichelte Linie legt den Schwellenwert einer Interaktion fest. Die Kombination aus T25Zip + T18Zip dient als Kontrolle für eine positive Interaktion. Als negative Interaktionskontrolle dient T18Zip + DcuA_{SW-T25}.

Alle Kombinationsmöglichkeiten der Transporter DcuA/DcuB, DcuA/DcuC und DcuB/DcuC zeigten unter anaeroben Bedingungen eine Aktivität und Interaktion, die deutlich über dem Schwellenwert lag. Dabei wurde teilweise mit einem Wert von 1670 MU mehr als die Hälfte der positiven Interaktion des Leucin-Zipperpaars (2900 MU) erreicht. Eine leichte Steigerung konnte weiterhin nach Zugabe von Fumarat oder L-Aspartat bei der Zucht gemessen werden. Unter aeroben Bedingungen blieb eine Aktivität jedoch unter den drei Dcu-Transportern aus (Anhang 10.2.4, Abb. 41).

5.4.5. Die Sandwichkonstrukte DcuA und DcuC sind nicht funktional

Unter anaeroben Wachstumsbedingungen katalysieren die Transporter DcuA, DcuB, DcuC die Aufnahme von C₄-DC, wie z.B. Fumarat, L-Malat und L-Aspartat (Six *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996). *DcuA*-, *dcuB*-, *dcuC*-defiziente Dreifach-Mutanten weisen ein stark reduziertes Wachstum unter anaeroben Bedingungen mit Glycerin und Fumarat auf (Zientz *et al.*, 1996). Dieser Wachstumsdefekt kann jedoch durch einen plasmidkodierten Dcu-Transporter komplementiert werden.

Die Topologie der C₄-DC-Transporter machte es notwendig die T25/T18- Fragmente in eine cytoplasmatische Schleife in den jeweiligen Transporter zu klonieren. In einem Wachstumsexperiment mit den plasmidkodierten Sandwichkonstrukten DcuA_{SW} und DcuC_{SW} sollte die Funktionalität dieser Transporterkonstrukte getestet werden. Das Sandwichkonstrukt von DcuB ist nicht in der Lage das Wachstum zu komplementieren und scheint transportinaktiv zu sein (Witan, 2012). Die Wachstumsexperimente erfolgten anaerob in eM9-Medium mit Na₂-Fumarat als Kohlenstoff- und Energiequelle (Abb. 23).

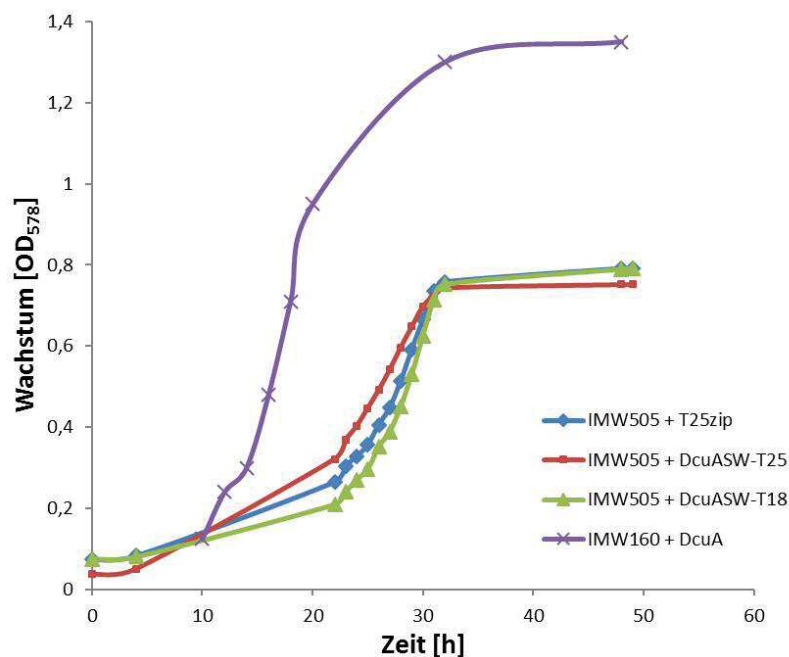


Abb. 23: Wachstumskomplementation des Dcu-Transporter defizienten Stammes IMW505 mit plasmidkodiertem DcuA_{sw}. Wachstumskomplementation des Dcu-Transporter defizienten Stammes IMW 505 mit plasmidkodiertem DcuA_{SW}. Der *dcu*-negative Stamm IMW505 wurde mit den Konstrukten DcuA_{SW-T25} und DcuA_{SW-T18} mittels Elektroporation transformiert. Als Negativkontrolle dient der Stamm IMW505 mit eingebrachtem pKNT25-Vektor. Als Positivkontrolle dient der *dcu*-negative Stamm IMW160 mit plasmidkodiertem DcuA (Zientz, 2000). Die anaerobe Kultivierung erfolgte in eM9-Medium mit 20 mM Fumarat. Die OD₅₇₈ der Zuchten wurde nach 22 h in regelmäßigen Abständen gemessen.

Für die Wachstumsversuche wurde der Stamm IMW505 mit chromosomal deletiertem *dcuA*, *dcuB* und *dcuC* verwendet. Als Positivkontrolle diente der *dcu*-negative Stamm IMW160 mit plasmidkodiertem DcuA bzw. DcuC (Zientz, 2000). Die Dcu-Defizienz von IMW505 sollte durch je ein Sandwichkonstrukt komplementiert werden.

In Abb. 23 ist das Wachstum des *dcu*-negativen Stamms IMW505 nach Komplementation durch die Transporterkonstrukte DcuA_{SW-T25} und DcuA_{SW-T18} dargestellt. Die Stämme, die das DcuA-Sandwichkonstrukt exprimierten, zeigten erst nach langer lag-Phase von ungefähr 20 h, Wachstum auf Glycerin mit Fumarat. Bei Komplementation mit plasmidkodiertem DcuA ohne Einbau eines Fragments in das Protein, war die lag-Phase deutlich kürzer und das Wachstum deutlich schneller. Somit sind die Sandwichkonstrukte von DcuA nicht in der Lage das Wachstum mit Fumarat zu komplementieren und scheinen transportinkompetent zu sein. Das DcuC-SW Konstrukt war im Komplementationstest ebenfalls inaktiv (Anhang 10.2.5, Abb. 42).

5.4.6. Validierung des Dcu-Interaktoms durch das *membrane strep protein Interaction experiment* (mSPINE)

Die Untersuchungen zur Protein-Interaktion mittels BACTH und Complexome profiling weisen auf eine Interaktion zwischen den Transportern hin. Die Interaktion der Dcu-Transporter, sollte mit einer dritten Methode, dem mSPINE (*membrane strep protein Interaction experiment*) *in vivo* untersucht werden. Dabei werden zwei Proteine auf unterschiedlichen Plasmiden mit unterschiedlichen Tags (z.B Strep- und His-Tag) in *E. coli* koexpressiert und über einen Tag (Strep-Tag) über eine Strep-Tactin-Säule chromatographiert. Das Protein ohne den entsprechenden Tag kann nur dann an die Strep-Tactin Säule binden, wenn die Proteine miteinander interagieren. Alternativ kann nach Koexpression der Proteine in *E. coli* mittels Formaldehyd zusätzlich eine *in vivo* Vernetzung durchgeführt werden. Liegen beide Proteine in räumlicher Nähe, werden diese über eine Methylengruppe stabil miteinander verknüpft (Nadeau & Carlson, 2007; Sutherland *et al.*, 2008). Formaldehyd bildet einen Crosslinker mit einer kleinen Distanz von 2,7 Å aus. Somit können vorwiegend direkt miteinander interagierende Proteine vernetzt werden. Eine Auftrennung der kovalenten Vernetzung der Proteine ist durch Aufkochen möglich und erlaubt eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe im SDS-Gel. Im anschließenden Immuno-Blot kann festgestellt werden, ob sich bei-

de Proteine in der Elutionsfraktion befanden. Das Verfahren kann mit unterschiedlichen Tags und entsprechenden Säulen analog durchgeführt werden.

Zur Untersuchung der Interaktion innerhalb der Transporter wurde der Transporter DcuC von einem Derivat des Vektors pASK-IBA3plus exprimiert, welcher einen Strep-Tag am C-Terminus des Proteins sowie einen mit Anhydrotetracyclin (AHT) induzierbaren Promotor enthält. DcuB hingegen wurde von einem Derivat des Vektors pBAD33 mit einem C-terminalem PhoA-Tag sowie einem Arabinose-induzierbaren Promotor exprimiert. Die Untersuchung der Interaktion der beiden Transportproteine erfolgte mit und ohne Zugabe von Formaldehyd.

Nach dem Aufschluss der Zellen mittels French Press erfolgte die Isolierung der Membranproteine durch Zentrifugation sowie anschließender Solubilisierung in Puffer mit 2 % Empigen BB. Die Membranproteine wurden mittels C-terminalem Strep-Tag des DcuC Konstruktes an die Strep-Tactin-Affinitätssäule gebunden. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine durch Desthiobiotin abgelöst. Die Proteine im Eluat wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot visualisiert (Abb. 24).

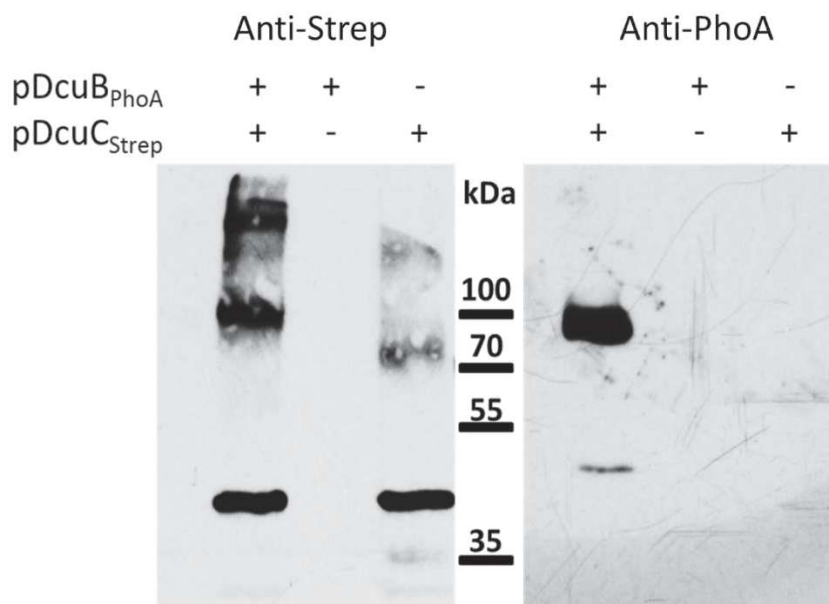


Abb. 24: *In vivo* Bindung von DcuB-PhoA an DcuC-Strep und Ko-Reinigung mittels Strep-Tactin. DcuB-PhoA und DcuC-Strep wurden in dem *dcu*-negativen Stamm IMW160 coexprimiert. Die Induktion mit 200 μ g Anhydrotetracyclin erfolgte nach einer anaeroben Zucht bei 30 °C bei einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8. Nach 5 h Inkubation wurde 0,6 % Formaldehyd zur Vernetzung der Proteine hinzugegeben. Die Proteine wurden aus der mit 2 % Empigen solubilisierten Membranfraktion mittels einer Strep-Tactin Säule isoliert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-PhoA Antikörpern. Alle Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden je Bahn 20 μ l der gereinigten Proteine aufgetragen.

Nach der Koexpression von DcuB und DcuC ist im Western-Blot mit Anti-Strep eine Bande auf der Höhe von 40 kDa, 100 kDa und >100 kDa vorhanden. DcuC hat eine molekulare Masse von 48 kDa. DcuC konnte in der Fraktion somit als Monomer und als höherer Oligomer detektiert werden. Im Western-Blot mit Anti-PhoA wurde eine Bande von 80 kDa nachgewiesen. Diese entspricht der Größe des DcuB-PhoA Konstrukts. In Abwesenheit von DcuC-Strep kam es zu keiner Bindung von DcuB-PhoA an die Strep-Tactin-Säule, was eine unspezifische Bindung ausschließt. Die Expression von DcuC ohne DcuB-PhoA zeigt nur nach der Detektion mit Anti-Strep spezifische Proteinbanden, die bei der Detektion mit Anti-PhoA ausblieben und somit unspezifische Banden ausschließen.

Die Ko-Chromatographie von DcuB und DcuC war nur nach Vernetzen mit Formaldehyd sichtbar. Dies deutet auf eine schwache Interaktion hin (Graf, 2013). Homolog zur mSPINE Untersuchung mit DcuB und DcuC wurden die Interaktionsuntersuchungen zwischen allen drei Dcu-Transporter in verschiedenen Kombinationen durchgeführt. Die Ergebnisse der weiteren mSPINE Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Interaktion der Transporter DcuA mit DcuB und von DcuA mit DcuC (Anhang 10.2.6, Abb. 43). Alle gezeigten Interaktionen konnten nur nach vorherigem Crosslink mit 0,6 %igem Formaldehyd nachgewiesen werden.

5.4.7. Funktionelle Untersuchung eines möglichen Dcu-Transporterkomplexes

Die *in vivo* Untersuchungen zur Interaktion zwischen den Transportern deuten auf eine Komplexbildung zwischen den Transportern hin. Für die Interaktionsmessung im BACTH-Test wurden jedoch Sandwichkonstrukte mit integriertem T25/T18 Fragment verwendet, welche nicht mehr transportaktiv waren. In den mSPINE-Untersuchungen konnten Interaktionen zweier Dcu-Transporter nur nach vorherigem Crosslink sowie einer Konzentrierung der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Wegen dieser Einschränkungen wurde überprüft, ob funktionelle Hinweise auf eine Interaktion der Dcu-Transporter nachweisbar sind.

Eine mögliche gegenseitige Beeinflussung durch eine Interaktion wurde für das Paar DcuA/DcuB untersucht. Zum Ausschluss einer Interferenz, wurde ein *dcuC*-negativer Stamm verwendet. Zusätzlich wurde DcuB durch Deletion entfernt. Der Stamm IMW374 bildet unter anaeroben Bedingungen nur DcuA, welches konstitutiv gebildet wird. In dem experimentellen Ansatz wurde DcuB in plasmidkodierter Form einge-

bracht und die Aufnahmeaktivität für [^{14}C]-Aspartat bestimmt, das unter den Testbedingungen relativ spezifisch durch DcuA aufgenommen wird (Abb. 25) (Strecker *et al.*, 2018).

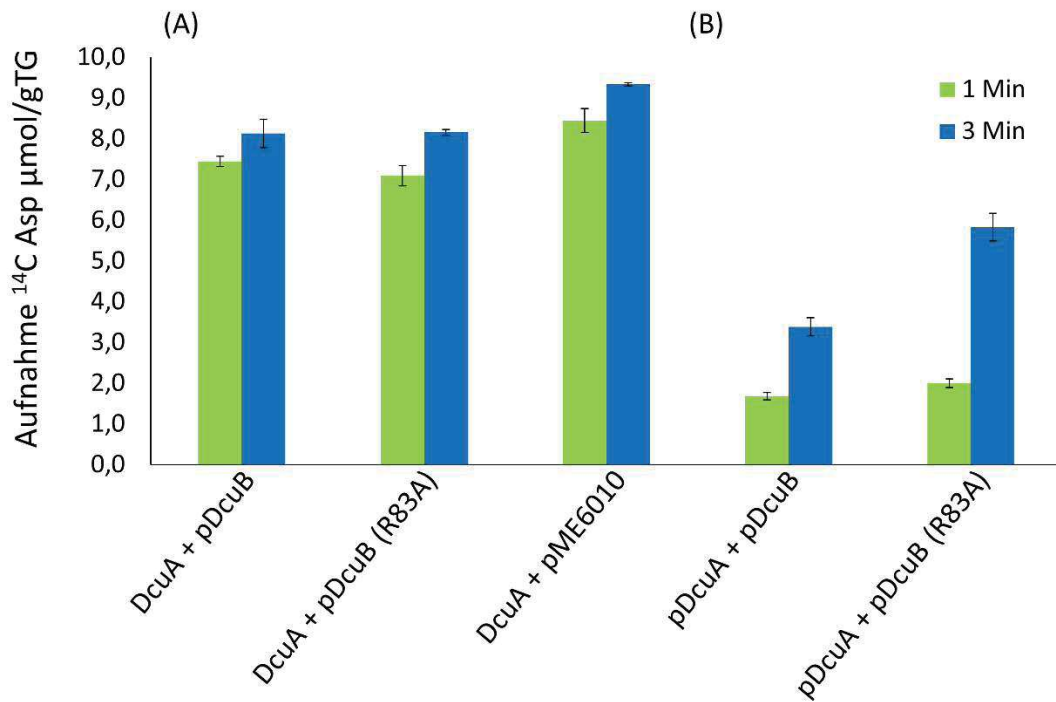


Abb. 25: Aufnahme von [^{14}C]-Aspartat in verschiedenen *dcu*-negativen Stämmen.

Für die Transportmessungen wurde der Transporter DcuB in dem *dcuB*-, *dcuC*-negativen Stamm IMW374 transformiert (A) andererseits wurden zum Vergleich die Transporter DcuA und DcuB in dem *dcu*-negativen Stamm IMW160 kotransformiert (B). Die Zucht erfolgte anaerob in eM9 Medium + 20 mM Aspartat bei 37 °C für 48 h. Die Aufnahme von 100 μM [^{14}C]-Aspartat wurde nach jeweils 1 und 3 Minuten gemessen. Als Vergleich diente jeweils eine regulatorisch aktive, jedoch transportnegative Mutante DcuB R83A. pDcuA wurde mit 200 μg Anhydrotetracyclin induziert, wohingegen pDcuB mit eigenem Promotor exprimiert wurde. DcuC war in allen Ansätzen deletiert.

Die Transportaktivität von DcuA wird durch DcuB nur geringfügig reduziert (Abb. 25A). Die Anwesenheit der regulatorisch aktiven, aber transport-negativen Variante von DcuB (R83A) (Kleefeld *et al.*, 2008) hat den gleichen geringen Effekt wie DcuB. Deshalb ist davon auszugehen, dass DcuB die Funktion von DcuA auf Proteinebene nicht signifikant verändert und dass keine funktionelle Interaktion besteht. Werden DcuA und DcuB plasmidkodiert in einen *dcu*-negativen Stamm eingebracht, ist eine Steigerung der Transportaktivität nach drei Minuten um etwa 45% zu erkennen (Abb. 25B). Die Unterschiede zwischen den Versuchsreihen (A) und (B) könnten auf die unterschiedlichen Mengen an DcuA und DcuB zurückzuführen sein.

6. Diskussion

6.1. Signalweiterleitung in DcuS durch die PAS_C Domäne

C₄-Dicarboxylate (C₄-DC) werden in *Escherichia coli* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen durch den Sensor des Zweikomponentensystems (ZKS) DcuS-DcuR perzipiert. Die Wahrnehmung der C₄-DC über die periplasmatische PAS-Domäne des Sensors DcuS wird als Signal an die Transmembranhelix 2 (TM2) weitergeleitet. Die Weiterleitung des Signals über die Membran erfolgt über TM2 durch eine Kolbenhubbewegung (Monzel & Uden, 2015). Anschließend gelangt das Signal über einen Linker aus neun Aminosäuren zur cytoplasmatischen PAS-Domäne und zur Kinase-Domäne. Der cytoplasmatische Bereich von DcuS erstreckt sich dabei von Aminosäure 202 bis 543. Die PAS_C-Domäne nimmt hierbei eine wichtige Rolle ein. Einerseits wird hier wahrscheinlich die Präsenz der Transporter DctA und DcuB erkannt (Witan *et al.*, 2012; Kleefeld *et al.*, 2008), andererseits erfolgt in der PAS_C-Domäne die Signaltransduktion einer vertikalen Kolbenhubbewegung, die möglicherweise die Auflösung der Dimerstruktur zur Folge hat (Etzkorn *et al.*, 2008; Monzel *et al.*, 2013; Monzel & Uden, 2015). Die Dimerisierung der Domäne und eine hohe Plastizität sind bekannterweise wichtig für die Signalverarbeitung (Etzkorn *et al.* 2008; Möglich *et al.*, 2009). Funktions- und Strukturuntersuchungen von Monzel *et al.* (2013) geben erste Hinweise auf mögliche Strukturveränderungen bei der Signaltransduktion durch PAS_C.

Die ON-Varianten konzentrieren sich hauptsächlich auf den N-Terminus der PAS_C-Domäne, während OFF-Varianten über die ganze Domäne verteilt waren. Werden die ON-Varianten in einem homologen Strukturmodell von CitA_{Gt} dargestellt, ist eine deutliche Ansammlung in einer V-förmigen Tasche, bestehend aus der N-terminalen α -Helix 1, den β -Strängen 1 und 2 und dem Übergang zum C-Terminus von PAS_C, zu erkennen (Ergebnisse 5.3.1, Abb. 10.). Bei der Charakterisierung der ON-Varianten zeigten sich drei Klassen: Typ I-Varianten weisen eine Abnahme in der Homodimerisierung und der Interaktion mit DctA auf; Typ IIa-Varianten bestehen weiterhin als Homodimer, jedoch ist die Interaktion mit DctA nicht mehr gegeben; Typ IIb-Varianten weisen sowohl Homodimerisierung als auch Interaktion mit DctA auf. Zwei Varianten, die in den Untersuchungen besonders aufgefallen sind und in dieser Arbeit weiter untersucht wurden, waren die Substitution N248D und N304D. N248D gehört zum ON-Typ I. Dieser Aminosäurerest zeichnet sich durch seine Lage und seine besonderen Eigenschaften aus. Er

liegt im Gegensatz zu anderen ON-Varianten nicht auf der Oberfläche der Dimerstruktur, sondern im Inneren des Proteins und verbindet durch Wasserstoffbrücken die α -Helices 1 und 2 sowie die β -Stränge 1 und 2. Des Weiteren reagiert dieser Rest, im Gegensatz zu weiteren ON-Varianten vom Typ I, auf Substitutionen unabhängig von Polarität, Ladung oder Größe. Für diesen Rest wird eine Schanierfunktion postuliert (Monzel *et al.*, 2013). Dabei soll die Kolbenhubbewegung von TM2 in eine Strukturänderung und eine Schwächung der Dimerisierung umgesetzt werden. Eine weitere wichtige Variante ist die Mutation in Position N304 mit der Substitution Asn zu Asp. Diese ON-Variante weist trotz Substitution eine Interaktion mit DctA sowie Homodimerisierung auf. Der Interaktionsverlust und eine Schwächung der Homodimerisierung können demnach nicht der Grund für die Sensoraktivierung sein. Somit sind Reste aus dieser Gruppe besonders interessant für weitere Untersuchungen.

6.1.1. Verkürzte PASC-Kinase Konstrukte weisen keine effektorunabhängige Aktivität auf

Mit Hilfe der HDX-MS Methode wurden die Unterschiede in der Deuteriumaufnahme zwischen zwei Funktionszuständen des Sensors untersucht, um einen Hinweis auf Strukturveränderungen in PASC zu erhalten. Die HDX-MS Methode setzt für eine schnelle Untersuchung eine Konzentration von mindestens 50 μ M und ein gelöstes Protein voraus. Messungen mit membranintegrierten Proteinen sind aufgrund des hohen Lipidgehalts sowie der störenden Detergenzien kompliziert (Busenlehner *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte bestanden aus der PASC- und Kinase-Domäne von Aminosäure 212-543 (Dcu_{SPK}) oder zusätzlich dem Linker (Aminosäure 202-543) (Dcu_{SPKL}). Die Konstrukte Dcu_{SPK} oder Dcu_{SPKL}, inklusive der ON-Mutationen von Monzel *et al.* (2013), wiesen keine Aktivität im Reporter gentest auf. DcuS oder Dcu_{SPK+T25} aktivierten dagegen die Expression von *dcuB-lacZ* (Abb. 26). Lediglich die Variante N304D wies in allen Varianten eine β -Galactosidaseaktivität für die Reporter genfusion *dcuB'-lacZ* auf. Es ist davon auszugehen, dass die C-terminale T25-Domäne artifizielle Ergebnisse verursacht. Diese Konstrukte sollten für Funktionsuntersuchungen nicht mehr berücksichtigt werden.

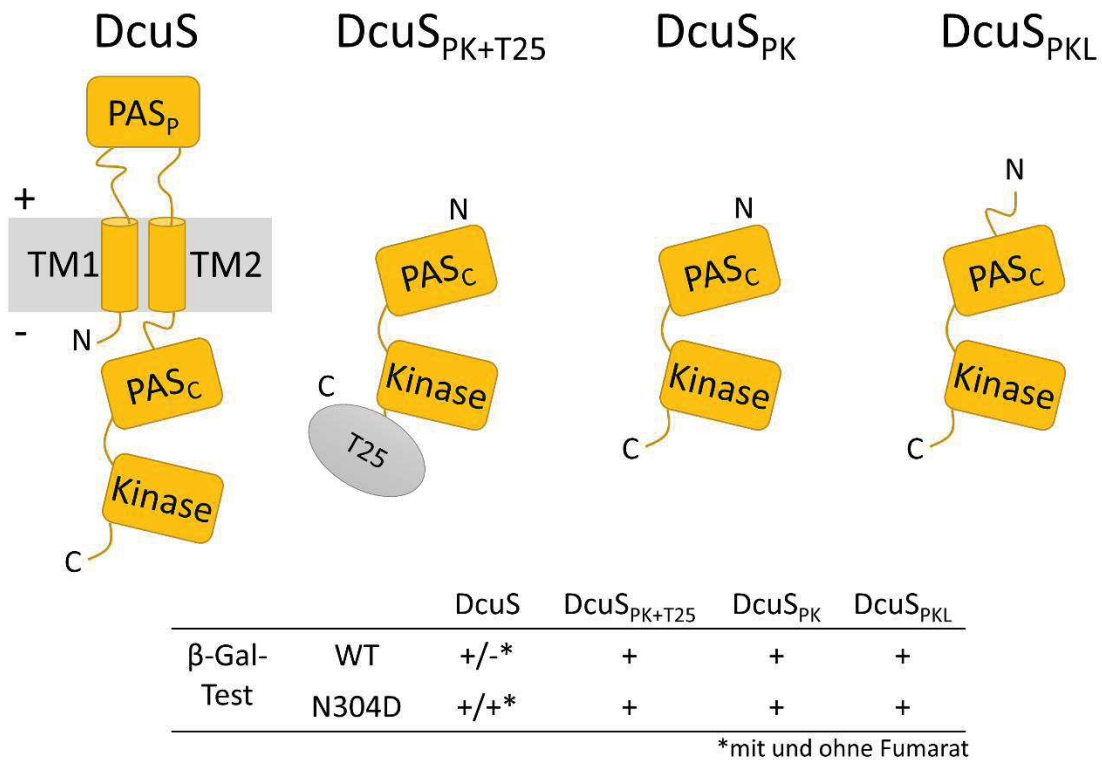


Abb. 26: Übersicht der DcuS-Konstrukte mit den Ergebnissen der Reportergen-tests. DcuS ist vereinfacht in seine Domänen und als Monomer dargestellt. Die Reportergenaktivität wurde für die Reporterfusion *dcuB'*-*lacZ* untersucht. PAS_P: periplasmatische PAS-Domäne; TM: Transmembranhelix; PAS_C: cytoplasmatische PAS-Domäne; DcuS: natives Protein; DcuS_{PK+T25}: PAS_C- & Kinase-Domäne + T25-Fragment der Adenylatcyclase von *B. pertussis*; DcuS_{PK}: PAS_C- & Kinase-Domäne; DcuS_{PKL}: DcuS_{PK} + Linker zwischen TM2 und PAS_C-Domäne.

Der Linker hatte im Konstrukt DcuS_{PKL} keinen Einfluss auf die Aktivität (Abb. 26) und wurde in ähnlichen Untersuchungen als ein wichtiger Teil der Signaltransduktion postuliert (Stopp *et al.*, unveröffentlicht). In *Bordetella pertussis* konnte die Signifikanz des Linkers zwischen TM Helices und PAS-Domäne für die Sensor-Kinase BvgS_{Bp} gezeigt werden. Durch strukturelle Veränderungen steuert dieser das Umschalten zwischen Phosphatase- und Kinaseaktivität (Lesne *et al.*, 2016; 2017).

Die Eingruppierung der ON-Varianten erfolgte in Monzel *et al.* (2013) in nativem DcuS. DcuS_{PK} wies keine Aktivität mehr auf. Auch die verschiedenen ON-Varianten außer ON (N304D) zeigten keine Aktivität. Die Ursache für die fehlende Aktivität können vielfältig sein, deuten aber auf eine Störung der Struktur von DcuS_{PK} hin. Eine Charakterisierung von weiteren ON-Varianten in DcuS_{PK} ist im BACTH-Test kaum mög-

lich, da T25 eine artifiziell positive Aktivität verursacht (Abb. 26). Dieses Fragment mit einer Größe von ca. 25 kDa könnte die Konformation des Fragments und die Interaktion mit weiteren Proteinen beeinflussen.

Die Homodimerisierung der PAS_C-Domäne spielt somit eine wichtige Rolle in der Aktivitätskontrolle von Sensorkinasen. Dies gilt nicht nur für DcuS aus *E. coli*, sondern auch für NifL_{AV} aus *Azotobacter vinelandii* oder KinA_{BS} aus *Bacillus subtilis*. Bei diesen führt eine geschwächte Dimerisierung der PAS-Domäne zu einer veränderten Kinaseaktivität (Lee *et al.*, 2008; Slavny *et al.*, 2010). Die Signifikanz einer Dimerisierung des Sensors wird weiterhin durch eine fehlende *in vitro* Phosphorylierung von gereinigtem DcuS gezeigt, welches vermutlich als Monomer vorlag (Janausch *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum Vollängenprotein zeigte DcuS_{PK} *in vitro* eine Phosphorylierung von gereinigtem Protein. Die Bildung eines Dimers in DcuS_{PK} wurde zusätzlich in Gelfiltrationsstudien verifiziert (Gencheva, unveröffentlicht).

6.1.2. Strukturveränderungen lokalisieren sich auf einen eingeschränkten Bereich

In DcuS_{PK} und DcuS_{PKL} konnte ausschließlich in der ON-Variante N304D eine effektorunabhängige Expression der Zielgene mittels Reporterfusion ermittelt werden. Werden die D₂O Zugänglichkeiten von DcuS_{PK} (WT) mit DcuS_{PK} (N304D) verglichen, sind deutliche Unterschiede zu erkennen. PAS_C weist in der ON-Variante N304D gegenüber DcuS_{PK} eine höhere Zugänglichkeit in der N-terminalen α -Helix 1 auf sowie verringerte Zugänglichkeiten in den β -Strängen 3 und 4 und im C-terminalen Übergang zur Kinase-Domäne. Möglicherweise entspricht dies, der Aktivierung durch TM2 in Anwesenheit von Fumarat. Das könnte darauf hinweisen, dass die Helices im Dimer bei Aktivierung voneinander entfernt und für Deuterium besser zugänglich werden. Die HDX-MS-Messungen weisen des Weiteren eine Verringerung der Zugänglichkeit in den β -Faltblättern 3 & 4 für Deuterium auf. Diese Verringerung könnte darauf hinweisen, dass in Folge des Kolbenhubs sowie der resultierenden N-terminalen Spreizung der α -Helices im Zentrum der PAS_C-Domäne eine Verschiebung der β -Faltblätter und somit eine Kompaktierung dieses Bereichs erfolgt (Abb. 27).

In der ON Variante:
Schwächung der
Dimerisierung in α -
Helix 1

Kompaktierung in den β -
Faltblättern 3 & 4 und der
 α -Helix 1 der Kinase

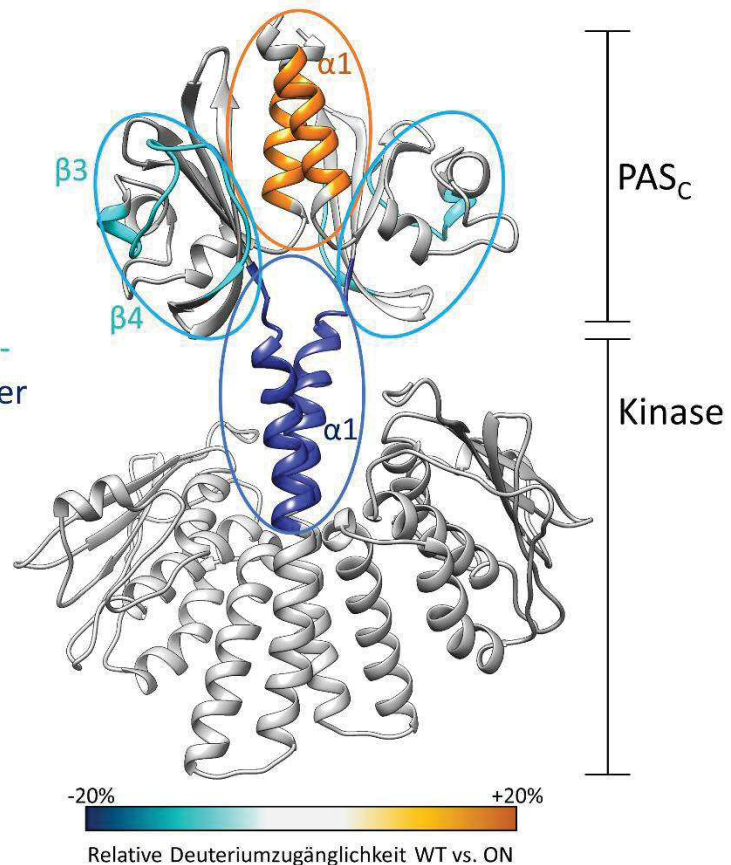


Abb. 27: Vergleiche der relativen Deuterium-Aufnahme von DcuSPK mit DcuSPK (N304D). Das Modell basiert auf einer Fusion der Struktur von CitA_{Gt} und einer I-Tasser Strukturvorhersage. Die Bereiche der Veränderungen in der D₂O-Aufnahme sind farblich markiert. Hellblau: 10-15 % niedrigere Deuterium-Aufnahme; Blau: 20 % niedrigere Deuterium-Aufnahme; orange: 5-10 % stärkere Deuterium-Aufnahme.

Die Veränderungen zwischen den Funktionszuständen sind bei den HDX-Messungen ähnlich wie in den Studien von Monzel *et al.* (2013) in einem kleinen Bereich lokalisiert. In diesem Bereich befinden sich vorwiegend hydrophobe Aminosäurereste. Diese Reste fördern die Dimerisierung der PAS_C-Domäne und sind offensichtlich wichtig für die Aktivitätskontrolle des Sensors. In den PAS_C-Domänen von KinA_{Bs} aus *B. subtilis* oder von VicK_{Sm} aus *S. mutans* konnte ebenfalls die Relevanz hydrophober Reste für die Dimerisierung und die Signaltransduktion gezeigt werden (Lee *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). Die schwächere Zugänglichkeit im Übergang von PAS_C zu Kinase sowie in der ersten α -Helix der Kinase-Domäne könnte eine Kompaktierung dieser Helix als Folge der Signaltransduktion von PAS_C sein. Die N-terminale α -Helix 1 der Kinase-Domäne könnte, ähnlich zu BgvS_{Bp}, wichtig für die Signalweiterleitung oder den Funktionszustand der Kinase sein (Lesne *et al.*, 2017). Die Signalweiterleitung könnte in

Form einer Rotation der α -Helix erfolgen (Berntsson *et al.*, 2017). Anschließende strukturelle Veränderungen in den α -Helices könnten dann zur Aktivierung und zur Autophosphorylierung der Kinase führen (Mechaly *et al.*, 2014; Casino *et al.*, 2014; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2018).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Dcu_{SPK} stehen die Ergebnisse von Dcu_{SPK+T25}. Die ON-Variante (N304D) weist im Vergleich mit Dcu_{SPK+T25} keine Steigerung der Zugänglichkeit in der N-terminalen α -Helix 1 von PAS_C auf. Kompaktierungen in den β -Strängen 3 und 4 sind jedoch auch hier zu erkennen. Das Fusionskonstrukt zeigt keine deutliche Lokalisierung der Veränderungen (Abb. 28).

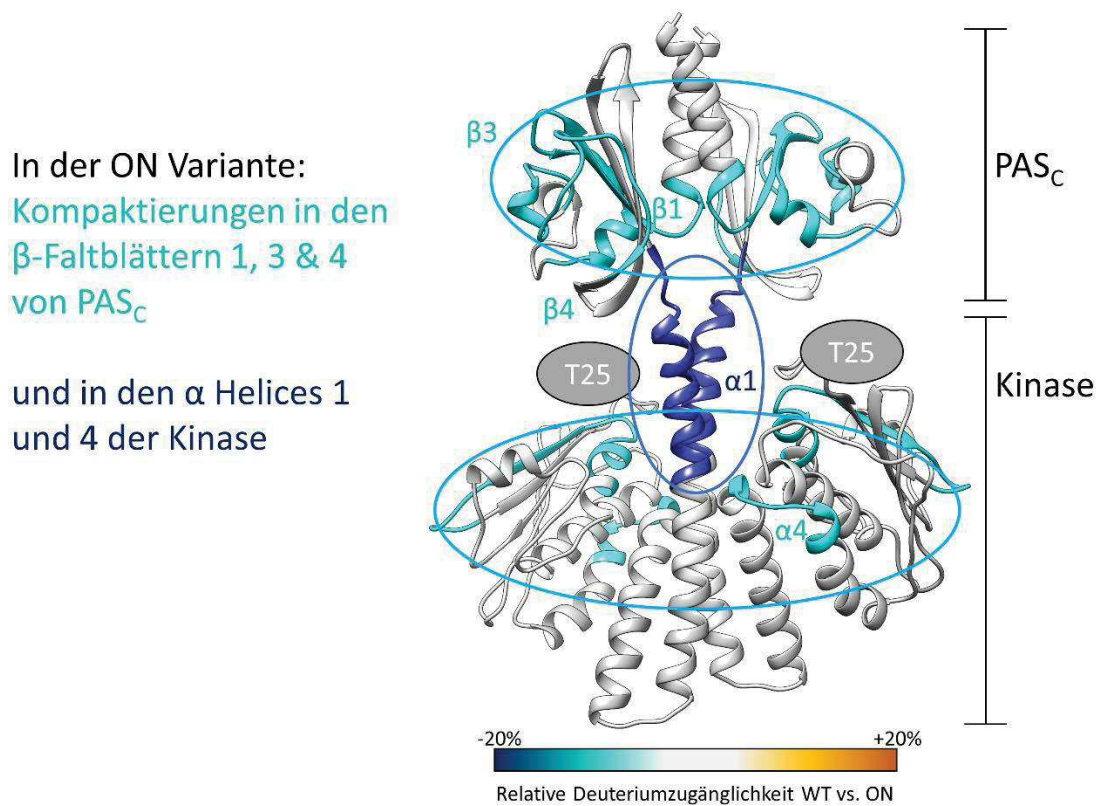


Abb. 28: Vergleiche der relative Deuterium-Aufnahme von Dcu_{SPK+T25} mit Dcu_{SPK+T25} (N304D). Das Modell basiert auf einer Fusion der Struktur von CitA_{Gt} und einer I-Tasser Strukturvorhersage. Die Bereiche der Veränderungen in der D₂O-Aufnahme sind farblich markiert. Hellblau: 10-15 % niedrigere Deuterium-Aufnahme; Blau: 20 % niedrigere Deuterium-Aufnahme; orange: 5-10% stärkere Deuterium-Aufnahme.

Die Fusion eines großen Fragments könnte einen großen Einfluss auf die Struktur haben und zeigt sich ebenfalls deutlich in den Aktivitäten der generierten ON-Varianten (Abb. 26). Diese Aktivitäten scheinen durch die Fusion des Fragments deutlich beein-

flusst zu sein. Eine Übertragung der Ergebnisse auf das native Protein DcuS wird somit deutlich erschwert und ist schwer zu interpretieren.

6.1.3. Die Signaltransduktion im Sensor DcuS

Anhand der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen sowie den neuen Erkenntnissen durch die HDX-MS-Messungen ist es möglich das bisherige Funktions- und Arbeitsmodell von Monzel & Unden, 2015 zu bestätigen (Abb. 29).

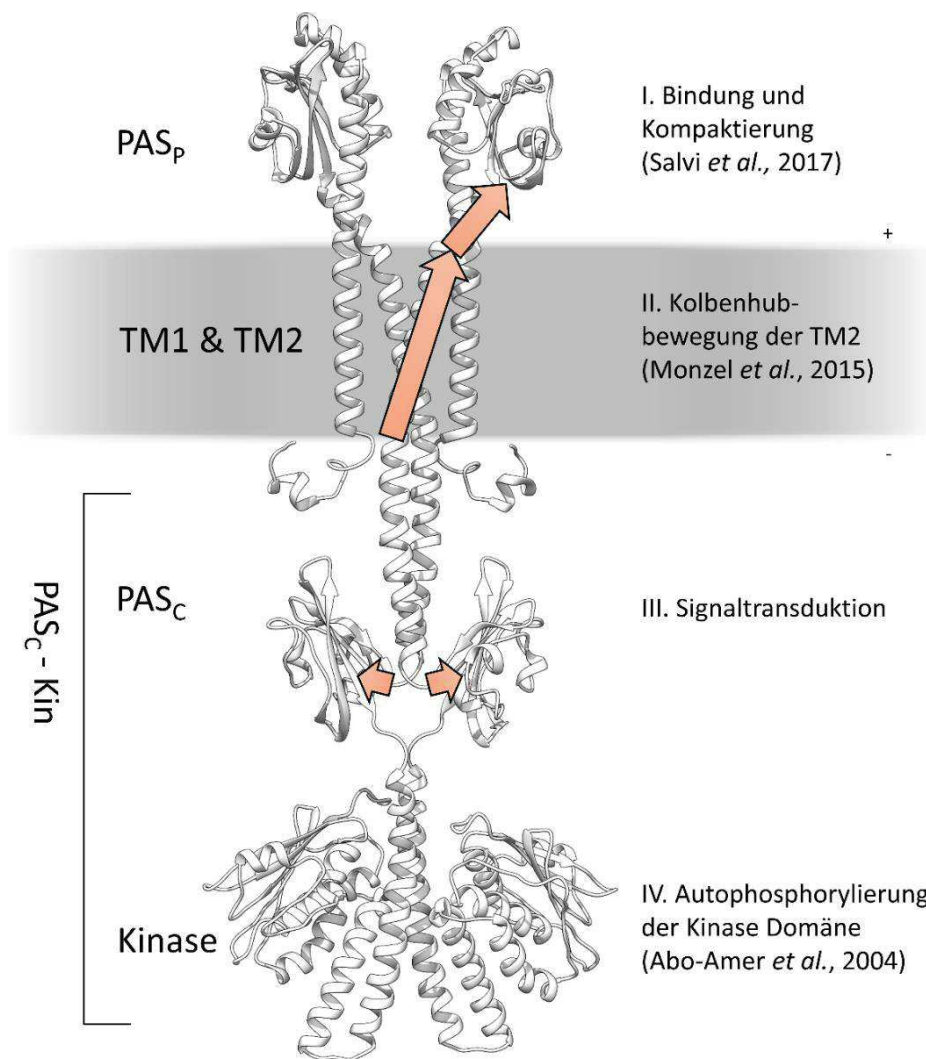


Abb. 29: Strukturveränderungen während der Signaltransduktion in DcuS. Die Struktur von DcuS als Dimer wurde aus Strukturvorhersagen (Kinase: *Thermothoga maritima*) sowie Kristallstrukturen (PAS_p: CitA_{Gt}; PAS_c: CitA_{Gt}) modelliert. Die Veränderungen in der Struktur von DcuS während der Signaltransduktion sind durch orangene Pfeile markiert. Die Kompaktierung der PAS_p-Domäne sowie die Kolbenhubbewegung wurden experimentell nachgewiesen (Salvi *et al.*, 2017; Monzel & Unden, 2015). Die Konformationsänderungen im Cytoplasma sind aufgrund von experimentellen Daten von Monzel *et al.*, 2013 sowie dieser Arbeit postuliert.

Der Sensor DcuS perzipiert C₄-DC wie z. B. Fumarat und L-Malat. Die Bindung von C₄-DC in der periplasmatischen Domäne führt zur einer Kompaktierung von PAS, wodurch die C-terminale α -Helix 6 sich von der Membran entfernt. Dadurch entsteht eine kolbenhubförmige Bewegung von TM2 aus der Membran zum Periplasma. TM2 wird im Dimer parallel um 4-6 Å zum Periplasma verschoben. Über den α -helikalen Linker erfolgt die Signalweiterleitung zur PAS_C-Domäne. Der Übergang vom vertikalen Kolbenhub von TM2 zur Veränderung der Dimerisierungsstruktur von PAS_C findet in der N-terminalen α -Helix 1 sowie in den β -Faltblättern 3 und 4 statt. Dabei divergieren die α -Helices eines Dimers voneinander weg, was zu einer Kompaktierung der β -Faltblättern führt. Die Strukturveränderungen lokalisieren sich einem Bereich, welcher von hydrophoben Aminosäureresten dominiert ist. Diese strukturellen Veränderungen resultieren in der Aktivierung der Autophosphorylierung der Kinasedomäne. Die Aktivierung findet hierbei möglicherweise über Kompaktierungen in den N-terminalen α -Helices der Kinase Domäne und daraus folgenden Destabilisierungen der Quartärstruktur statt, ähnlich wie für HK853 von *Thermotoga maritima* beschrieben (Marina *et al.*, 2005; Casino *et al.*, 2009; Bhate *et al.*, 2015).

6.2. Die Funktion des C₄-DC-Transporters DcuA als [N]-shuttle im aeroben Stoffwechsel

E. coli verfügt über verschiedene Transporter, um unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen C₄-DC zu metabolisieren. Unter anaeroben Bedingungen werden die Transporter DcuA, DcuB und DcuC exprimiert (Six *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998; Zientz *et al.*, 1999). Unter aeroben Bedingungen werden die Transporter DctA, DcuA und DauA exprimiert (Zientz *et al.* 1998; Davies *et al.*, 1999; Golby *et al.*, 1999). Der aerobe Transporter DctA dient nicht nur dem Transport von C₄-DC, sondern versetzt den Sensor des ZKS DcuS-DcuR in einen responsiven Zustand (Witan *et al.*, 2012). DauA dient zur Aufnahme von C₄-DC unter sauren pH-Werten und beeinflusst die Expression des Transporters DctA (Karinou *et al.*, 2013). DcuA wird konstitutiv sowohl unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen gebildet. Dieser ist nicht in der Lage einen Verlust von DctA zu kompensieren. DctA Deletionsmutanten hatten ein deutliches Wachstumsdefizit (Golby *et al.*, 1998). Somit wurde für DcuA die Funktion als Transporter für den Wechsel zwischen aeroben und anaeroben Bedingungen postuliert

(Janausch *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte eine neue Funktion des Transporters DcuA identifiziert werden.

6.2.1. DcuA ist verantwortlich für die Aufnahme von L-Aspartat unter aeroben Wachstumsbedingungen

Mit aeroben Wachstumsexperimenten konnte die Notwendigkeit des Transporters DcuA ,unter aeroben Bedingungen, für den Transport von L-Aspartat als Stickstoffquelle gezeigt werden. Deletionsmutanten ohne DcuA waren nicht mehr in der Lage L-Aspartat in ausreichenden Mengen als Stickstoffquelle in die Zelle zu transportieren. Die Transporter DctA, GltP, DauA, GltIJKL, die für eine Aufnahme von L-Aspartat identifiziert wurden, konnten den Verlust des Transporters DcuA nicht kompensieren und wiesen nur ein sehr schwaches Wachstum auf. Dieser Wachstumsverlust führt des Weiteren zu dem Schluss, dass der ABC Glutamant/Aspartat Transporter GltIJKL ebenfalls nicht signifikant L-Aspartat transportieren kann. Die Aspartataufnahme wurde bisher nur auf Basis von Bindungsstudien postuliert (Willis & Furlong 1975; Kahane *et al.*, 1976). Diese Studien zeigen keinen aktiven Transport von L-Aspartat. Der Transporter DauA kann unter sauren Bedingungen C₄-DC transportieren (Karniou *et al.*, 2013). Ein Transport von L-Aspartat unter neutralen Wachstumsbedingungen konnte nicht gezeigt werden. Die Befunde werden durch diese Wachstumsexperimente bestätigt. DctA kann L-Aspartat in kleinen Mengen transportieren (Kay & Kornberg 1969; 1971). Die Hauptsubstrate für DctA sind Succinat, Fumarat und L-Malat. Unter Wachstumsbedingungen in denen L-Aspartat als Stickstoffquelle dient, ist der Transport von L-Aspartat über DctA nicht ausreichend. DctA wird bevorzugt unter aeroben Bedingungen, in Komplexmedien und in der späten exponentiellen Phase exprimiert (Golby *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 1999). Steht L-Aspartat neben Glycerin in größeren Mengen als Energie und Kohlenstoffquelle zur Verfügung, kann dieses über DctA metabolisiert werden. Somit ist DcuA der Haupttransporter von L-Aspartat als Stickstoffquelle in Minimalmedien. DctA, sowie weitere mögliche Aspartattransporter spielen nur eine geringe Rolle. Diese sind nicht ausreichend für die Verwertung von L-Aspartat während dem schnellen aeroben Wachstum von *E. coli*.

6.2.2. Der $[N]$ -shuttle von DcuA

DcuA ist ein homologes Protein zum anaeroben Transporter DcuB und gehört zu der DcuAB Familie (Golby *et al.*, 1998). Beide Transporter sind unter anaeroben Bedingungen während der Fumaratatmung in der Lage neben Symport auch Antiport und Export zu betreiben (Engel *et al.*, 1992;1994). Ein Antiport von DcuA wurde erstmals in dieser Arbeit an der Aufnahme von L-Aspartat gegenüber dem Export von Fumarat gezeigt. Die Überstandsmessungen sowie Transportmessungen mit radioaktiv markierten Substraten zeigen einen deutlichen Antiport von L-Aspartat im Austausch zu Fumarat in äquimolaren Mengen, während dem Wachstum auf L-Aspartat als einzige Stickstoffquelle und Glycerin als Energie- und Kohlenstoffquelle. Der Grund für diesen Antiport besteht in der Verwendung des L-Aspartats im $[N]$ -shuttle als Stickstoffquelle nach der Desaminierung durch die Aspartase AspA. Das hierbei katalysierte NH_3 kann für den Anabolismus verwendet werden, wohingegen das entstandene Fumarat exportiert wird (Abb. 30).

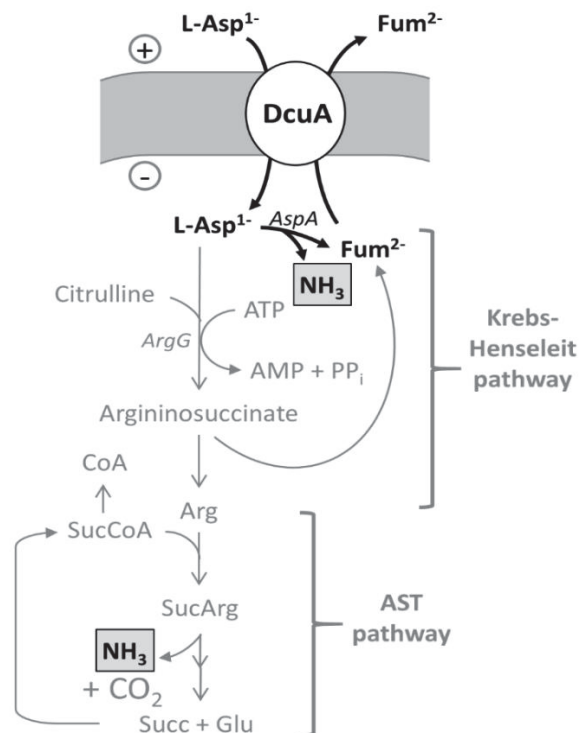


Abb. 30: Funktion von DcuA im aeroben Transport. Der Hauptstoffwechselweg von L-Aspartat unter aeroben Bedingungen wird durch schwarze Pfeile veranschaulicht. Der Neben-Stoffwechselweg ist in grau dargestellt. Der Antiport von L-Aspartat gegen Fumarat führt über die Desaminierung durch die Aspartase AspA zur Aufnahme von NH_3 bei zeitgleichem Export von Fumarat. In einem Nebenstoffwechselweg wird ein kleiner Teil von L-Aspartat über den Krebs-Henseleit- und den AST-Weg ebenfalls zu Fumarat und NH_3 verwertet.

Die Aspartase AspA spielt eine wichtige Rolle im *[N]-shuttle*. Deletionsmutanten von *aspA* zeigten eine deutliche Wachstumsreduktion, jedoch keinen kompletten Wachstumsverlust. Über einen zweiten bereits zuvor untersuchten Nebenstoffwechselweg kann ein kleiner Teil L-Aspartat über den Krebs-Henseleit und AST-Weg metabolisiert werden (Shaibe *et al.*, 1985; Goux *et al.*, 1995). Dabei entstehen über die Intermediate Arginin und Argininosuccinat ebenfalls die Produkte NH_3 und Fumarat, welches wiederum über DcuA aus der Zelle exportiert wird. Die Gene für diesen Nebenweg werden insbesondere erst in der späten exponentiellen Phase exprimiert (Sanchuki *et al.*, 2017). In beiden Stoffwechselwegen dient somit DcuA als *[N]-shuttle* in *E. coli* sowohl über die Desaminierung mit AspA als auch über den Krebs-Henseleit/AST-Weg.

6.3. Die unterschiedlichen Funktionen der homologen Transporter

DcuA und DcuB

Die C₄-DC-Transporter DcuA und DcuB gehören zur DcuAB Familie und können neben Symport und Antiport auch Export von C₄-DC betreiben (Engel *et al.*, 1992; 1994; Six *et al.*, 1994). Ihre Sequenzidentität liegt bei 37 %, wohingegen die Ähnlichkeit, d.h. die Summe identischer und isofunktioneller Aminosäuren, bei 58% liegt (Abb. 31A). Werden beide Sequenzen mittels des Strukturvorhersagetools I-TASSER miteinander verglichen, so erhält man aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von DcuA zu DcuB zwei homologe Strukturmodelle mit je 12 vorhergesagten Helices, basierend auf der Kristallstruktur des Transporters YdaH aus *Alcanivorax borkumensis* mit einer Sequenzidentität von 20 bzw. 22%. Untersuchungen von Golby *et al.* (1998) und Bauer *et al.* (2011) zeigten jedoch Unterschiede in der Topologie und Anzahl der TM-Helices. Für den Transporter DcuA werden 10 Transmembranhelices ermittelt, für DcuB 12 Helices (Abb. 31B). Trotz einer großen Sequenzähnlichkeit liegen DcuA und DcuB offensichtlich in unterschiedlichen Topologien vor.

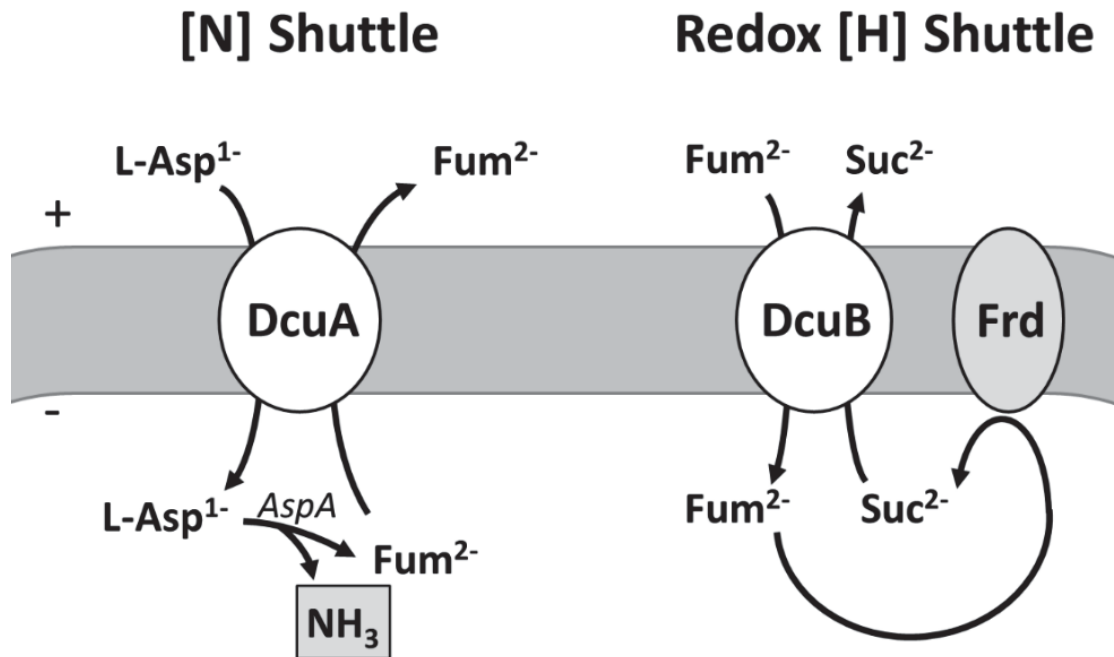


Abb. 32: Funktionsweise der homologen Transporter DcuA und DcuB. DcuA dient unter aeroben Wachstumsbedingungen als *[N]-shuttle*. L-Aspartat wird über die Aspartase AspA desaminiert. Dabei entsteht Ammoniak sowie Fumarat, welches über DcuA wieder exportiert wird. DcuB wirkt unter anaeroben Wachstumsbedingungen als *Redox-[H]-shuttle*. C₄-DC werden elektronenneutral über einen Antiport gegen Succinat transportiert. Succinat kann unter anaeroben Bedingungen nicht weiter verwertet werden und muss exportiert werden.

[N]-shuttle oder *Redox-[H]-shuttle* sind für Eukaryonten aber auch für Prokaryonten bekannt. Der Malat/Aspartat-*shuttle* aus Mitochondrien dient als ein *Redox-shuttle* für den Transfer von zwei [H] aus dem Zytosol in die mitochondriale Matrix (Nelson & Cox, 2005). Dabei besteht der *Redox-shuttle* aus zwei getrennten Antiporter (Malat/ α -Ketoglutarat Antiporter und Aspartat/Glutamat Antiporter), die einerseits L-Malat sowie α -Ketoglutarat und andererseits Glutamat und L-Aspartat im Antiport transportieren. Der Transport ist dabei an die Redoxreaktionen des Zytosols und der mitochondrialen Matrix gekoppelt (Abb. 33A).

Ein Beispiel für einen *[N]-shuttle* ist in der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien zu finden (Abb. 33B). Die Pflanze stellt C₄-DC in Form von L-Malat oder Succinat zur Verfügung (Ronson *et al.* 1984; Mitsch *et al.* 2017), wohingegen der Stickstoff durch die Rhizobien in Form von Ammoniak, L-Aspartat oder Alanin angeboten wird (Kahn *et al.* 1995; Prell & Poole 2006; Dunn 2015).

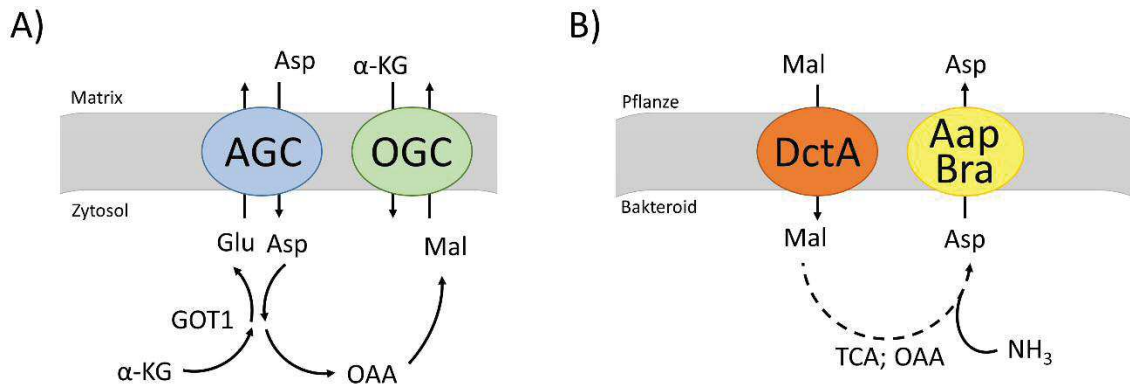


Abb. 33: Schematische Darstellung des *Redox-[H]-Shuttle* aus Mitochondrien (A) und des *[N]-shuttle* zwischen Leguminosen und Rhizobien. Der *Redox-[H]-shuttle* erfolgt über den Antiporter von Malat gegen Aspartat über die zwei Antiporter AGC und OGC (A). Die Stoffwechselwege sind im Zytosol durch Pfeile dargestellt. Der *[N]-shuttle* in der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien erfolgt durch die Aufnahme von C₄-DC aus der Pflanze durch DctA. Stickstoff wird durch die Transporter Aap/Bra und durch die Stickstofffixierung der Rhizobien für die Pflanze zur Verfügung gestellt (B). AGC: Aspartat/Glutamat Antiporter; OGC: Malat/α-Ketoglutarat Antiporter; Aap/Bra: Aminosäuretransporter Asp: Aspartat; Glu: Glutamat; α-KG: α-Ketoglutarat; OAA: Oxalacetat; Cit: Citrat.

Im Gegensatz zu DcuA aus *Escherichia coli* setzt sich hier ein möglicher *shuttle* aus zwei Transporter zusammen. Während die C₄-DC durch einen DctA homologen Transporter in die Zelle aufgenommen werden, erfolgt ein Export der Aminosäure für die Pflanzen über die Exporter Aap/Bra. Dieser Transport spielt wahrscheinlich eine essentielle Rolle in der stickstoff-fixierenden Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien (Hosie *et al.*, 2002; Walshaw & Poole, 1996; Ludwig *et al.*, 2003; Dunn, 2015). Die Kombination zwischen der Aufnahme von C₄-DC in den Bakterioden und dem Export von Aminosäuren aus dem Bakterium in die Pflanze stellt in der Bilanz einen *[N]-shuttle* (Mal/Asp) dar (Abb. 33B), dessen biochemische Details für den Export von Aspartat aber noch weitgehend unbekannt sind.

6.4. Das Dcu-Interaktom von *Escherichia coli*

6.4.1. Validierung des Complexome Profiling für Membranproteine von *E. coli*

Proteininteraktionen bilden eine essentielle Grundlage für verschiedene Prozesse in allen Organismen. Etablierte Methoden zur Untersuchung von Proteininteraktionen sind das *Bacterial Two Hybrid System* (BACTH), das *Strep Protein Interaction Experiment* (SPINE), die Förster-Resonanzenergietransfer Methode (FRET), die Gelfiltration, die

Ko-Immunopräzipitation oder die chemische Vernetzung mit Crosslinkern. Diese Methoden ermöglichen die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion *in vivo* und *in vitro*. Eine neue Methode, zur Analyse von Proteinkomplexen, ist das Complexome Profiling. Diese Methode verzichtet auf Vorkenntnisse über Proteine und deren Funktion. Beim Complexome Profiling wird ein komplexes Proteingemisch analysiert (Heide *et al.*, 2012). Mit Hilfe der Blau-Nativen-Elektrophorese werden Proteinkomplexe im nativen Zustand anhand ihrer Größe aufgetrennt und die Proteinzusammensetzung einzelner Fraktionen durch Massenspektrometrie bestimmt (Wessels *et al.*, 2009). Aufgrund verschiedener Größen und Ladungen der Proteine kann für jedes Protein ein Migrationsprofil erstellt und mit anderen verglichen werden. Proteine, die während der Auftrennung zusammen in einem Komplex vorliegen, weisen ähnliche Migrationsprofile auf. Diese analogen Profile können im Anschluss mittels agglomerativer Clusteranalyse zusammengruppiert werden (Heide *et al.*, 2012).

Die Untersuchung bereits bekannter Komplexe aus der Atmungskette von *E. coli* sollte die Methode des Complexome Profiling an Membranproteinen validieren. Dazu wurde ein Set mit fünf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen gewählt, die einen großen Teil der Stoffwechselwege und deren Enzymkomplexe abdecken. In den Clusteranalysen wurden die Proteine anhand ihrer *Unique Peptides* identifiziert. Die Proteine aus den jeweiligen respiratorischen Proteinkomplexen wurden weitgehend zu einem Komplex gruppiert. Einige Proteinkomplexe wurden jedoch nicht vollständig zusammengefasst. So wurden die Untereinheiten der NADH-Chinon-Oxidoreduktase in den Subkomplexen NuoAHKLN, NuoBCDI und NuoEFG (Abb. 34) vorgefunden. Der Subkomplex NuoAHKLN wies einen gemeinsamen Peak im Bereich von 530 kDa auf. Diese Masse entspricht dem Wert des Gesamtzymkomplexes der NADH-Chinon-Oxidoreduktase (Friedrich T., 2001). Die Untereinheiten liegen somit vorwiegend im Gesamtkomplex vor. Des Weiteren ist ein kleinerer Gipfel bei 170 kDa zu erkennen, der einer Masse eines Subkomplexes NuoAHKLN entspricht. Daraus lässt sich vermuten, dass sich Proteinkomplexe bei der Isolation oder bei der Auftrennung der Membranproteine teilweise auflösen, aber in stabileren Subkomplexen weiterhin assoziiert vorliegen. Eine Bildung von Subkomplexen konnte für weitere Proteinkomplexe nachgewiesen werden (Abb. 34)

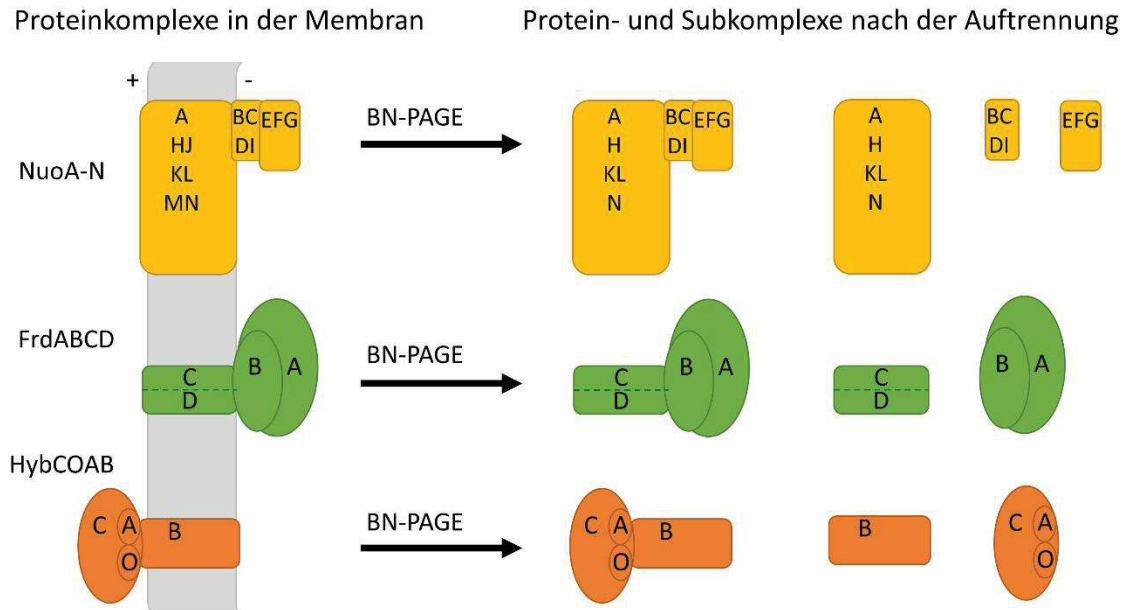


Abb. 34: Bildung von Subkomplexen infolge der BN-PAGE in Proteinkomplexen aus der Atmungskette von *E. coli*. Die Enzymkomplexe NuoA-N, FrdABCD und HybCOAB sind in der Membran schematisch dargestellt. Nach der Auftrennung durch die BN-PAGE liegen die Proteine entweder in einem vollständigen Proteinkomplex vor oder lösen sich auf und wandern gemeinsam im Gel in kleinen Subkomplexen.

Zur Isolation der Membranproteine wurde das Detergens Digitonin verwendet, welches im Gegensatz zu Dodecylmaltosid (DDM) und Triton X-100 besonders zur Isolierung von labilen Membrankomplexen geeignet ist, bisher aber vor allem für Mitochondrien getestet und eingesetzt wurde (Schägger & Pfeiffer, 2001). Ein möglicher Grund für das Aufspalten des Nuo-Komplexes in die hydrophilen und membranständigen Subkomplexe könnte die geringe Stabilität bakterieller Enzymkomplexe in Digitonin sein. Ein weiterer Grund für das Aufspalten von Enzymkomplexen könnte die Behandlung der Proben mit Coomassie Blau gewesen sein. Coomassie Blau bildet mit Detergentien anionische Mischmizellen. Diese Mischmizellen können labile Untereinheiten von den Proteinkomplexen ablösen (Wittig, 2006). Eine alternative Methode ohne Coomassie stellt die *clear-native*-PAGE (CN-PAGE) dar. Dabei werden saure, wasserlösliche Proteine und Membranproteine mit einem isoelektrischen Punkt größer als 7 getrennt, jedoch mit Einschränkungen in der Auflösung (Wittig, 2006).

6.4.2. Protein-Interaktionen aus dem Dcu-Interaktom können nur teilweise verifiziert werden

Die Validierung des Complexome Profilings erfolgte darüber hinaus ebenfalls an bereits bekannten Interaktionen von Proteinen des C₄-DC-Stoffwechsels. Die Interaktion zwischen DctA sowie DcuB mit dem Sensor DcuS wurde bereits durch BACTH-Experimente sowie durch mSPINE, FRET und Fluoreszenzmikroskopie gezeigt (Witan *et al.*, 2012; Scheut *et al.*, 2014; Wörner *et al.*, 2016). Des Weiteren besteht ein funktioneller Zusammenhang: Die Funktion von DcuS wird durch DcuB und DctA beeinflusst. Die Deletion der Transporter überführt DcuS in den konstitutiv aktiven Zustand (Klee-*feld et al.*, 2009; Witan *et al.*, 2012; Steinmetz *et al.*, 2014). Eine weitere Interaktion besteht zwischen DctA und DauA. Eine direkte Interaktion zwischen dem Transporter DauA und dem ZKS DcuS-DcuR konnte durch BACTH und Ko-Immunopräzipitation gezeigt werden. Zusätzlich wird die Transkription von *dctA* in Abwesenheit von DauA negativ beeinflusst (Karinou *et al.*, 2013; Karinou *et al.*, 2017). Somit wird ein größerer Komplex, bestehend aus DauA/DctA/DcuS/DcuR postuliert (Scheu *et al.*, 2014; Steinmetz, 2014; Karinou *et al.*, 2017). Die Interaktion zwischen DcuS/DcuR/DctA und DauA konnte im Complexome Profiling nicht verifiziert werden. Vermutlich ist der Komplex in Digitonin/Coomassie nicht stabil. Die Migrationsprofile von DcuS, DcuR und den Transportern wiesen keine Ähnlichkeit auf.

Die Transporter DctA und DauA laufen in der BN-PAGE gemeinsam mit einem gemeinsamen Gipfel bei 170 kDa. Ebenso sind gemeinsame Migrationsprofile im Hochmolekularen vorhanden. Dies ist ein Hinweis für eine Interaktion zwischen DctA und DauA. Die Masse der Monomere von DctA und DauA ist 50,3 kDa bzw. 59,4 kDa. Das apparente Laufverhalten von DctA und DauA in der SDS-PAGE entspricht Proteinen von 37 kDa bzw. 40 kDa (Steinmetz, 2014; Zeltner, 2017; Karinou *et al.*, 2017). Der Glt-Transporter aus *Pyrococcus horikoshii* gehört zur gleichen Familie wie DctA und liegt als Trimer vor (Boudker *et al.*, 2007). Der Gipfel bei 170 kDa entspricht rechnerisch einem Komplex aus trimeren DctA₃ mit monomerem oder dimeren DauA₂.

6.4.3. Indizien einer Protein-Interaktion der C₄-DC-Transporter DcuA, DcuB & DcuC

Die Analyse der Membranproteine mit Hilfe des Complexome Profilings ergab ähnliche Migrationsprofile für die anaeroben Transporter DcuA, DcuB und DcuC. DcuA und

DcuB sind für die Aufnahme von L-Malat, L-Aspartat und Fumarat unter anaeroben Bedingungen zuständig.

Die Profile der Transporter DcuA, DcuB und DcuC besitzen bei gleichzeitiger Expression einen Gipfel auf ähnlicher, jedoch nicht gleicher Höhe bei 120 kDa und weisen einen gemeinsamen Verlauf mit 7 weiteren gemeinsamen Maxima auf. Die Masse von DcuA, DcuB und DcuC beträgt 45,8 kDa, 47,9 kDa und 48,4 kDa. Ein Gipfel für Monomere ist nicht zu erkennen. Der Gipfel bei 120 kDa könnte auf Di- oder Trimere der Transporter deuten (DcuA₃, DcuB₃, DcuC₃). Unter aeroben Bedingungen, in Abwesenheit von DcuB, weist DcuA ein abweichendes Laufverhalten auf. Der Einfluss der Transporter sowie eine Bildung von Mischtrimeren (z.B. DcuA₂B, DcuB₂A) ist denkbar. Weitere Gipfel, welche ausschließlich unter anaeroben Testbedingungen vorgefunden wurden, könnten auf eine Zusammenlagerung der Di- oder Trimere deuten oder auf einen größeren Komplex mit dem ZKS DcuS-DcuR.

Das Programm STRING (Szklarczyk *et al.*, 2016) versucht Protein-Interaktionen bioinformatisch auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten interagierenden Proteinen vorherzusagen. Aufgrund fehlender interagierender Referenzproteine für die Dcu-Transporter ist das Programm für diese Transporter nicht einsetzbar.

6.4.4. Verifizierung der Interaktion zwischen DcuA, DcuB und DcuC

Eine mögliche Interaktion zwischen DcuA, DcuB und DcuC wurde *in vivo* durch BACTH und mSPINE überprüft. Das BACTH beruht auf der funktionalen Rekonstruktion der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* in dem Adenylatcyclase-negativen Stamm BTH101. Ein wichtiges Kriterium dabei ist die cytoplasmatische Lokalisation der T25- und T18-Domänen. Die Transporter DcuA und DcuB besitzen ausschließlich periplasmatische Enden (Golby *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2011). Da für den Transporter DcuC kein experimentell bewiesenes Topologiemodell vorliegt, wurde eine computer-gestützte Topologie für DcuC verwendet, welche ebenfalls periplasmatische N- und C-terminale Enden vorhersagt. Die Topologie der Transporter machte die Konstruktion von Sandwich-Konstrukten notwendig, bei denen das Fragment T18 oder T25 in eine cytoplasmatische Schleife der Dcu-Proteine integriert wird. BACTH-Studien aus früheren Sandwich-Konstrukten zeigten eine Interaktion von DcuB mit DcuS (Witan, 2012). Die Sandwichkonstrukte von DcuA und DcuC wurden analog zu dem von DcuB erstellt (Witan, 2012). Unter anaeroben Bedingungen wurden so Interaktionen zwischen DcuA-

DcuB, DcuA-DcuC und DcuB-DcuC gezeigt. Fumarat oder L-Aspartat verstärkten die Interaktion. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Interaktion spezifisch ist.

Während den mSPINE Experimenten mit den Transportern DcuA, DcuB und DcuC konnte eine Koelution und eine Detektion der Interaktionspartner in allen möglichen Kombinationen unter anaeroben Bedingungen identifiziert werden (Ergebnisse 5.4.6, Abb. 24, Anhang 10.2.6, Abb. 43). Diese war jedoch von der Quervernetzung der Proteine mit Formaldehyd abhängig. Der Komplex war nur nach Aufkonzentrieren und in niedriger Ausbeute nachweisbar.

Die Interaktion zwischen DcuA, DcuB, und DcuC war demnach *in vivo* nur in geringem Umfang mit mSPINE erkennbar. Der BACTH-Test musste mit nicht funktionalen Sandwich-Konstrukten durchgeführt werden. Eine Koelution der Proteine im mSPINE war nur nach Quervernetzen und Konzentration möglich. Zur Bestätigung einer Interaktion wurde versucht eine Funktion für die Interaktion der Transporter zu ermitteln.

6.4.5. Die Transporter DcuA, DcuB und DcuC bilden keinen funktionellen Komplex aus

In *Escherichia coli* sind funktionelle Komplexe innerhalb des C₄-DC-Stoffwechselsystems mit Protein-Protein-Interaktionen gut untersucht (Kleefeld *et al.*, 2009; Witan *et al.*, 2012; Wörner *et al.*, 2016; Karinou *et al.*, 2017).

Eine gegenseitige Beeinflussung des Transports durch die Interaktion der Transporter wurde mit Hilfe von radioaktiven Transportmessungen für das Paar DcuA/DcuB untersucht. Dabei wurde der Transporter DcuC zum Ausschluss einer Interferenz in dem Stamm IMW374 deletiert. Als spezifische Transportaktivität wurde die Aufnahme von L-Aspartat gemessen, welches unter den getesteten Bedingungen relativ spezifisch durch DcuA aufgenommen wird (Strecker *et al.*, 2018). Die Transportmessungen zeigen keinen relevanten Unterschied in der Aufnahme von L-Aspartat durch DcuA, unabhängig davon ob DcuB, eine inaktive DcuB-Variante oder kein DcuB anwesend war. Ein Einfluss von DcuB auf DcuA ist deshalb in der Funktion nicht ersichtlich.

Wird DcuA plasmidkodiert eingebracht, ist ein Unterschied in der Aufnahme von L-Aspartat zu erkennen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten expressionsbedingt erklärt werden. Die Anzahl an DcuA Molekülen in der Zelle erfährt im Gegensatz zu DcuB unter induzierenden Bedingungen keinen nennenswerten Anstieg (Wörner *et al.*, 2018). Wird jedoch plasmidkodiertes DcuA eingebracht, verändert sich das Verhältnis

zwischen DcuA und DcuB. Dieser Effekt tritt mit chromosomal kodiertem DcuA nicht auf, da die Menge unter anaeroben Bedingungen zwischen nicht induzierenden und induzierenden Bedingungen nicht stark schwankt (Wörner *et al.*, 2018). Somit liegt die Betrachtung chromosomal exprimierten DcuA näher am eigentlichen System.

Zusammenfassend ist eine Interaktion zwischen DcuA, DcuB und DcuC detektierbar. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Interaktion um Artefakte handeln könnte. Solche sind gerade bei der Untersuchung von Membranproteinen nicht auszuschließen. Im Funktionstest ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine funktionelle Beeinflussung von DcuA durch DcuB. Somit ergibt sich folgendes Bild für das C₄-DC Interaktom aus *Escherichia coli* (Abb. 35).

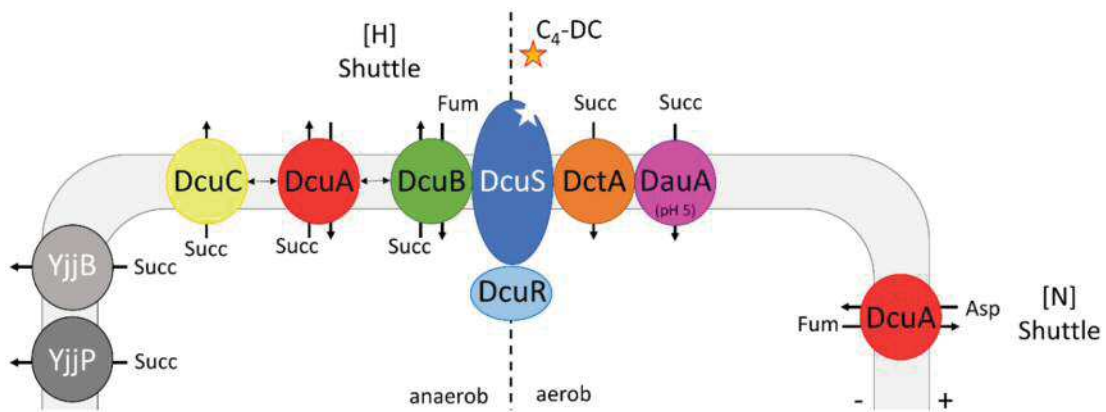


Abb. 35: Schematische Darstellung der Transporter und des DcuS-DcuR ZKS aus dem C₄-DC-Metabolismus. DctA und DcuB versetzen, durch direkte Interaktion mit dem Sensor DcuS, diesen in einen responsiven Zustand. DauA beeinflusst durch direkte Interaktion die Expression von DctA. Die Transportmodi werden durch die Pfeile dargestellt. Die Pfeile zwischen den anaeroben Transporter DcuA, DcuB, und DcuC veranschaulichen die untersuchten Interaktionen. DcuA dient aerob als [N]-shuttle. DcuA und DcuB dienen unter anaeroben Bedingungen als Redox-[H]-shuttle. YjjB/P werden als weitere Succinatexporter postuliert (Fukui *et al.*, 2017).

Unter aeroben Bedingungen bildet sich ein Komplex aus DcuS und den aeroben Transporter DctA und DauA. DauA reguliert die Expression von DctA, während dieser den Sensor in einen responsiven Zustand versetzt. Unter anaeroben Bedingungen interagiert DcuB mit DcuS und versetzt diesen in einen responsiven Zustand. DcuA und DcuC sind in der Lage den Verlust des Transporters DcuB, nicht jedoch seine regulatorische Funktion, zu kompensieren. Die Dcu-Transporter können unter anaeroben Bedingungen interagieren. Diese Interaktion ist aber vermutlich schwach und ohne funktionelle Bedeutung.

7. Ausblick

7.1. Die Signaltransduktion in DcuS über PAS_C

Die Analysen von Monzel *et al.*, 2013 und die Ergebnisse dieser Arbeit geben deutliche Hinweise auf strukturelle Veränderungen in der PAS_C-Domäne während der Signaltransduktion. Interessant sind weitere HDX-MS-Messungen, um strukturelle Veränderungen weiterer ON-Varianten des gleichen Typs IIa oder eines weiteren Typs zu untersuchen. Eine alternative Methode wäre das *site directed spin labeling* (SDSL) in Kombination mit *electron paramagnetic resonance* (EPR). In EPR-Messungen ist es möglich die Abstände in einem Dimer zwischen zwei Cysteinresten zu detektieren und diese unter zwei verschiedenen Funktionszuständen zu vergleichen. Durch die Mutation zu Cystein an unterschiedlichen Positionen ist es somit möglich die Strukturveränderungen während der Signaltransduktion zu untersuchen.

7.2. DcuA als [N]-shuttle unter aeroben Bedingungen

E. coli ist in der Lage L-Aspartat über DcuA mit Hilfe eines Antiports mit Fumarat als Stickstoffquelle zu nutzen. In Anwesenheit von besser verwertbaren Stickstoffquellen wurde jedoch weniger L-Aspartat während dem Wachstum verwertet und nahezu die Ausgangsmenge an L-Aspartat konnte im Überstand enzymatisch bestimmt werden. Da DcuA konstitutiv sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen exprimiert wird und der Transport unabhängig von der Stickstoffquelle gemessen werden konnte, besteht die Möglichkeit einer post-transkriptionellen Regulation auf Proteinebene. Interaktionen im Stickstoff-Netzwerk konnten bereits für die Proteine NtrB, AspA sowie den Regulatoren GlnK und PII-1 gezeigt werden (Salinas & Contreras, 2003). Weitere Interaktionen oder beteiligte Regulatoren könnten durch etablierte Untersuchungen identifiziert werden.

8. Acknowledgements

Ich danke Prof. [REDACTED] und seiner Arbeitsgruppe Molecular Physiology of Microbes am LOEWE Center for Synthetic Microbiology (Synmikro) & Dept. of Chemistry an der Philipps-University Marburg für die Kooperation zur Signaltransduktion von DcuS.

Mein besonderer Dank gilt in dieser Kooperation Dr. [REDACTED] für die Probenvorbereitung, die Durchführung der HDX-MS Experimente sowie Bearbeitung/Bereitstellung der Datensätze. In diesem Zusammenhang möchte ich ebenfalls der DFG für die Bereitstellung der „Marburg core facility for interactions, dynamics and macromolecular assembly structure“ danken.

[REDACTED] und seiner AG von der Universität Strathclyde in Glasgow möchte ich für die gute Zusammenarbeit an der Veröffentlichung „The *E. coli* dicarboxylic acid transporter DauA acts as a signal transducer by interacting with the DctA uptake system.“ danken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. [REDACTED] und ihrer Arbeitsgruppe Functional Proteomics, SFB 815 Core Unit an der Goethe Universität in Frankfurt für die Zusammenarbeit. Ich möchte mich bei Ihr für die Bereitstellung der Datensätze und für die Einführung in das Complexome Profiling bedanken. Dr. [REDACTED] aus der Molekularen Bioinformatik in Frankfurt möchte ich für die Bereitstellung seines Programms NOVA bedanken.

Frau [REDACTED] aus der AG Uden am Institut für molekulare Physiologie, Abt. Mikrobiologie und Weinforschung an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz möchte ich einen großen Dank aussprechen. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit an der Veröffentlichung „DcuA of aerobically grown *Escherichia coli* serves as a nitrogen shuttle (L aspartate/fumarate) for nitrogen uptake“. Vielen Dank insbesondere für die Einführung und Durchführung der radioaktiven Transportmessungen.

9. 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*, 186(6), 1879-1889.

Appleman, J. A., & Stewart, V. (2003). Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *Journal of bacteriology*, 185(1), 89-97.

Aravind, L., & Ponting, C. P. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signaling proteins. *FEMS microbiology letters*, 176(1), 111-116.

Baker, K. E., Ditullio, K. P., Neuhard, J., & Kelln, R. A. (1996). Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by *dctA*. *Journal of bacteriology*, 178(24), 7099-7105.

Barth, C. M. (2018). Phylogenie von [FeS]-haltigen O₂-Sensoren und Interaktion des O₂-Sensors NreB mit dem Nitratsensor NreA aus *Staphylococcus carnosus*. (Doctoral dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Bauer, J., Fritsch, M.J., Palmer, T., and Unden, G. (2011). Topology and Accessibility of the Transmembrane Helices and the Sensory Site in the Bifunctional Transporter DcuB of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 50: 5925–5938.

Berntsson, O., Diensthuber, R. P., Panman, M. R., Björling, A., Gustavsson, E., Hoernke, M., ... & Ihalainen, J. A. (2017). Sequential conformational transitions and α -helical supercoiling regulate a sensor histidine kinase. *Nature communications*, 8(1), 284.

Bhate, M. P., Molnar, K. S., Goulian, M., & DeGrado, W. F. (2015). Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure*, 23(6), 981-994.

- Boudker, O., Ryan, R. M., Yernool, D., Shimamoto, K., & Gouaux, E. (2007). Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature*, *445*(7126), 387.
- Bueno, Emilio, S. Mesa, E. J. Bedmar, D. J. Richardson und M. J. Delgado (2012) Bacterial Adaptation of Respiration from Oxidic to Microoxidic and Anoxic Conditions: Redox Control. *Antioxidants & Redox Signaling*, *16*(8):819–852.
- Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J. L., & Krell, T. (2007). Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34), 13774-13779.
- Busenlehner, L. S., Salomonsson, L., Brzezinski, P., & Armstrong, R. N. (2006). Mapping protein dynamics in catalytic intermediates of the redox-driven proton pump cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15398-15403.
- Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, *139*(2), 325-336.
- Casino, P., Miguel-Romero, L., & Marina, A. (2014). Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nature communications*, *5*, 3258.
- Chervitz, S. A., & Falke, J. J. (1996). Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(6), 2545-2550.
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2008). Crystal structures of C₄-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 30256-30265.
- Cock, P. J., & Whitworth, D. E. (2007). Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions. *Molecular biology and evolution*, *24*(11), 2355-2357.

Dago, A. E., Schug, A., Procaccini, A., Hoch, J. A., Weigt, M., & Szurmant, H. (2012). Structural basis of histidine kinase autophosphorylation deduced by integrating genomics, molecular dynamics, and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1733-E1742.

Davies, S.J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S.A., Harrington, V.L., Guest, J.R., Kelly, D.J., and Andrews, S.C. (1999) Inactivation and Regulation of the Aerobic C₄-Dicarboxylate Transport (*dctA*) Gene of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181: 5624–5635.

Dunn, M. F. (2015). Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Critical reviews in microbiology*, 41(4), 411-451.

Engel, P., Krämer, R., & Uden, G. (1992). Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. *Journal of bacteriology*, 174(17), 5533-5539.

Engel, P., Krämer, R., and Uden, G. (1994) Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. *European Journal of Biochemistry*, 222: 605–614.

Escherich, T. (1886). Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. F. Enke.

Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünnwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., ... & Baldus, M. (2008). Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nature structural & molecular biology*, 15(10), 1031.

Friedrich, T., Steinmüller, K., & Weiss, H. (1995). The proton pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS letters*, 367(2), 107-111.

Friedrich, T., & Scheide, D. (2000). The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane bound multisubunit hydrogenases. *FEBS letters*, 479(1-2), 1-5.

Fukui, K., Nanatani, K., Hara, Y., Yamakami, S., Yahagi, D., Chinen, A., ... & Abe, K. (2017). *Escherichia coli yjjPB* genes encode a succinate transporter important for succinate production. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(9), 1837-1844.

Furuyoshi, S., Nawa, Y., Kawabata, N., Tanaka, H., & Soda, K. (1991). Purification and Characterization of a New NAD⁺-Dependent Enzyme, L-Tartrate Decarboxylase, from *Pseudomonas* sp. Group Ve-2. *The Journal of Biochemistry*, 110(4), 520-525.

Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., & Koonin, E. V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS microbiology letters*, 203(1), 11-21.

Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, 63, 133-154.

Geromanos, S. J., Vissers, J. P., Silva, J. C., Dorschel, C. A., Li, G. Z., Gorenstein, M. V., ... & Langridge, J. I. (2009). The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC MS with data dependant LC MS/MS. *Proteomics*, 9(6), 1683-1695.

Golby, P., Kelly, D.J., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1998) Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180: 6586–6596.

Golby P, Kelly DJ, Guest JR, Andrews SC. (1998) Topological Analysis of DcuA, an Anaerobic C₄-Dicarboxylate Transporter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(18):4821-4827.

- Goux, W. J., Strong, A. A., Schneider, B. L., Lee, W. N. P., & Reitzer, L. J. (1995). Utilization of aspartate as a nitrogen source in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 270, 638-646.
- Graf, S. (2013). Bindeprotein-abhängige DctS-Sensorkinasen aus *Bacillus subtilis* und *Geobacillus kaustophilus* (Doctoral dissertation). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Guest J. R. (1979) Anaerobic growth of *Escherichia coli* K12 with fumarate as terminal electron acceptor. Genetic studies with menaquinone and fluoroacetate-resistant mutants. *J Gen Microbiol.*, 115: 259–271.
- Gunsalus, R. P. (1992). Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *Journal of bacteriology*, 174(22), 7069.
- Gutowski, S. J., & Rosenberg, H. (1975). Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12. *Biochemical Journal*, 152(3), 647-654.
- Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Dröse, S., Schwamb, B., ... & Brandt, U. (2012). Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell metabolism*, 16(4), 538-549.
- Hosie, A. H., Allaway, D., Galloway, C. S., Dunsby, H. A., & Poole, P. S. (2002). *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *Journal of Bacteriology*, 184(15), 4071-4080.
- Iuchi, S.; Lin, E. C. (1992) Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 174 (17), S. 5617–5623.
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J. M., & Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nature Reviews Microbiology*, 1.

- Janausch, I., Zientz, E., Tran, Q., Kröger, A., and Unden, G. (2002a) C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1553: 39–56.
- Jiang, P., & Ninfa, A. J. (1999). Regulation of Autophosphorylation of *Escherichia coli* Nitrogen Regulator II by the PII Signal Transduction Protein. *Journal of bacteriology*, 181(6), 1906-1911.
- Jourlin, C., Bengrine, A., Chippaux, M., & Méjean, V. (1996). An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N oxide in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 20(6), 1297-1306.
- Kahane, S., Marcus, M., Metzger, E., Halpern, Y.S. (1976) Effect of growth conditions on glutamate transport in the wild-type strain and glutamate-utilizing mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 125(3):762-9.
- Karinou, E., Compton, E.L.R., Morel, M., and Javelle, A. (2013) The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C₄-dicarboxylic acid transporter. *Molecular Microbiology*, 87: 623–640.
- Karniel, A., Mrusek, D., Steinchen, W., Dym, O., Bange, G., & Bibi, E. (2018). Co-translational Folding Intermediate Dictates Membrane Targeting of the Signal Recognition Particle Receptor. *Journal of molecular biology*, 430(11), 1607-1620.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123.
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L., & Bott, M. (1999). The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Molecular microbiology*, 33(4), 858-872.
- Kay, W.W., and Kornberg, H.L. (1969) Genetic control of the uptake of C₄ dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 3: 93–96.

Kay, W., and Kornberg, H. (1971) The Uptake of C₄-Dicarboxylic Acids by *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 18: 274–281.

Kim, O.B., Lux, S., and Uden, G. (2007) Anaerobic growth of *Escherichia coli* on d-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the l-tartrate carrier TtdT and l-tartrate dehydratase. *Archives of Microbiology*, 188: 583–589.

Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Kramer, J., and Uden, G. (2009) The Fumarate/Succinate Antiporter DcuB of *Escherichia coli* Is a Bifunctional Protein with Sites for Regulation of DcuS-dependent Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 265–275.

Klein, R. (2018). Dephosphorylierungs- und Interaktionsstudien im NreABC-System von *Staphylococcus carnosus*. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Kneuper, H., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C., & Uden, G. (2005). The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20596-20603.

Kohn, L. D., & Jakoby, W. B. (1968). Tartaric acid metabolism VI. Crystalline oxaloglycolate reductive decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(10), 2486-2493.

Kohn, L. D., Packman, P. M., Allen, R. H., & Jakoby, W. B. (1968). Tartaric acid metabolism V. Crystalline tartrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(10), 2479-2485.

Krämer, Jens (2008) Der C₄-Dicarboxylat- und Citratsensor DcuS aus *Escherichia coli* - Signalerkennung und Regulation. *Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinfor-*
schung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. (urn:nbn:de:hebis:77-16453).

Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M. E., & Ramos, J. L. (2010). Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annual review of microbiology*, *64*, 539-559.

Lee, J., Tomchick, D. R., Brautigam, C. A., Machius, M., Kort, R., Hellingwerf, K. J., & Gardner, K. H. (2008). Changes at the KinA PAS-A dimerization interface influence histidine kinase function. *Biochemistry*, *47*(13), 4051-4064.

Lesne, E., Krammer, E. M., Dupre, E., Loch, C., Lensink, M. F., Antoine, R., & Jacob-Dubuisson, F. (2016). Balance between coiled-coil stability and dynamics regulates activity of BvgS sensor kinase in *Bordetella*. *MBio*, *7*(2), e02089-15.

Lesne, E., Dupré, E., Loch, C., Antoine, R., & Jacob-Dubuisson, F. (2017). Conformational changes of inter-domain linker mediate mechanical signal transmission in sensor-kinase BvgS. *Journal of bacteriology*, JB-00114.

Li, G. Z., Vissers, J. P., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V., & Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, *9*(6), 1696-1719.

Lodwig, E. M., Hosie, A. H., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., ... & Poole, P. S. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Nature*, *422*(6933), 722.

Maloney, P.C., Kashket, E.R., and Wilson, T.H. (1974) A Protonmotive Force Drives ATP Synthesis in Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *71*: 3896–3900.

Marina, A., Waldburger, C. D., & Hendrickson, W. A. (2005). Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine kinase protein. *The EMBO journal*, *24*(24), 4247-4259.

Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006) Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 910–938.

Mechaly, A. E., Sassoon, N., Betton, J. M., & Alzari, P. M. (2014). Segmental helical motions and dynamical asymmetry modulate histidine kinase autophosphorylation. *PLoS biology*, 12(1), e1001776.

Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure*, 17(10), 1282-1294.

Monzel, C., Degreif Dünwald, P., Gröpper, C., Griesinger, C., & Uden, G. (2013). The cytoplasmic PAS_C domain of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction. *MicrobiologyOpen*, 2(6), 912-927.

Monzel, C., & Uden, G. (2015). Transmembrane signaling in the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: A long-range piston-type displacement of transmembrane helix 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 11042-11047.

Moore, J. O., & Hendrickson, W. A. (2009). Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure*, 17(9), 1195-1204.

Müller, V. S., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., & Hunke, S. (2011). Membrane SPINE: An improved method to identify protein–protein interaction partners of membrane proteins *in vivo*. *Proteomics*, 11(10), 2124-2128.

Nadeau, O. W., & Carlson, G. M. (2007). Protein interactions captured by chemical cross-linking: one-step cross-linking with formaldehyde. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(4), pdb-prot4634.

Nelson, L., & Cox, M. (2005). Protein function. *Lehinger Principles of Biochemistry (4th Ed)*, Freeman WH and Company, New York.

Nissle, A. (1916). Über die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora. *Dtsch Med Wochenschr*, 42, 1181-1184.

Peña-Sandoval, G. R., & Georgellis, D. (2010). The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *Journal of bacteriology*, 192(6), 1735-1739.

Rabin, R. S.; Stewart, V. (1993) Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol* 175 (11), S. 3259–3268.

Salinas, P., & Contreras, A. (2003). Identification and analysis of *Escherichia coli* proteins that interact with the histidine kinase NtrB in a yeast two-hybrid system. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(4), 574-581.

Salvi, M., Schomburg, B., Giller, K., Graf, S., Unden, G., Becker, S., ... & 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*, 201620286.

Sambrook, J. und D. W. Russell (1989). Molecular cloning. *A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchuki, H. B., Gravina, F., Rodrigues, T. E., Gerhardt, E. C., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., ... & Huergo, L. F. (2017). Dynamics of the *Escherichia coli* proteome in response to nitrogen starvation and entry into the stationary phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1865(3), 344-352.

Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I–V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37861-37867.

Schäper, S., Steinchen, W., Krol, E., Altegoer, F., Skotnicka, D., Søgaard-Andersen, L., ... & Becker, A. (2017). AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a PilZ-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24), E4822-E4831.

Scheu, P.D., Kim, O.B., Griesinger, C., and Uden, G. (2010) Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C₄-dicarboxylates in bacteria. *Future Microbiology*, 5: 1383–1402.

Scheu, P. D., Liao, Y. F., Bauer, J., Kneuper, H., Basché, T., Uden, G., & Erker, W. (2010). Oligomeric sensor kinase DcuS in the membrane of *Escherichia coli* and in proteoliposomes: chemical cross-linking and FRET spectroscopy. *Journal of bacteriology*, 192(13), 3474-3483.

Scheu, P. D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y. F., Ebert-Jung, A., ... & Uden, G. (2012). CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system *in vivo*. *Journal of bacteriology*, 194(3), 636-645.

Scheu, P. D., Steinmetz, P. A., Dempwolff, F., Graumann, P. L., & Uden, G. (2014). Polar localization of a tripartite complex of the two-component system DcuS/DcuR and the transporter DctA in *Escherichia coli* depends on the sensor kinase DcuS. *PLoS one*, 9(12), e115534.

Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D. R., Herbst-Irmer, R., ... & Becker, S. (2008). A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *Journal of molecular biology*, 377(2), 512-523.

Shaibe, E., Metzger, E., and Halpern, Y.S. (1985) Metabolic pathway for the utilization of L arginine, L ornithine, agmatine, and putrescine as nitrogen sources in *Escherichia coli* K 12. *J Bacteriol* 163: 933–937.

Shaw, D. J.; Guest, J. R. (1982) Amplification and product identification of the *fnr* gene of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol* 128 (10), S. 2221–2228.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Thompson, J. D. (2011). Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.
- Six, S., Andrews, S.C., Uden, G., and Guest, J.R. (1994) *Escherichia coli* Possesses Two Homologous Anaerobic C₄-Dicarboxylate Membrane Transporters (DcuA and DcuB) Distinct from the Aerobic Dicarboxylate Transport System (Dct). *Journal of Bacteriology*, 176: 6470–6478.
- Slavny, P., Little, R., Salinas, P., Clarke, T. A., & Dixon, R. (2010). Quaternary structure changes in a second Per Arnt Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein. *Molecular microbiology*, 75(1), 61-75.
- Spiro, S. und J. R. Guest (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 6(4):399–428.
- Steinchen, W., Schuhmacher, J. S., Altegoer, F., Fage, C. D., Srinivasan, V., Linne, U., ... & Bange, G. (2015). Catalytic mechanism and allosteric regulation of an oligomeric (p) ppGpp synthetase by an alarmone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), 13348-13353.
- Steinmetz, P. A., Wörner, S., & Uden, G. (2014). Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C₄ dicarboxylate sensor. *Molecular microbiology*, 94(1), 218-229.
- Stewart, V. (2003) Biochemical Society Special Lecture. Nitrate- and nitriteresponsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 1):1–10.
- Stewart, R. C. (2010). Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 133-141.

Stock, A., Chen, T., Welsh, D., & Stock, J. (1988). CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(5), 1403-1407.

Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 183-215.

Sutherland, B. W., Toews, J., & Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross linking and mass spectrometry in the study of protein–protein interactions. *Journal of mass spectrometry*, 43(6), 699-715.

Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., ... & Jensen, L. J. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, gkw937.

Szurmant, H., & Hoch, J. A. (2013). Statistical analyses of protein sequence alignments identify structures and mechanisms in signal activation of sensor histidine kinases. *Molecular microbiology*, 87(4), 707-712.

Tran, Q. H., & Unden, G. (1998). Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation. *European journal of biochemistry*, 251(1 2), 538-543.

Ulrich, L. E., & Zhulin, I. B. (2009). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic acids research*, 38, D401-D407.

Unden, G., & Trageser, M. (1991). Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59(2), 65-76.

Unden, G., S. Becker, J. Bongaerts, G. Holighaus, J. Schirawski und S. Six (1995). O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*, 164(2):81–90.

- Uden, G., Strecker, A., Kleefeld, A., & Kim, O. B. (2016). C₄-Dicarboxylate Utilization in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus*, 7(1).
- Wales, T. E., Fadgen, K. E., Gerhardt, G. C., & Engen, J. R. (2008). High-speed and high-resolution UPLC separation at zero degrees Celsius. *Analytical chemistry*, 80(17), 6815-6820.
- Wallace, B. J., & Young, I. G. (1977). Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA*⁻ *menA*⁻ double quinone mutant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 461(1), 84-100.
- Walshaw, D. L., & Poole, P. S. (1996). The general l amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Molecular microbiology*, 21(6), 1239-1252.
- Wang, C., Sang, J., Wang, J., Su, M., Downey, J. S., Wu, Q., ... & Senadheera, D. B. (2013). Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. *PLoS biology*, 11(2), e1001493.
- Wessels H. J. C. T, R. O. Vogel, L. van den Heuvel, J. A. Smeitink, R. J. Rodenburg, L. G. Nijtmans, und M. H. Farhoud (2009) LC-MS/MS as an alternative for SDS-PAGE in blue native analysis of protein complexes. *Proteomics*, 9:4221-4228
- Willis, R.C., & Furlong, C.E. (1975). Purification and properties of a periplasmic glutamate-aspartate binding protein from *Escherichia coli* K12 strain W3092. *J Biol Chem.*,250(7):2574-80.
- Witan, Julian R. (2012) Funktion der C₄-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS in *Escherichia coli*. *Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz*. (urn:nbn:de:hebis:77-31616)
- Witan, J., J. Bauer, I. Wittig, P. A. Steinmetz, W. Erker und G. Uden (2012) Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Molecular Microbiology*, 85(5):846–861.

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.

Wittig, I., H.-P. Braun und H. Schägger (2006) Blue native PAGE, *Nature protocol*, 1: 418–428.

Wörner, S., Strecker, A., Monzel, C., Zeltner, M., Witan, J., Ebert Jung, A., & Uden, G. (2016). Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C₄ dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environmental microbiology*, 18(12), 4920-4930.

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*, 200(4), e00612-17.

Yagi, T., Yano, T., Di Bernardo, S., & Matsuno-Yagi, A. (1998). Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1364(2), 125-133.

Zeltner, M. (2017). Reinigung des C₄-Dicarboxylat-Transporters DctA und dessen regulatorischer Einfluss auf die Aktivität der Sensorkinase DcuS (Doctoral dissertation), Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Zientz, E., Six, S., and Uden, G. (1996) Identification of a Third Secondary Carrier (DcuC) for Anaerobic C₄-Dicarboxylate Transport in *Escherichia coli*: Roles of the Three Dcu Carriers in Uptake and Exchange. *Journal of Bacteriology*, 178: 7241–7247.

Zientz, E., J. Bongaerts und G. Uden (1998) Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 180(20):5421–5425.

10. Anhang

10.1. Anhang zu Material und Methoden

10.1.1. Stämme

Tab. 3: Verwendete Stämme von *E. coli* K12 mit jeweiligem Genotyp

Stamm	Genotyp	Referenz
AN387	Wildtyp	Wallace und Young (1977)
BTH101	F ⁻ <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1</i> (Str ^R), <i>hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Karimova <i>et al.</i> , (2005)
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺, lacIq lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
XL1-Blue	F ⁻ , <i>recA1⁻, (mk⁺, rk⁻) supE44, endA1, thi-1, λ⁻, gyrA96, relA1, (lac⁻) [F⁻, proAB, lacI_q, ZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratgene
BL21DE3	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int:::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	Studier & Moffat (1986)

Tab. 4: Stämme für die Wachstumskomplementation, mSPINE, Transportmessungen und Funktionsuntersuchungen

Plasmid	Genotyp	Referenz
IMW160	P1 (IMW153) x (JRG2814) [<i>dcuC::Tn10, Cam^R</i>]	Zientz (1995)
IMW260	MC4100, aber <i>λ[Φ(<i>dcuB</i>'-'<i>lacZ</i>)hyb, bla+]dcuS::Cam^R</i>	Zientz <i>et al.</i> 1998
IMW505	P1 (IMW157) x IMW504 <i>dcuA::Spec^R; ΔdcuB; dcuC::Cam^R</i>	Kleefeld (2006)

10.1.2. Plasmide

Tab. 5: Plasmide für die Funktionsuntersuchung und Überproduktion der verkürzten DcuS Konstrukte

Plasmid	Genotyp	Referenz
pET28a	Überexpressionsplasmid, His-tag, Kan ^R	Novagen
pMW2600	PASc-Kinase von DcuS in pET28a mit N-terminalem His-Tag zur Überexpression, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2620	pMW2600 mit N304D Substitution, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2629	pMW2600 mit N248D Substitution, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2673	pMW2600 mit L246R Substitution, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2674	pMW2600 mit L228A Substitution, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2675	pMW2600 mit E233G Substitution, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW1075	PASc-Kinase-T25 Expressionsplasmid (DcuS(211-539)),pKNT25-Derivat, Kan ^R	Monzel <i>et al.</i> (2013)
pMW1569	pMW1075, aber PASc-Kinase-T25-L228A, Kan ^R	Monzel <i>et al.</i> (2013)
pMW1571	pMW1075, aber PASc-Kinase-T25-L246R, Kan ^R	Monzel <i>et al.</i> (2013)
pMW1573	pMW1075, aber PASc-Kinase-T25-N248D, Kan ^R	Monzel <i>et al.</i> (2013)
pMW1576	pMW1075, aber PASc-Kinase-T25-N304D, Kan ^R	Monzel (2015)
pMW1579	pMW1075, aber PASc-Kinase-T25-E233G, Kan ^R	Monzel (2015)
pMW2854	PASc+Kin+Linker in pET28a, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2912	pMW2854 aber N248D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2913	pMW2854 aber N304D, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2914	pMW2854 aber L228A, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW2915	pMW2857 aber E233G, Kan ^R	Diese Arbeit

Tab. 6: Plasmide für das BACTH-System

Plasmid	Genotyp	Referenz
pUT18	Plasmid zur Expression von N-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat, Amp ^R	Karimova <i>et al.</i> , (2005)
His6-pUT18	pUT18 mit 6xHis-tag vor MCS, N-terminaler His-tag, Kloniert über HindIII + BamHI, Amp ^R	Monzel (2012)
pUT18C	Plasmid zur Expression von C-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat, Amp ^R	Karimova <i>et al.</i> , (2005)
His6-pUT18C (pMW 2363)	pUT18C mit 6xHis-tag nach MCS, C-terminaler His-tag mittels PCR eingefügt, Amp ^R	Diese Arbeit
pUT18C-zip	T18-Zip Expressionsplasmid, pUT18C-Derivat, Amp ^R	Karimova <i>et al.</i> (2005)
pKNT25	Plasmid zur Expression von N-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, Kan ^R	Karimova <i>et al.</i> (2005)
His6-pKNT25	pKNT25 mit 6xHis-tag vor MCS N-terminaler His-tag, Kloniert über HindIII + BamHI, Kan ^R	Monzel (2012)
pKT25	Plasmid zur Expression von C-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, Kan ^R	Karimova <i>et al.</i> (2005)
His6-pKT25 (pMW 2364)	pKT25 mit 6xHis-tag nach MCS, C-terminaler His-tag mittels PCR eingefügt, Kan ^R	Diese Arbeit
pKT25-Zip	T25-Zip Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan ^R	Karimova <i>et al.</i> (2005)
pMW1028	Expression von DcuB1-211-T25-213-446, His6-pKNT25-Derivat, Kan ^R	Witan (2012)
pMW2369	Expression von DcuA ₁₋₂₀₇ -T18-DcuA ₂₀₈₋₄₃₃ , His6-pUT18 Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2370	Expression von DcuC ₁₋₂₂₉ -T18-DcuC ₂₃₀₋₄₆₁ , His6-pUT18 Derivat, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2375	Expression von DcuA ₁₋₂₀₇ -T25-DcuA ₂₀₈₋₄₃₃ , Diese Arbeit	Diese Arbeit

	His6-pKNT25 Derivat, Kan ^R	
pMW2376	Expression von DcuC ₁₋₂₂₉ -T25-DcuC ₂₃₀₋₄₆₁ , His6-pKNT25 Derivat, Kan ^R	Diese Arbeit
pMW919	Expression von dcuS-T25, pKNT25 Derivat, Kan ^R	Witan (2009)
pMW426	Expression von T25-dcuS, pKT25 Derivat, Kan ^R	Kleefeld (2006)
pMW428	Expression von dcuS-T18, pUT18 Derivat, Amp ^R	Kleefeld (2006)
pMW429	Expression von T18-dcuS, pUT18C Derivat, Amp ^R	Kleefeld (2006)
pMW449	DcuA mit eigenem Promotor aus AN387, Kan ^R	Ackermann (2006)
pMW454	DcuC aus AN387, Kan ^R	Bauer (2006)

Tab. 7: Plasmide für die mSPINE Untersuchungen

Plasmid	Genotyp	Referenz
pASK-IBA3plus	Überexpressionsvektor von IBA für Proteine mit C-terminalem StrepII-Tag, mit AHT induzierbar; Amp ^R	IBA, Göttingen
pASK-IBA13plus	Überexpressionsvektor von IBA für Proteine mit N-terminalem StrepII-Tag, mit AHT induzierbar, Strep-tag mit Thrombin abspaltbar; Amp ^R	IBA, Göttingen
pMW2585	DcuA in pASK_IBA_13+, Strep-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2586	DcuA in pASK_IBA_3+, Strep-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2427	DcuC in pASK_IBA_13+, Strep-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW2428	DcuC in pASK_IBA_3+, Strep-Tag, Amp ^R	Diese Arbeit
pMW445	DcuB XbaI-HindIII mit C-terminalem Strep-tag in pBAD18-Kan, Kan ^R	Bauer, 2010
pMW561	PhoA in pMW445 für Expression von DcuB-PhoA; Kan ^R	Bauer, 2010
pMW577	pMW561 aber DcuA	Bauer, 2010

10.1.3. Primer

Zur Berechnung der angegebenen Schmelztemperaturen der Primer wurde das Programm OligoCalc verwendet (4.7.2). Dieses berechnet anhand der Formel

(für Primerlängen ≤ 13 Nukleotiden)

oder anhand der Formel

————— (für Primerlängen ≥ 13 Nukleotiden)

die Schmelztemperatur der jeweiligen Oligonukleotiden, wobei w,x,y,z die Anzahl der Basen A,T,G,C in der Sequenz angibt.

Tab. 8: Primer zur Konstruktion von BACTH-Fusionen, Strep-Fusionen und verkürztem DcuS

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]
pKNT25/pUT18-BamHI DcuA ₁₋₂₀₇ -for	AACAAGGATCCCTCTAATATGCTAGTTGTAG	59,1
pKNT25/pUT18-DcuA ₁₋₂₀₇ -EcoRI-rev	AACCAGGAATTCCGCCCTCTTCC	60,8
pKNT25/pUT18-ClaI DcuA ₂₀₈₋₄₃₃ -for	GCGTCTGGAAATCGATTCTGGTTGAACTG	61,5
pKNT25-DcuA ₂₀₈₋₄₃₃ -KpnI-rev	GCGATGGTACCTACCAGCATGAAGCTA	61,3
pUT18-DcuA ₂₀₈₋₄₃₃ -NheI-rev	CCGCGATGCTAGCTACCAGCATGAAG	62,7
pKNT25/pUT18-BamHI DcuC ₁₋₂₂₉ -for	GTCTGGATCCCATTATGCTGACATTC	58
pKNT25/pUT18-DcuC ₁₋₂₂₉ -EcoRI-rev	GAGAGAGAATTCATAGAGATGTGCTC	56,4
pKNT25/pUT18-ClaI DcuC ₂₂₉₋₄₆₁ -for	GCGCGCGTATCGATGCATGAAATGTTAG	61,4
pKNT25-DcuC ₂₂₉₋₄₆₁ -NotI-rev	CATAATAATTATAGCGGCCGCGGACTTGC	61,5
pUT18-DcuC ₂₂₉₋₄₆₁ -NheI-rev	CCGAATAATTATAGCTAGCGGACTTGCCTG	61,6
DcuS _{PK} _for	GCGCGCGGATCCCTGGAACCCTACGAAATC	63
DcuS _{PK} _rev	GCGCGCGAGCTCTCATCTGTTCGACCTCTC	63
DcuS _{PKL} _for	GCGCGCGGATCCGTAAAGGTACTGAAAAAA	64,4
DcuS _{PKL} _rev	GATATAGAGCTCAATCTGTTCGACCTCTCCCCG	65,6
IBA_EcoRI_DcuC_BamHI_f	GCG AGA ATT CTT GCG CAT GCT GAC ATT C	61,4
IBA_EcoRI_DcuC_BamHI_r	GCA TGG ATC CAT ATA TGG ACT TGC CTG	59,7
IBA_EcoRI_DcuA_BamHI_f	CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCC	62,8
IBA_EcoRI_DcuA_BamHI_r	GCTGGCCTTTTGCTCACATGACCCGACA	63,4

Tab. 9: Primer für gerichtete Mutagenesen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T _M [°C]
pKNT25-KpnI-for	CTAAGTAATATGGTACCCTCTCAGTAC	56,7
pKNT25-KpnI-rev	GTACTGAGAGGGTACCATATTACTTAG	56,7
pUT18-NheI-for	CCGCATAGTTAAGCTAGCCCCGAC ACC	64,3
pUT18-NheI-rev	GGT GTC GGG GCT AGC TTA ACT ATG CGG	64,3
pKNT25-NotI-for	CAATCTGCTCTGCGGCCGCATAGTTAAG	62,9
pKNT25-NotI-rev	CTTAACTATGCGGCCGCAGAGCAGATTG	62,9
6xHis-pUT18C-for	CATCACCATCACCACCACTAACTAAGTAA- TATGGTG	63,3
6xHis-pUT18C-rev	GTGGTGGTGATGGTGATGTATCGATGAATTCGAG	64,4
6xHis-pKT25-for	CATCACCATCACCACCACTAACTAA- GAATTCGGCCGTCG	68,7
6xHis-pKT25-rev	GTGGTGGTGATGGTGATGCTTAGGTACCCGGG- GATC	70,1
PASC+K_N248D_for	GAG GTC ACG CTG ATC GAC GAT GCC GCA CAA G	68,3
PASC+K_N248D_rev	CTT GTG CGG CAT CGT CGA TCA GCG TGA CCT C	68,3
PASC+K_N304D_for	CGGCTATTACTGATCGACACCGTTCCGGTGC	67
PASC+K_N304D_rev	GCA CCG GAA CGG TGT CGA TCA GTA ATA GCC G	67
DcuS_E233G_for	CAGTCTATCAAAGGAGGCGTCGTTGC	66,4
DcuS_E233G_rev	GCAACGACGCCTCCTTTGATAGACTG	66,4
PASc_L228A-for	CAACGCCAGGCCATGGCGCAGTCTATC	71,0
PASc_L228A-rev	GATAGACTGCGCCATGGCCTGGCGTTG	71,0
DcuS_L246R_f	GGCGAGGTCACGCGGATCAACGATGCC	72,6
DcuS_L246R_r	GGCATCGTTGATCCGCGTGACCTCGCC	72,6

10.1.4. Chemikalienliste

Tab. 10: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar, Kobe I	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich

Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Roth
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
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
Streptomycin	Sigma-Aldrich
Tetracyclin Hydrochlorid	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
L-Tryptophan	Serva

10.2. Anhang zu Ergebnisse

10.2.1. Strukturelle Veränderung in der N-terminalen Helix und den β -Faltblättern

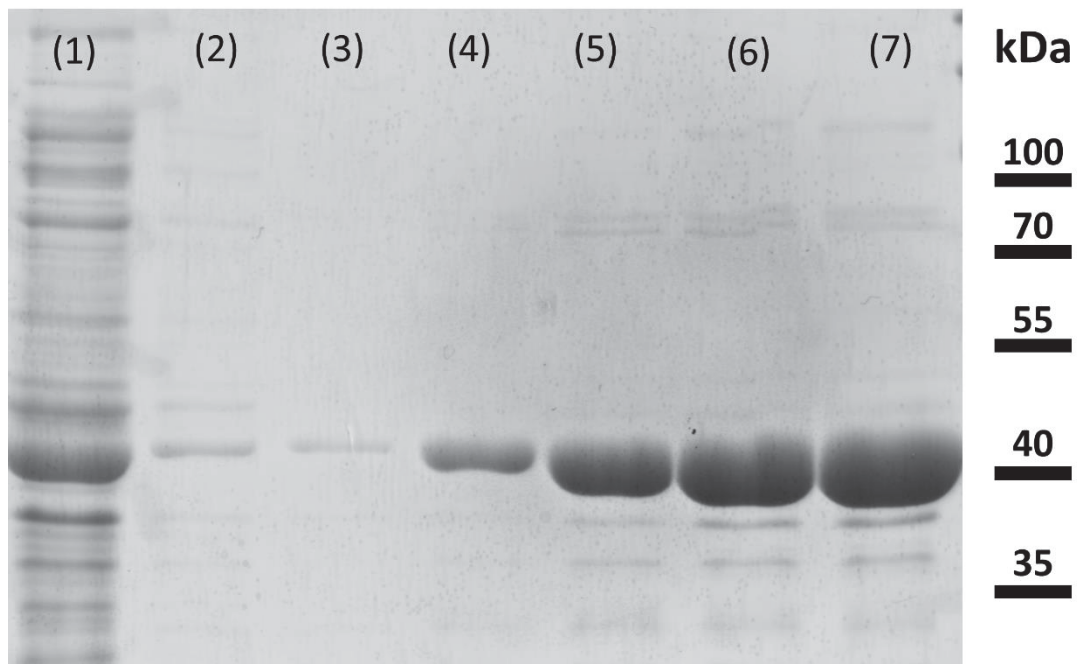


Abb. 36: Auftrennung der Proteine des Dcu_{SPK}-Konstrukts (N304D) im SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Das Dcu_{SPK}-Konstrukt wurde in den Überproduktionsstamm BL21DE3 transformiert und überexprimiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte aerob für 5 h bei 20 °C nach Erreichen der exponentiellen Phase nach aerober Zucht bei 30 °C. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Proteine über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt und die Reinheit einer Fraktion mittels der SDS-Page durch ein 10 % SDS-Gel überprüft. Aufgetragen sind 1): Durchfluss nach der Säulenbindung 2): Durchfluss nach fünf Waschsritten (Waschfraktion) 3-7): Elutionsfraktionen mit erhöhtem Imidazol (500 mM) zur Ablösung der gebundenen Proteine.

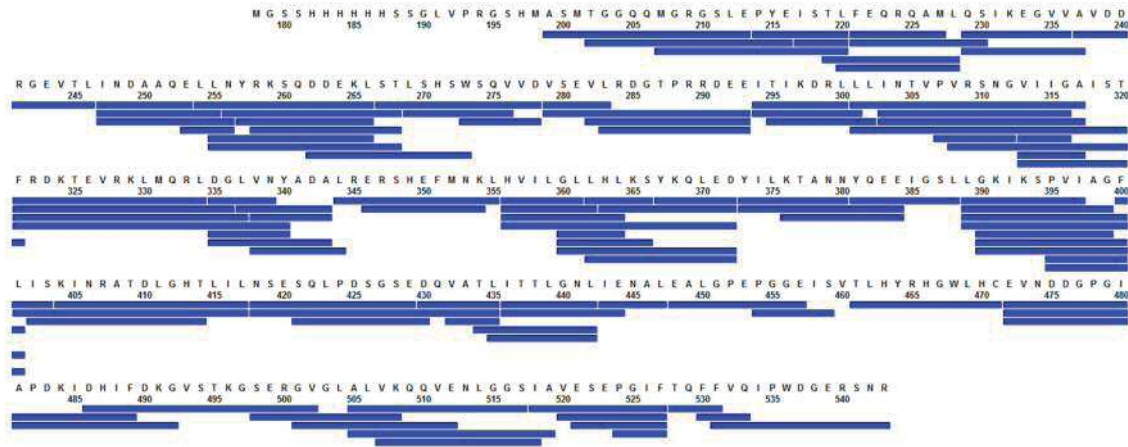


Abb. 37: Peptide Coverage Map von DcuSPK. Nach dem Verdau durch Pepsin und der LC-MS wurden 111 Peptide bei einer Deckung von 94 % und einer Wiederholungsrate von 3,26 detektiert. In Blau dargestellt sind die Peptide nach dem Verdau sowie die entsprechende Aminosäuresequenz.

10.2.2. Vergleichende HDX-MS Messungen der DcuSPK_{T25} Konstrukte

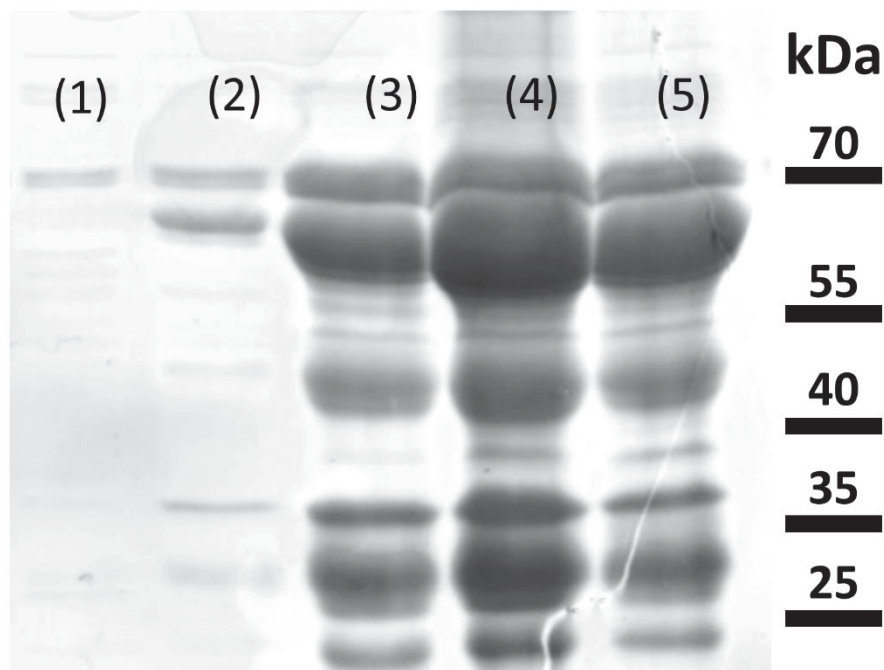


Abb. 38: Auftrennung der Proteine von DcuSPK_{+T25} (N304D) in einem SDS-Gel nach Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. DcuSPK_{+T25} (N304D) wurde in den Überproduktionsstamm BL21DE3 transformiert und überexprimiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte aerob für 5 h bei 20 °C nach Erreichen der exponentiellen Phase nach aerober Zucht bei 30 °C. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Proteine über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt und die Reinheit einer Fraktion mittels der SDS-Page durch ein 10 % SDS-Gel überprüft. Aufgetragen sind 1-5): Elutionsfraktionen mit erhöhtem Imidazol (500 mM) zur Ablösung der gebundenen Proteine.

10.2.3. Anwendung des Complexome Profilings für prokaryotische Membranproteine

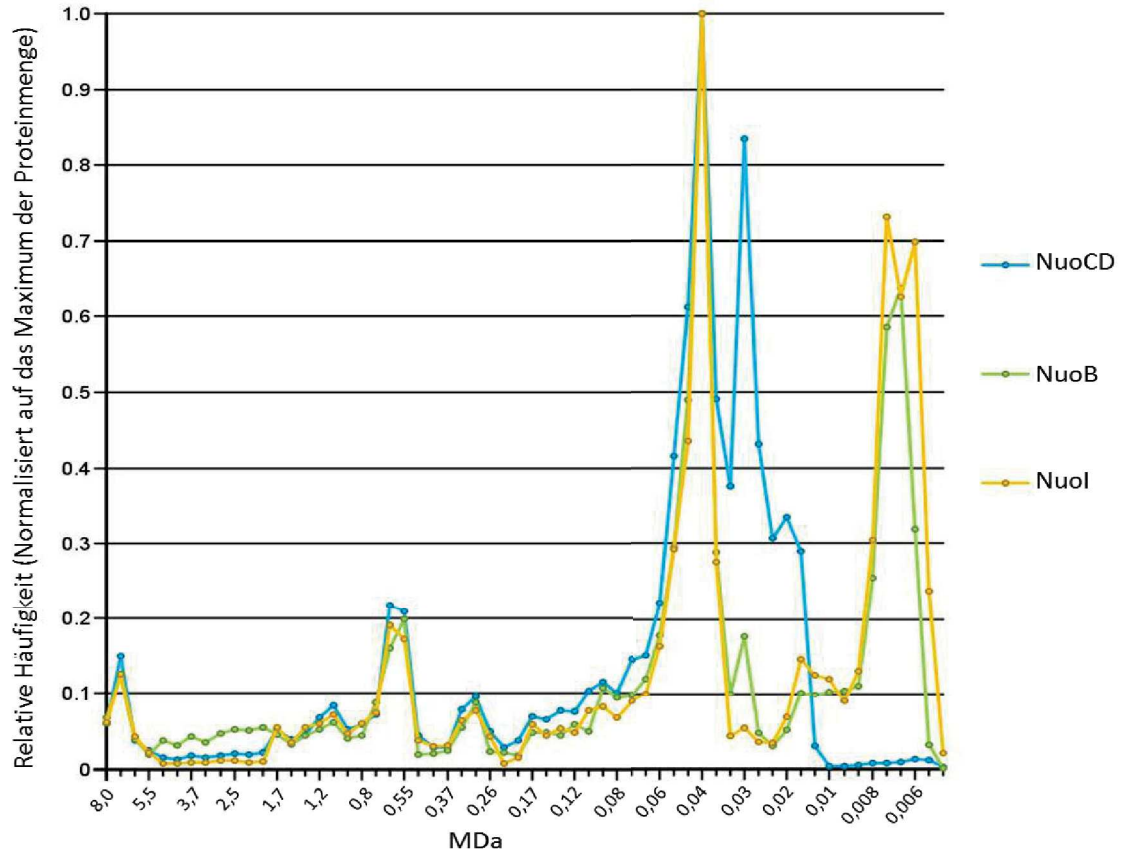


Abb. 39: Migrationsprofile der UE C,D,B,I des Enzyms NADH-Chinon-Oxidoreduktase. Die Isolierung der Membran des Stamms *E. coli* K-12 war mittels French-Press nach einer aeroben Zucht in eM9-Medium mit 10 mM Glycerin bei 37 °C erfolgt. Nach der Auftrennung der Proteine in einem Gradientengel (3 - 18 %) wurden die Proteine in einem Gelfragment mittels Massenspektrometrie analysiert und zugeordnet. Die Migrationsprofile wurden in einem 2-D Schaubild via NOVA visualisiert. Die Zuordnung der Massen erfolgte mit Proteinen der mitochondrialen Komplexe I–V.

Tab. 11: Zusammenfassung des Complexome Profilings der Proteinkomplexe. Die Gruppierungen der Migrationsprofile wurden unter fünf unterschiedlichen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Zahlen stehen für unabhängige Peaks, die nicht von anderen Peaks eines Migrationsprofils geteilt werden. Die Symbole stehen für eine visuelle Bewertung der Ähnlichkeit der Migrationsprofile. Rot/-: analoger Verlauf der Migrationsprofile untereinander war nicht erkennbar, Hellgrün/+ : teilweise Ähnlichkeit der Migrationsprofile untereinander war erkennbar, Dunkelgrün/++: deutlicher Ähnlicher Verlauf der Migrationsprofile untereinander war nicht auszuschließen. Buchstaben in Klammern stehen für die detektierten Untereinheiten mittels Massenspektrometrie.

Abkürzung Sub- /Komplex	Untereinheit	Glc-O ₂	Glc+O ₂	Gly+O ₂	Gly+Fum	Gly+Nit
NuoAHJKLMN (A,H,K,L,N)		-	++	++	+	+
	A	1	1			
	H	2				
	K	3				2
	L	1				
	N	2	2			1
NuoBCDI (B,C/D,I)		-	+	++	++	++
	B	2	1	1		
	C/D	2	2	1		
	I	1	1	1		
NuoEFG (E,F,G)		-	-	+	+	+
	E	0	0	1	1	1
	F	1	1	3	1	2
	G	4	3		3	2
SdhCDAB (C,A,B)		-	++	++	+	++
	C	0			1	1
	A	2				
	B	2	1	1		
FdoGHI (G,H,I)		-	-	-	-	-
	G	1				
	H					
	I	1	3	3	4	4
CyoABCD(A,B)		+	++	++	+	++
	A	1	1	1		1
CydAB (A,B)	B				1	1
		+	+	-	+	+
CydAB (A,B)	A			1		3
	B	2	1	1	1	1
NarZYV (Z,Y)		-	-	-	-	-

	Z	1	3	3	3	2
	Y	2	1	1	4	2
FdnGHI (G,H)		+	-	-	+	+
	G		1			
	H		2	2		
HyaABC (A,B,C)		++	-	-	++	++
	A		1			
	B		5			
	C		0			
HybCOAB (C,O,A)		-	-	-	++	++
	C	1	2	2		1
	O	1	1			
	A	1	1	1	1	
GlpABC (A,B,C)		-	-	-	+	+
	A	1	2	3		2
	B	1	2	1		
	C	1	3	2		1
HycBCDEFG (C,E)		-	-	-	-	-
	C	2	3	3	3	1
	E	3	2	2	3	4
NarGHI		+	-	-	+	++
	G	1	1	1		
	H		3	3		
	I	1	1	1	1	
FrdABCD (A,B,C)		-	-	-	++	++
	A			1		
	B	6	4	4		
	C	1	1	1	1	1
DmsABC (A,B)		-	-	-	+	-
	A	2	4	3	1	1
	B	1	1	1		1
DauA//DctA		-	-	++	-	-
	DauA	2	1	1	2	1
	DctA	0	1			1
DcuS//DctA		-	-	-	-	-
	DcuS	2	1	1	3	1
	DctA	0	1	1	1	1
DcuS//DcuB		-	-	-	-	-
	DcuS	1	1	1	3	1
	DcuB	1	2	2	1	1
DcuA//DcuB		-	-	-	++	-

	DcuA			1		
	DcuB		2	1		
DcuA//DcuB //DcuC		-	-	-	++	-
	DcuA			1		
	DcuB		2	1		
	DcuC	2	1	1		

10.2.4. Untersuchung der Interaktion der Dcu-Transporter mittels Bacterial-Two-Hybrid-System (BACTH)

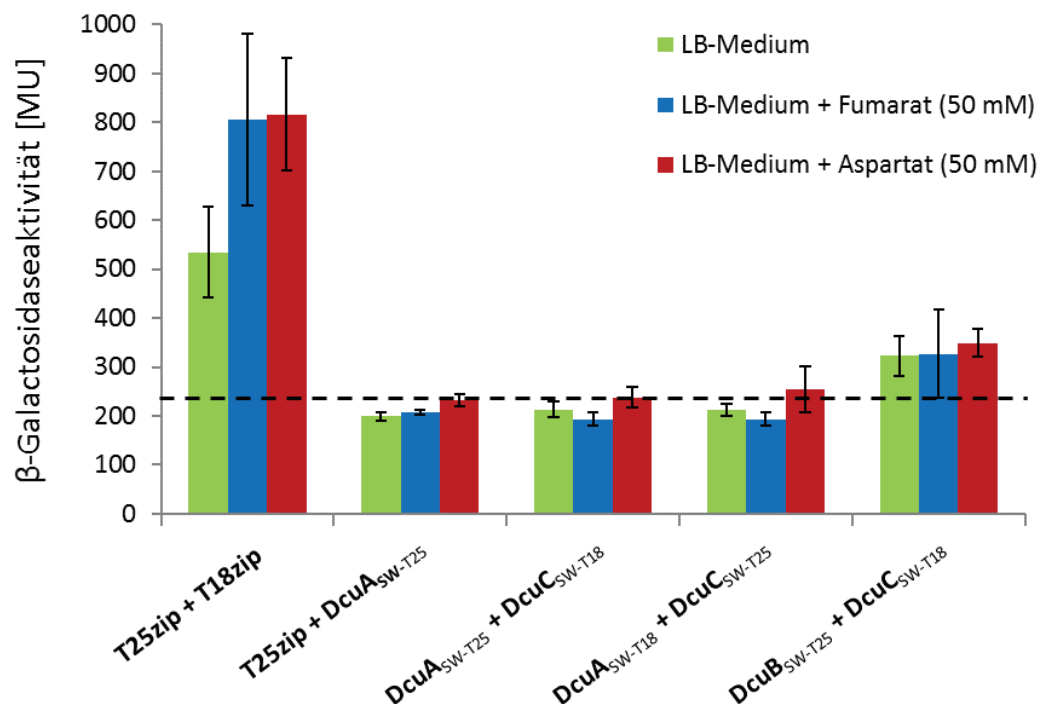


Abb. 40: Interaktion von DcuA und DcuC mit DcuB unter aeroben Bedingungen. DcuA, DcuB und DcuC lagen als Sandwichkonstrukte mit internem T25- oder T18-Fragment vor. Die T25/T18-Konstrukte wurden mittels Kotransformation durch Elektroporation in den Stamm BTH101 eingebracht. Die anaerobe Zucht erfolgte bei 30 °C in LB-Medium ohne Effektor (grün) oder mit je 50 mM Fumarat (blau) oder L-Aspartat (rot). Die Expression der Konstrukte wurde durch 0,5 mM IPTG induziert. Die β -Galactosidaseaktivität wurde innerhalb der exponentiellen Phase bei OD_{587} 0,5 - 0,8 in Miller-Units bestimmt. Die gestrichelte Linie legt den Schwellenwert einer Interaktion fest. Die Kombination aus T25Zip + T18Zip dient als Kontrolle für eine positive Interaktion. Als negative Interaktionskontrolle dient T18Zip + DcuA_{SW-T25}.

10.2.5. Die Sandwichkonstrukte DcuA und DcuC sind nicht funktional

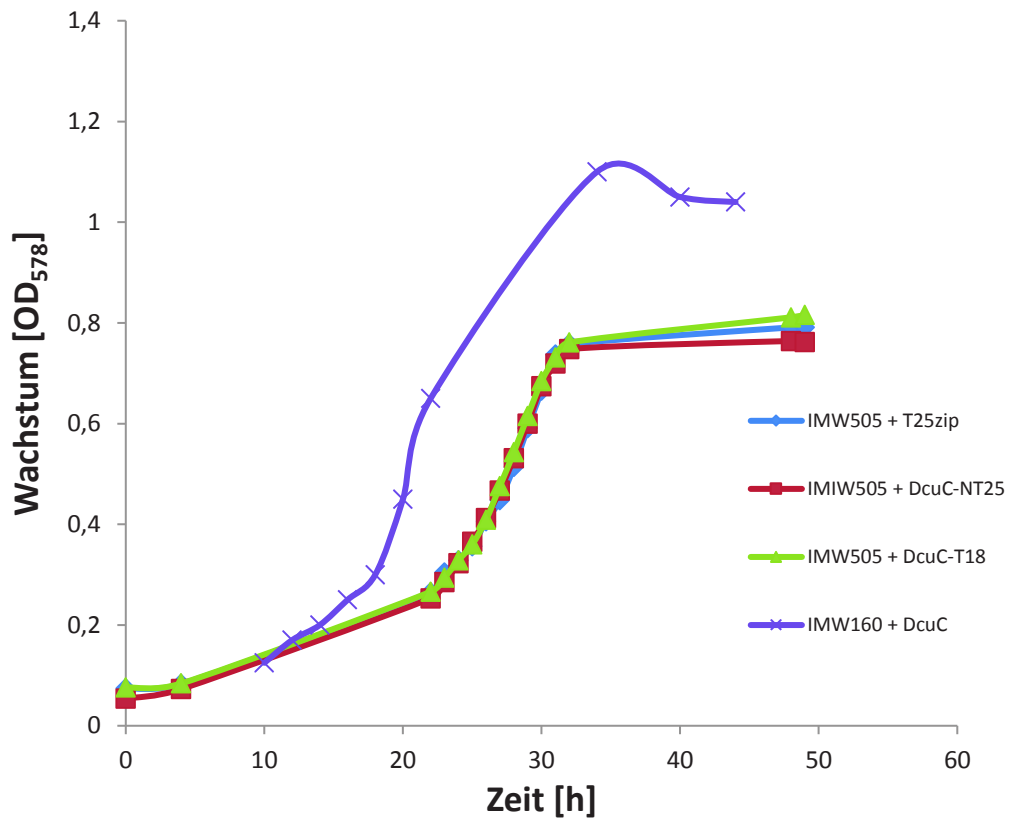


Abb. 41: Wachstumskomplementation des Dcu-Transporter defizienten Stamms IMW505 mit plasmidkodiertem DcuC_{sw}. Der *dcu*-negative Stamm IMW505 wurde mit den Konstrukten DcuC_{sw-T25} und DcuC_{sw-T18} mittels Elektroporation transformiert. Als Negativkontrolle dient der Stamm IMW505 mit eingebrachtem pKNT25-Vektor. Als Positivkontrolle dient der *dcu*-negative Stamm IMW160 mit plasmidkodiertem DcuC (Zientz, 2000). Die anaerobe Kultivierung erfolgte in eM9-Medium mit 20 mM Fumarat. Die optische Dichte OD₅₇₈ der Zuchten wurde nach 22 h in regelmäßigen Abständen gemessen.

10.2.6. Validierung des Dcu-Interaktoms durch das membrane strep protein Interaction experiment (mSPINE)

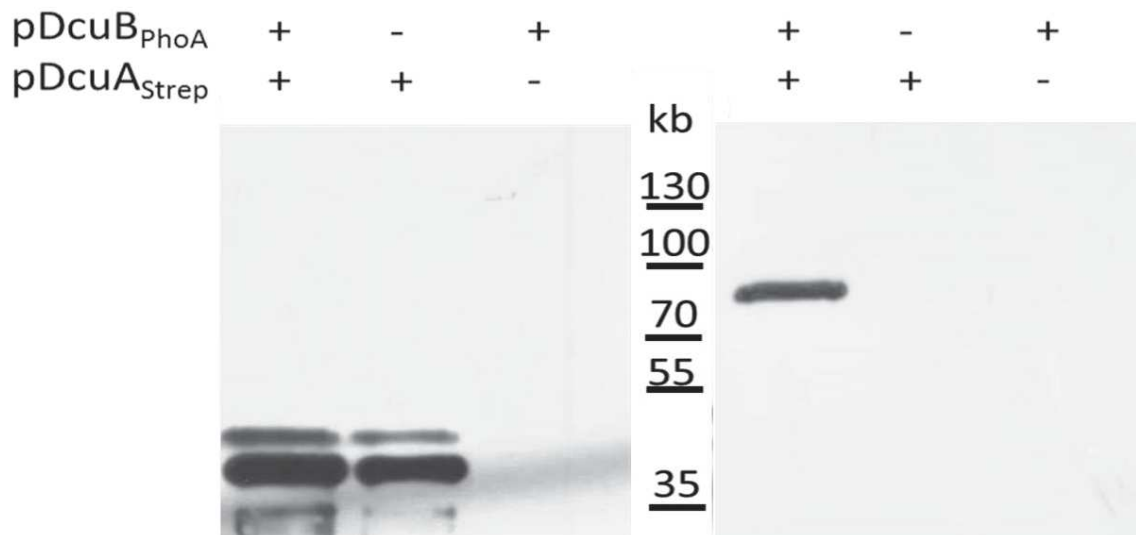


Abb. 42: *In vivo* Bindung von DcuB-PhoA an DcuA-Strep und Ko-Reinigung mittels Strep-Tactin. DcuB-PhoA und DcuA-Strep wurden in dem *dcu*-negativen Stamm IMW160 koexprimiert. Die Induktion mit 200 µg Anhydrotetracyclin erfolgte nach einer anaeroben Zucht bei 30 °C bei einer OD₅₇₈ von 0,5 - 0,8. Nach 5 h Inkubation wurde 0,6 % Formaldehyd zur Vernetzung der Proteine hinzugegeben. Die Proteine wurden aus der mit 2 % Empigen solubilisierten Membranfraktion mittels einer Strep-Tactin Säule isoliert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz mit Anti-Strep bzw. Anti-PhoA Antikörpern. Alle Elutionsfraktionen wurden nach der Säulenreinigung aufkonzentriert. Es wurden je Bahn 20 µl der gereinigten Proteine aufgetragen.

DcuA of aerobically grown *Escherichia coli* serves as a nitrogen shuttle (L-aspartate/fumarate) for nitrogen uptake

Alexander Strecker, Christopher Schubert, Sandra Zedler, Philipp Steinmetz and Gottfried Uden *
Microbiology and Wine Research, Institute of Molecular Physiology (IMP), Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, 55099, Germany

Summary

DcuA of *Escherichia coli* is known as an alternative C₄-dicarboxylate transporter for the main anaerobic C₄-dicarboxylate transporter DcuB. Since *dcuA* is expressed constitutively under aerobic and anaerobic conditions, DcuA was suggested to serve aerobically as a backup for the aerobic (DctA) transporter, or for the anabolic uptake of C₄-dicarboxylates. In this work, it is shown that DcuA is required for aerobic growth with L-aspartate as a nitrogen source, whereas for growth with L-aspartate as a carbon source, DctA was needed. Strains with DcuA catalyzed L-aspartate and C₄-dicarboxylate uptake (like DctA), or an L-aspartate/C₄-dicarboxylate antiport (unlike DctA). DcuA preferred L-aspartate to succinate in transport ($K_M = 43$ and $844 \mu\text{M}$, respectively), whereas DctA has higher affinity for C₄-dicarboxylates like succinate compared to L-aspartate. When L-aspartate was supplied as the sole nitrogen source together with glycerol as the carbon source, L-aspartate was taken up by the bacteria and fumarate (or L-malate) was excreted in equimolar amounts. Both reactions depended on DcuA. L-Aspartate was taken up in amounts required for nitrogen metabolism but not for carbon metabolism. Therefore, DcuA catalyzes an L-aspartate/C₄-dicarboxylate antiport serving as a nitrogen shuttle for nitrogen supply without net carbon supply.

Introduction

The C₄-dicarboxylates succinate, fumarate, L-malate and L-aspartate represent important substrates for the growth

of *Escherichia coli*. Under aerobic conditions, the substrates are degraded by the citric acid cycle and associated routes (for reviews see Miles and Guest, 1987; Cronan and Laporte, 2005; Uden *et al.*, 2006). *E. coli* contains several transporters for the uptake of C₄-dicarboxylates. DctA, a member of the dicarboxylate/amino acid:cation symporter family (DAACS), is the general transporter for the uptake of fumarate, succinate, L-malate, D-malate and L-aspartate during aerobic growth (Kay and Kornberg, 1969; 1971; Davies *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2006). Under acidic conditions (pH 5), transporter DauA, a member of the solute carrier SCL26 and sulfate (SulP) transporter family, takes over the function of DctA (Karinou *et al.*, 2013). Transporter GltP, which catalyzes the uptake of glutamate, has low side activity for L-aspartate (Raunser *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2017) and may contribute to the uptake of L-aspartate. In addition, DcuA a member of the DcuA/DcuB C₄-dicarboxylate transporter family is expressed constitutively under aerobic conditions and has been suggested to function in aerobic metabolism (Golby *et al.*, 1998). In contrast, DcuB is expressed only anaerobically and plays no role in aerobic C₄-dicarboxylate transport (Six *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998).

Under anaerobic conditions, fumarate, L-malate or L-aspartate serve as electron acceptors in fumarate respiration, which produces succinate (see review by Kröger *et al.*, 1992; Uden *et al.*, 2016). Fumarate respiration requires C₄-dicarboxylate/succinate antiport for the uptake of fumarate, L-malate or L-aspartate, which is coupled to the export of succinate (Engel *et al.*, 1992; 1994; Janausch *et al.*, 2002). DcuB represents the major C₄-dicarboxylate/succinate antiporter of fumarate respiration (Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1999), whereas DcuC functions mainly as a succinate efflux carrier for the succinate produced during glucose fermentation (Zientz *et al.*, 1996; 1999). The expression of *dcuB* and *dcuC* is fully repressed under aerobic conditions (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Zientz *et al.*, 1999). Despite their preferred function in either C₄-dicarboxylate antiport or efflux, DcuB and DcuC are able to catalyze uptake, antiport or efflux, and to substitute for one another in mutants (Zientz *et al.*, 1999).

Only some of the physiological roles of DcuA are known (Six *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998; 1998; Janausch *et al.*,

Accepted 2 July, 2018. *For correspondence. E-mail unden@uni-mainz.de; Tel. +49-6131-3923550; Fax +49-6131-3922695.

2002; Unden *et al.*, 2016). DcuA can support (anaerobic) fumarate respiration and C₄-dicarboxylate/succinate antiport with either fumarate, L-malate or L-aspartate as the substrate (Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1999). DcuA is co-localized and co-expressed with *aspA*, which encodes aspartase A (aspartate ammonia lyase), the enzyme that converts L-aspartate to fumarate. Based on these properties, DcuA is supposed to serve as an additional or backup antiporter for fumarate respiration (Six *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998; Janausch *et al.*, 2002; Unden *et al.*, 2016) with a preferential function in the supply of L-aspartate for fumarate respiration (Golby *et al.*, 1998).

DcuA is expressed constitutively under aerobic and anaerobic conditions and independent of the carbon source (Golby *et al.*, 1998). The constitutive expression suggests that DcuA may play a role in aerobic metabolism in addition to its role in fumarate respiration. In the present study, the role of DcuA in aerobic growth was studied. The results show that DcuA is required for the uptake of L-aspartate as a nitrogen source, which is not achieved by the aerobic transporters (i.e., DctA, DauA or GltP). The uptake of L-aspartate is coupled to the excretion of fumarate, resulting in the net uptake of nitrogen without carbon uptake, and the function of DcuA as a nitrogen shuttle.

Results

DcuA is required for growth and transport of L-aspartate as a nitrogen source

E. coli is able to grow aerobically on glycerol or glucose in mineral medium M9 when ammonia or L-aspartate (Goux *et al.*, 1995; Osterman, 2009) serve as the nitrogen source. Wild-type and mutant strains of *E. coli* deficient in C₄-dicarboxylate carriers were tested for growth on agar plates in the presence of glycerol with ammonia (Fig. 1A) or L-aspartate (Fig. 1B) as the sole nitrogen source. All strains, including the mutants lacking DctA, DcuA, DcuB, DcuC, GltP (Fig. 1A) or DauA (not shown), were able to grow to similar extents in the presence of glycerol plus ammonia. However, with L-aspartate as the nitrogen source, the *dcuA* mutant (Fig. 1B), lost the capability to grow. Similarly, growth was severely inhibited in liquid mineral medium with L-aspartate as the nitrogen source when *dcuA* was missing (Table S1). Supplying *dcuA* via plasmid restored growth in the presence of glycerol plus L-aspartate (Table S1). Therefore, DcuA enables the use of L-aspartate as a nitrogen source during aerobic growth, in contrast to the transporters DctA, GltP, DcuB, DcuC and DauA.

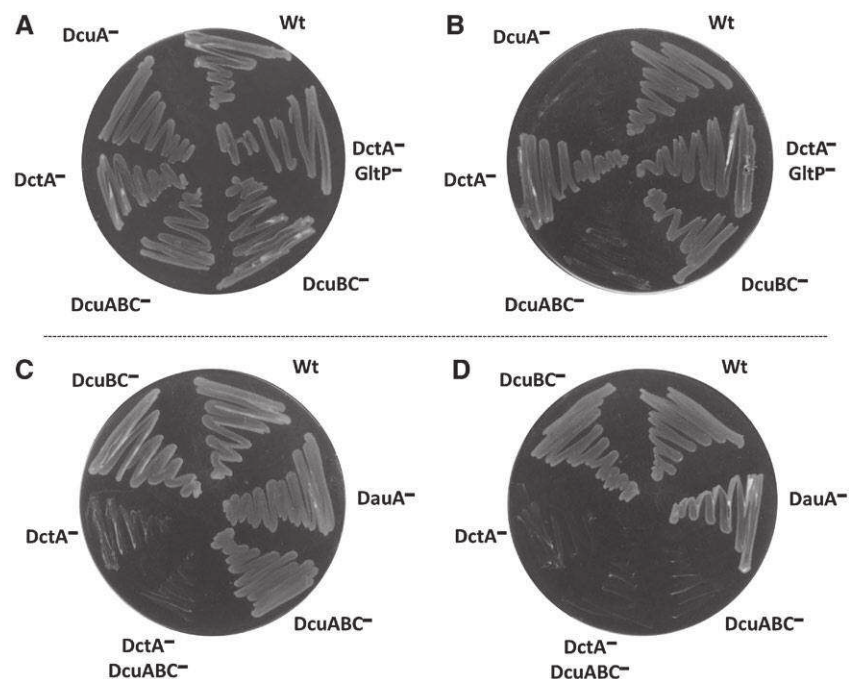


Fig. 1. Aerobic growth of *E. coli* expressing wild-type and C₄-dicarboxylate transport mutants. A. The plates contained nitrogen-deficient M9 agar with 50 mM glycerol + 20 mM ammonia, or B. glycerol + 10 mM L-aspartate. C. The plates contained M9 agar including ammonia and succinate (20 mM) or D. L-aspartate (20 mM) as the sole carbon source. The labeling shows the relevant phenotype of the strains (C₄-dicarboxylate transporter present). The following strains were used: AN387 (wild-type), MDO800 (*dctA*), IMW575 (*dctA gltP*), JRG2821 (*dcuA*), IMW374 (*dcuB dcuC*), IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*), JW5189 (*dauA*) and IMW213 (*dcuA dcuB dcuC dctA*). Colony growth was recorded after 24 h (A, B), or 48 h (C, D).

Earlier experiments by Kay and Kornberg (1971) showed that, DctA is required for aerobic growth with C₄-dicarboxylates, including L-aspartate, as the carbon and energy source, and *dctA* mutants lose the capacity for growth. Comparison to the data in Fig. 1 suggests a different use of DctA and DcuA in L-aspartate transport for carbon and energy versus nitrogen metabolism respectively. Because the explanation of this difference is not obvious, it was verified using the strains tested in the present study (Fig. 1C and D). The bacteria were grown in the same mineral medium as above, but the agar plates contained succinate (Fig. 1C) or L-aspartate (Fig. 1D) as the only carbon source, in addition to ammonia as the nitrogen source. Growth on succinate was strongly reduced in the strain lacking DctA. Additional inactivation of the DcuA transporters inhibited growth nearly completely. Loss of DcuA, DcuB, DcuC or DcuA in single mutants had no significant effect, though growth on L-aspartate was strongly diminished in the mutants lacking DctA or DcuA (Fig. 1D). Thus, aerobic growth depends on DctA, with some contribution by DcuA. This observation is in agreement with the data reported by Kay and Kornberg (1971) showing that DctA is the major transporter for aerobic growth on C₄-dicarboxylates.

The contribution of DcuA and DctA to the transport of L-aspartate and succinate was tested in the wild-type and mutant strains that produce only DctA or DcuA (Fig. 2).

For DctA, the strain IMW160 was used, as it is deficient in DcuA, DcuB and DcuC. For DcuA, the strain MDO800 was used, as it produces only DcuA under aerobic conditions, and not DctA, DcuB or DcuC. For the transport assay, the bacteria were grown under aerobic conditions in mineral medium containing glycerol plus the C₄-dicarboxylates. Uptake of [¹⁴C]aspartate (Fig. 2A) was high in the wild-type (19.7 μmol (g dw × min)⁻¹) and decreased to 33% and 48% in the IMW160 (relevant genotype *dcuA*) and MDO800 (*dctA*) strains, respectively, compared to wild-type. The uptake of [¹⁴C]succinate (Fig. 2B) was most severely inactivated in the DctA-deficient MDO800 strain (37% residual activity), and to a smaller extent in the DcuA-deficient IMW160 strain (71% residual activity). In the *dctA dcuA* double mutant, only 3% of the wild-type activity remained. Therefore, L-aspartate and succinate can be transported by both DcuA and DctA; however, DcuA is the major transporter for aspartate uptake and DctA for succinate uptake. This preference in transport was supported by growth experiments on the respective substrates (Fig. 1C and D).

DcuA requires activation for full activity

Earlier an unknown L-aspartate transporter has been shown being stimulated by addition of carbon sources like D-lactate to the assay medium (Kay 1971). The

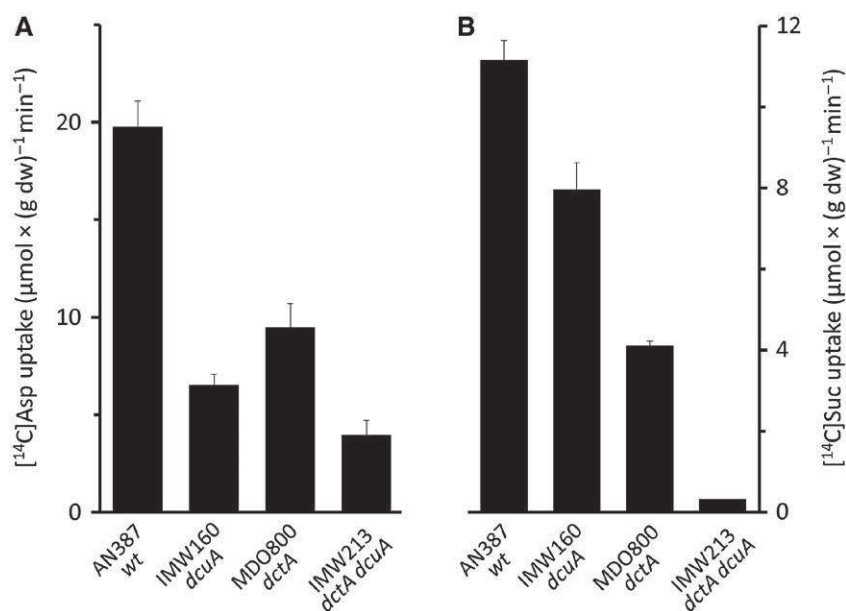


Fig. 2. Uptake of [¹⁴C]aspartate or [¹⁴C]succinate by DcuA- or DctA-producing strains of *E. coli*.

A. The uptake of [¹⁴C]aspartate and

B. [¹⁴C]succinate (100 μM each) was tested in bacteria grown in M9 medium with glycerol (50 mM) plus L-aspartate (10 mM) or succinate (10 mM) respectively. The rates represent initial transport activities determined after 1.0 min of incubation with the substrates. Uptake was tested in a filtration assay with energized bacteria. The following strains were used: *E. coli* AN387 (wild-type), IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*; relevant phenotype DcuA⁻), MDO800 (*dctA*), and IMW213 (*dctA dcuA dcuB dcuC*; relevant phenotype DctA⁻DcuA⁻). The uptake was determined in three biological replicates with two repeats for each data point, and the standard deviation is shown.

post-translational stimulation was used as a method for differentiation of the transporter from other carriers. The response of transport by DcuA (Fig. 3A) to the addition of glycerol or glucose was tested in the DctA-deficient MDO800 strain. Uptake of [14 C]aspartate was maximal when the bacteria were incubated with glucose (black bar), and significantly lower (29% of the activated transport rate) without energization (gray bar). The response was different when the same experiment was performed with strain IMW160, which produces DctA but lacks the Dcu transporters. The uptake of [14 C]succinate, one of the preferred substrates of DctA (Kay and Kornberg, 1971), was tested. Uptake decreased by a factor of 3 after glucose pre-incubation. Overall, presence of glucose or glycerol stimulated DcuA-dependent uptake whereas that of DctA was inhibited. The basis for the difference in response or the level where regulation sets in is not known.

Fig. 3B shows the kinetics of L-aspartate uptake under optimized conditions. The bacteria were incubated with glucose, and then the uptake of [14 C]aspartate was measured after separating the bacteria from the supernatant via filtration and washing. Immediate measurement after addition of the glucose avoids induction or repression of carriers. The bacteria accumulated [14 C]aspartate at high rates. Uptake activity was lost in a strain deficient for the Dcu transporters, but not in the DctA-deficient strain. From the Dcu transporters only DcuA is expressed under aerobic conditions whereas the DcuB and DcuC are strongly repressed (Zientz *et al.*, 1996; 1998; 1999; Golby *et al.*, 1998; 1999). Therefore, DcuA has to be the responsible carrier.

L-Aspartate is the preferred substrate of DcuA

The substrate specificity of DcuA was tested by competition or inhibition of [14 C]aspartate uptake by substrate homologs using the MDO800 strain that is deficient in *dctA* (Fig. 4A). The alternative (unlabeled) substrates were provided in 10-fold excess to [14 C]aspartate (100 μ M). The addition of succinate, fumarate, L-malate, asparagine or glutamate inhibited the uptake of [14 C]aspartate by 6%–34%, with succinate and L-malate being the least and most efficient competitors. In the control experiment, competition of [14 C]aspartate uptake by unlabeled L-aspartate diminished the uptake of the labeled compound by approximately 94%, which is close to the expected value considering the 11-fold dilution of the labeled L-aspartate. A similar competition experiment was performed with the IMW160 strain encoding *dctA* but lacking the *dcu* transporters (Fig. 4B). The uptake of 100 μ M [14 C]fumarate was competitively inhibited by the presence of succinate (10-fold excess), but not by aspartate, demonstrating that DctA has a preference for succinate over L-aspartate and, therefore, differs from DcuA in substrate specificity and response to competitors.

DcuA transport was further characterized in aerobically grown *E. coli* MDO800 (*dctA*) by measuring the initial transport rates as a function of the substrate concentration. The uptake of [14 C]aspartate exhibited saturation with increasing substrate concentration. Plotting the uptake (initial rates) as a function of substrate concentration showed saturation at high substrate levels and allowed determination of K_M of DcuA for L-aspartate and succinate of 43.3 μ M and 844 μ M, respectively, confirming a

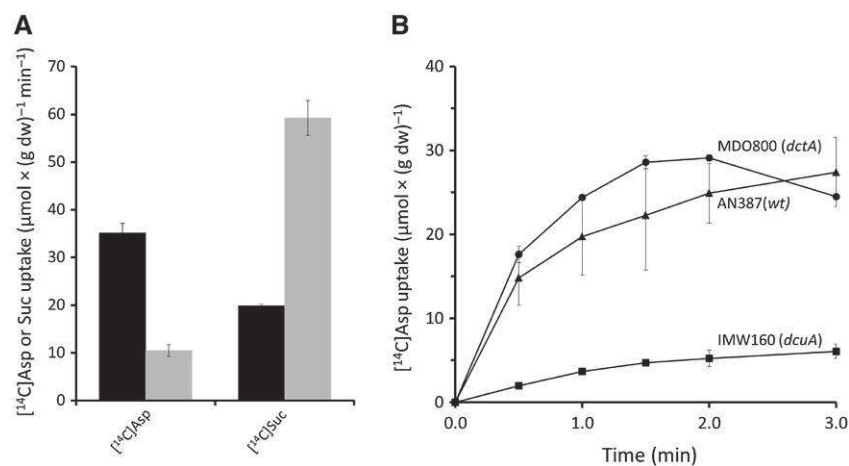


Fig. 3. Energization of transport by DcuA and kinetics of [14 C]aspartate uptake.

A. Uptake of [14 C]aspartate or [14 C]succinate (100 μ M each) was tested with glucose (5 mM) energized bacteria (glucose incubation before transport; black bars) or non-energized bacteria (gray bars) in filtration assays. *E. coli* MDO800 (*dctA*) was grown aerobically in M9 medium with glycerol + L-aspartate (10 mM each), and IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*) aerobically in LB medium with succinate (10 mM).

B. Intracellular [14 C]aspartate (100 μ M) contents were determined with glucose energized bacteria in a filtration assay after incubation with [14 C]aspartate for the indicated times. The bacteria (*E. coli* MDO800 (*dctA*), AN387 (wild-type, Wt) or IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*)) were grown in M9 medium with glycerol (50 mM) + aspartate (10 mM). The transport was determined from three biological replicates with three repeats for each data point, and the standard deviation (error bars) is shown.

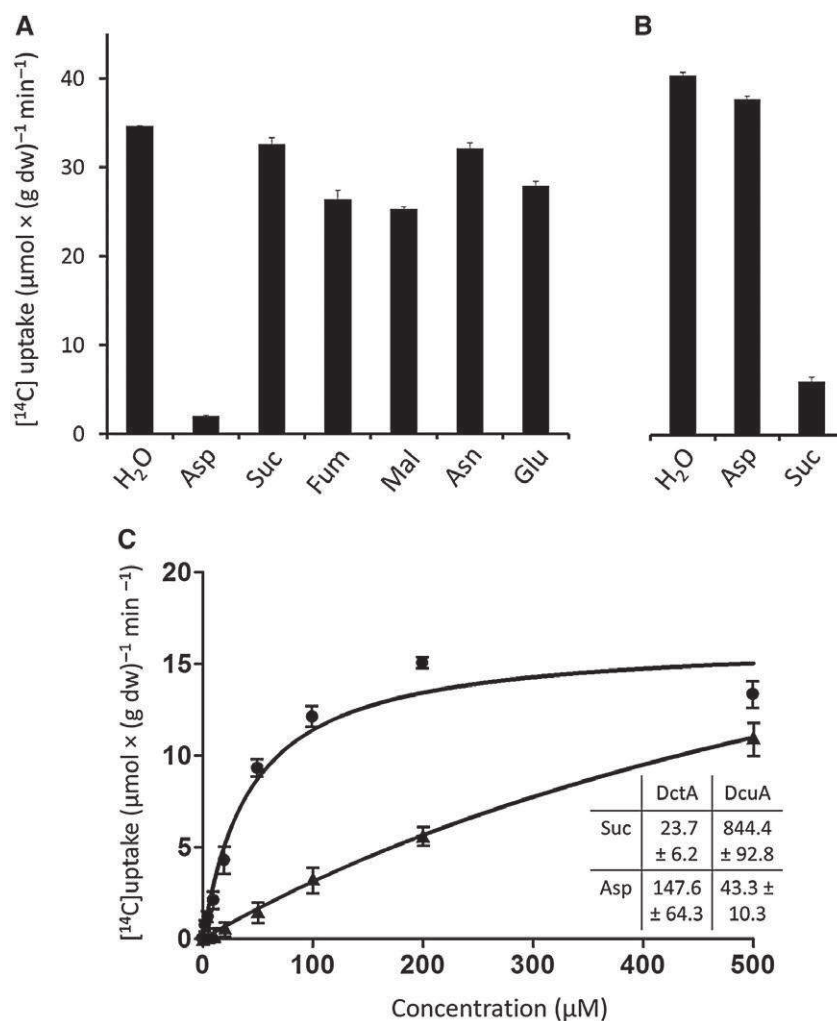


Fig. 4. Uptake of [¹⁴C]aspartate and [¹⁴C]succinate by DcuA and DctA in the presence of unlabeled C₄-dicarboxylates.

A. Cell suspensions of strains MDO800 (*dctA*) or

B. IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*) were incubated with 100 μM of [¹⁴C]aspartate or [¹⁴C]succinate, respectively, mixed with 1 mM each of the unlabeled competitor substrates (Asp, L-aspartate; Suc, succinate; Fum, fumarate; Mal, L-malate; Asn, asparagine; Glu, glutamate) or H₂O before adding the bacteria for the transport assay. Uptake of the labeled compound was determined after 1 min of incubation by filtration assay.

C. Transport by DcuA was measured in *E. coli* MDO800 (*dctA*). Uptake of [¹⁴C]aspartate or [¹⁴C]succinate were tested as the initial transport rates in a filtration assay for 0.5 min with substrate concentrations ranging from 2.5 to 500 μM (●, [¹⁴C]aspartate with MDO800; or ▲, [¹⁴C]succinate). Strain MDO800 was grown aerobically in M9 plus glycerol and the corresponding C₄-dicarboxylate (10 mM for each of the substrates), and the bacteria were incubated with glucose before performing the transport assay. Strain IMW160 was grown aerobically in LB medium with succinate or L-aspartate (10 mM each), and the bacteria were not energized for the transport assay. The graphs in C were obtained by nonlinear regression analysis from the transport rates for the given substrate concentrations. The uptake was determined in three biological replicates with two repeats for each data point, and the standard deviation (error bars) is shown.

high preference of DcuA for L-aspartate (Fig. 4C). Under comparable conditions, the K_M of DctA for L-aspartate and succinate in the uptake assay showed a reverse situation compared to DcuA, with K_M values of 147.6 μM and 23.7 μM respectively (Fig. 4C). In addition, the V_{max} values of DctA were significantly higher for succinate (24.8 μmol (mg dw)⁻¹ min⁻¹) than for L-aspartate (7.9 μmol (mg dw)⁻¹ min⁻¹). The K_M of DctA for succinate determined here is in close agreement with a previously published value of 30 μM (Kay and Kornberg, 1971). Overall, the substrate affinities of DcuA and DctA support the notion that DcuA

is an L-aspartate transporter with high preference for L-aspartate, whereas DctA is a general C₄-dicarboxylate transporter with a side activity for L-aspartate.

L-Aspartate/C₄-dicarboxylate exchange by DcuA

The DcuA and DcuB transporters are able to catalyze C₄-dicarboxylate/C₄-dicarboxylate antiport under anaerobic conditions in fumarate respiration (Engel *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996; Jausch *et al.*, 2002). In addition, both transporters perform also C₄-dicarboxylate uptake

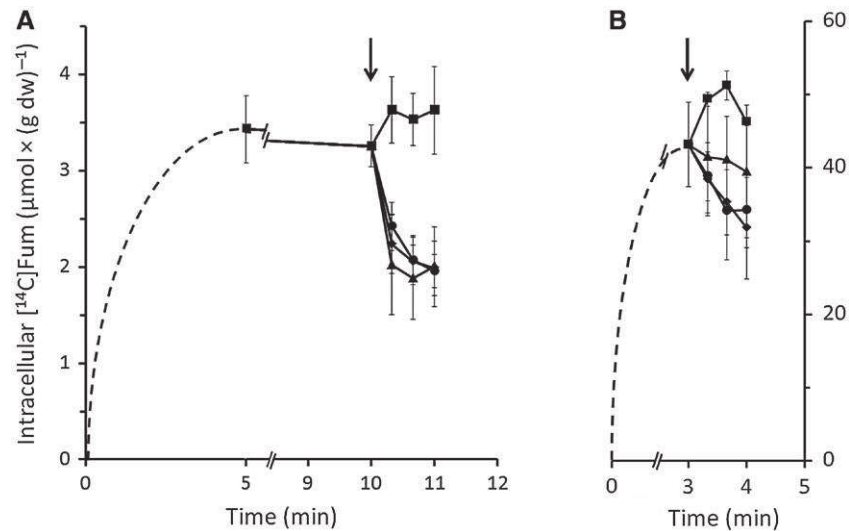


Fig. 5. Excretion of intracellular [^{14}C]fumarate from loaded bacteria by the addition of extracellular C_4 -dicarboxylates or related compounds. A. *E. coli* MDO800 (*dctA*) containing DcuA but not DctA. B. or IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*) containing DctA but not DcuA, were loaded with [^{14}C]fumarate by incubating a bacterial suspension for 10 or 3 min with 100 μM of the substrate. At the indicated time (vertical arrow), 2 mM of fumarate (-●-), succinate (-◆-), L-aspartate (-▲-) or asparagine (-■-) was added. At set time points before and after starting the antiport, the intracellular [^{14}C]fumarate content was determined by rapid filtration assay in three biological replicates with three repeats for each data point, and the standard deviation (error bars) is shown.

in transport assays. To test whether aerobically grown bacteria catalyze antiport as well, the excretion of intracellular [^{14}C]fumarate in antiport against extracellular L-aspartate or other C_4 -dicarboxylates was measured. For the excretion assay [^{14}C]fumarate was used since it was assumed that fumarate was a major product of the L-aspartate due to the action of aspartase AspA. A suspension of aerobically grown MDO800 (*dctA*) cells was incubated first with 100 μM [^{14}C]fumarate to load the bacteria with fumarate (Fig. 5). After saturation of the bacteria with [^{14}C]fumarate, a 20-fold excess of L-aspartate, fumarate, succinate or L-asparagine was added to the medium. Filtration assays were performed after increasing times to test for the remaining intracellular [^{14}C]fumarate. The addition of L-aspartate or succinate to the [^{14}C]fumarate loaded bacteria caused a rapid decrease in intracellular [^{14}C]fumarate (Fig. 5A). The addition of fumarate resulted in a slower decrease in intracellular [^{14}C]fumarate. L-Aspartate triggered the release of 43% of the internal fumarate within 40 s, demonstrating the efficiency of the L-aspartate_{ex}/fumarate_{in} exchange reaction. In contrast, asparagine was not able to decrease the intracellular [^{14}C]fumarate levels. Therefore, the antiport is specific and has a preference for the DcuA substrates. A DcuA-deficient strain that expressed DctA was very efficient in loading the cells with [^{14}C]fumarate (Fig. 5B), presumably due to transport by DctA and the lack of antiport by DcuA. The addition of external C_4 -dicarboxylates to these bacteria caused the release of internal [^{14}C]fumarate. The efflux, however, was slower, particularly

when external L-aspartate was the counter-flow substrate. Therefore, the antiport of external L-aspartate against internal fumarate has high activity only in the presence of DcuA. The corresponding experiment in a *dcuA dctA* double mutant failed because the bacteria were not able to accumulate sufficient [^{14}C]fumarate for the antiport studies.

The exchange of internal fumarate against external L-aspartate was also studied *in vivo* in growing bacteria. *E. coli* wild-type (AN387) was grown aerobically in M9 medium in the presence of glycerol with L-aspartate as the only source of nitrogen. Approximately 3 mM of L-aspartate was consumed when the bacteria reached an OD_{578} of 1 (Fig. 6). The bacteria produced and excreted nearly equimolar concentrations of fumarate, and some L-malate. The production of the C_4 -dicarboxylic acids and the consumption of L-aspartate was strongly decreased in the DcuA-deficient strain, whereas a lack of DctA had no negative effect on L-aspartate consumption and fumarate and L-malate production (Fig. 6). Therefore, the uptake of L-aspartate and the excretion of fumarate and malate apparently depended on DcuA.

The need for aspartase A during growth on L-aspartate as an N-source was tested by the use of an *aspA* mutant (Fig. 7A). In the *aspA* deletion mutant growth on glycerol with L-aspartate as the N-source is strongly decreased. Both strains growing at different rates, consume L-aspartate as the source of nitrogen, and the amount of L-aspartate consumed is similar in relation to the cell mass produced (Fig. 7B). With some variation, the amount of

fumarate excreted is related to the amount of L-aspartate consumed. Therefore, AspA is important but not essential for the use of L-aspartate as an N-source, indicating that

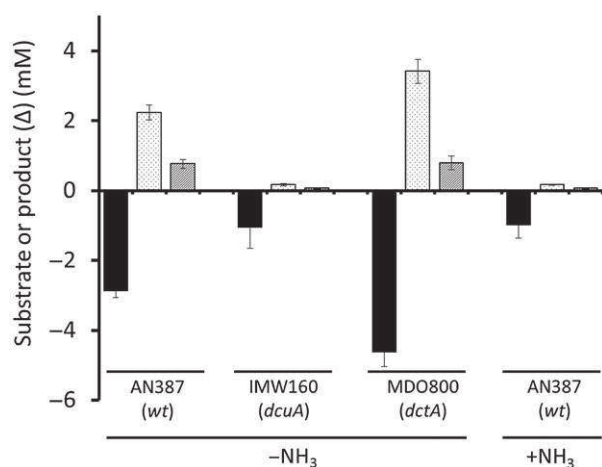


Fig. 6. Formation of fumarate or L-malate from L-aspartate by *E. coli* growing on M9 medium with glycerol plus L-aspartate. The bacteria were grown to an OD_{578} of 1. The presence of L-aspartate, fumarate and L-malate was determined in the supernatants before and after growth. The concentrations of L-aspartate consumed (black bars, negative values) and fumarate (white bars) or L-malate (gray bars) produced are given as the mean of two biological replicates with three replicate measurements. The error bars give the standard deviation. The L-aspartate, fumarate and L-malate concentrations before growth were $10.2 (\pm 0.4)$, $0.1 (\pm 0.2)$ and $0.1 (\pm 0.1)$ mM. The strains used for the experiments were AN387 (wild-type), MDO800 (*dctA*), and IMW160 (*dcuA dcuB dcuC*), as indicated. The presence (+) or absence (-) of ammonia (NH_3 , 20 mM) during growth is noted in the bottom line.

the nitrogen can be assimilated by a different pathway when AspA is missing. The alternative pathway delivers also high amounts of C_4 -dicarboxylates, in particular fumarate which is excreted, presumably by DcuA.

Expression and activity of DcuA in response to parameters of nitrogen metabolism

When the bacteria were grown aerobically in mineral medium with glycerol and L-aspartate as for the experiment of Fig. 6, and additionally ammonia, only small amounts of L-aspartate were consumed, and hardly any fumarate or L-malate was produced. The data indicate that ammonia represses the function of the nitrogen shuttle. The *dcuA* and *aspA* genes are expressed constitutively under many conditions (Golby *et al.*, 1998). In particular addition of Casamino acids or variation of the carbon source or the growth phase changed expression by factors below 1.4. Only switch to anaerobic growth exhibited a slightly higher effect (induction factor 1.7) (Golby *et al.*, 1998). Here expression was studied under conditions that are relevant for the role of DcuA as an aerobic L-aspartate or nitrogen shuttle (Fig. S1A). Addition of tryptone and peptone as rich nitrogen sources, ammonia, aspartate or asparagine had only minor effects on *dcuA-lacZ* expression (below 1.4-fold maximal induction). In a similar approach transport by DcuA was tested in *E. coli* after growth on glycerol plus L-aspartate with and without NH_3 . To reduce interference of transport by DctA, the DctA-deficient strain MDO800 was used (Fig. S1B).

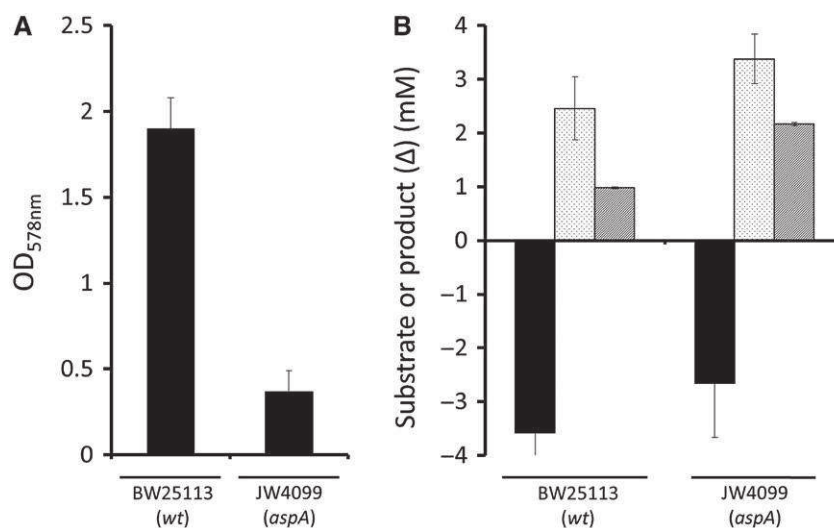


Fig. 7. Effect of *aspA* (aspartase) inactivation on growth after 24h (A) and (B) formation of extracellular fumarate from L-aspartate by *E. coli* growing on M9 medium (ammonia depleted) with glycerol (50 mM) plus L-aspartate (10 mM). The bacteria (*aspA* deletion strain JW4099 and the respective wildtype BW25113) were grown to an OD_{578} of 1. The presence of L-aspartate and fumarate was determined in the supernatants before and after growth were measured as described for Fig. 6. The concentrations of L-aspartate consumed (black bars, negative values) and fumarate (white bars) or L-malate (gray bars) produced are given as the mean of two biological replicates with three replicate measurements. The error bars give the standard deviation. The L-aspartate, fumarate and L-malate concentrations before growth were $9.34 (\pm 1.17)$ and $0.1 (\pm 0.1)$ mM.

The rates for [^{14}C]aspartate uptake were very similar for the bacteria grown with or without ammonia. Therefore neither expression of *dcuA* nor activity of DcuA is significantly regulated by the presence of ammonia in the medium, indicating that other sites have to be responsible for the decreased use of L-aspartate in the presence of ammonia.

Discussion

DcuA is responsible for the uptake of L-aspartate as a nitrogen source during aerobic growth

Here, a novel and specific function was identified for DcuA in aerobic metabolism.

DcuA is responsible for the uptake of L-aspartate as a nitrogen source during aerobic growth of *E. coli*. Remarkably, DctA, DauA, GltP, DcuB and DcuC, which are known to catalyze L-aspartate transport (Kay and Kornberg, 1971; Wallace *et al.*, 1990; Raunser *et al.*, 2006; Karinou *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2017), were not used for this function. The nearly complete loss of growth on L-aspartate in the *dcuA* mutant (Table S1) shows also that the ABC glutamate/aspartate transporter GltIJKL (Willis and Furlong 1975) has no significant role under these conditions. The periplasmic glutamate binding protein GltI of GltIJKL binds L-aspartate in addition to glutamate, but a role of the system in L-aspartate uptake and growth is not known (Willis and Furlong 1975; Kahane *et al.*, 1976). The transport of L-aspartate by DctA, that accepts preferentially succinate, fumarate and L-malate as the substrates, is presumably not sufficient under conditions when L-aspartate serves as a nitrogen source and is present at low concentrations. In addition, *dctA* is expressed preferentially in complex media and the late exponential growth phase (Davies *et al.*, 1999), which is adverse to growth in mineral media under nitrogen limitation. On the other hand, when L-aspartate is present at higher concentrations and serves as a carbon and energy source, DctA appears to be a major transporter (Fig. 1; see also Kay and Kornberg, 1971). Overall, DcuA is the essential transporter for the uptake of L-aspartate as a nitrogen source, whereas other transporters, such as DctA, only play minor roles.

DctA, the major transporter for C_4 -dicarboxylates, is important for L-aspartate transport at high substrate levels typical for the use as a carbon and energy source. There may be different reasons for the differential use of DcuA and DctA. First, DcuA appears to operate preferentially as an L-aspartate/ C_4 -dicarboxylate antiporter. Second, the activity of DcuA in C_4 -dicarboxylate uptake is low compared to that of DctA. Moreover, DctA is produced only in low amounts in mineral media and the early growth phase (Davies *et al.*, 1999). The inhibition of L-aspartate

consumption in the presence of ammonia (Fig. 6) might be a post-translational regulation of aspartase A by NtrB/NtrC and associated regulation (C. Schubert, A. Strecker and G. Uden, unpublished).

Kay (1971) reported that *E. coli* contains an L-aspartate transporter in addition to DctA. The transporter had some properties reminiscent of DcuA; it exhibited higher affinity for L-aspartate than C_4 -dicarboxylates, and transport was stimulated by activation (the addition of D-lactate to aerobically incubated bacteria), similar to the activity in the present study. Mutants in a gene termed 'ast' lost L-aspartate-specific transport (Kay, 1971). The 'ast' gene locus has not been identified or characterized (Blattner *et al.*, 1997; Keseler *et al.*, 2013), and it can be speculated that *ast* corresponds to *dcuA*. The 'ast' genes in Kay (1971) should not be confused with the *ast* genes encoding the arginine succinyl-transferase (AST) pathway of arginine catabolism (Schneider *et al.*, 1998).

DcuA serves as a N-shuttle (L-aspartate/fumarate antiport) during aerobic growth

The Dcu transporters, particularly DcuB, are known for their capacity to catalyze C_4 -dicarboxylate_{ex}/succinate_{in} antiport in fumarate respiration (Engel *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996; 1999; Janausch *et al.*, 2002). The growth and transport experiments show that DcuB and DcuA catalyze fumarate/succinate, L-malate/succinate, L-aspartate/succinate antiport with preferential use of DcuB for the two former and DcuA for the latter. The physiological function of DcuA in aerobic metabolism is different. DcuA catalyzes an L-aspartate/fumarate antiport that serves as a nitrogen shuttle for the supply of nitrogen for anabolic purposes. The C_4 -dicarboxylate backbone of the L-aspartate is mostly excreted when a preferred other carbon source like glycerol is available. Within *E. coli* aspartase AspA (Woods *et al.*, 1986; Golby *et al.*, 1998) appears to be the major enzyme for the release of the ammonia (Fig. 8, left). However, AspA is not the only or essential system for ammonia release in the bacteria since *aspA* mutants exhibit substantial growth with L-aspartate. It has been shown earlier that at least part of the ammonia from intracellular L-aspartate is released by a combination of the Krebs-Henseleit and AST pathways (Shaibe *et al.*, 1985; Goux *et al.*, 1995) (Fig. 8). In the pathway intermediate arginine is the source of ammonia and argininosuccinate the source of fumarate. Overall, the Krebs-Henseleit/AST pathways release ammonia and fumarate very similar to the aspartase reaction. The latter pathway for ammonia assimilation appears to be of significance in particular in late exponential growth (Sanchuki *et al.*, 2017). The bacteria excreted C_4 -dicarboxylates in nearly equimolar levels to the consumed L-aspartate in a DcuA-dependent manner. Therefore,

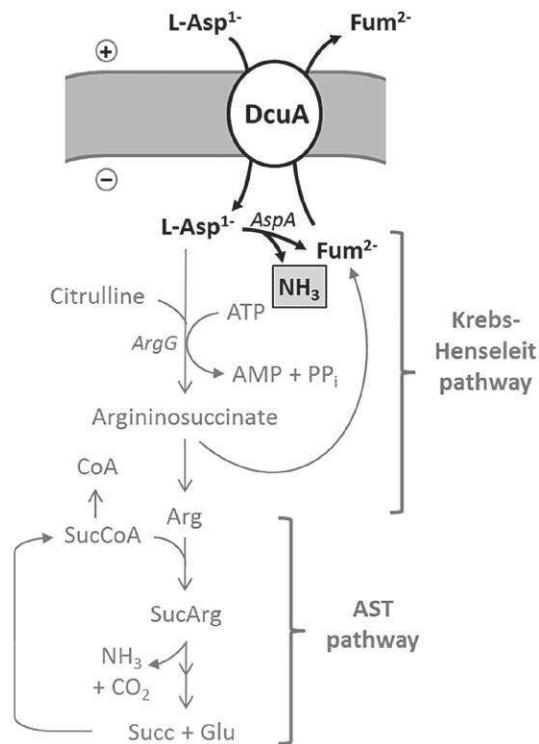


Fig. 8. Scheme for the function of DcuA as a nitrogen shuttle during aerobic growth, including pathways for production of ammonia and fumarate. Antiport by DcuA ($L\text{-Asp}_{\text{ex}} + \text{Fum}_{\text{in}} \rightarrow L\text{-Asp}_{\text{in}} + \text{Fum}_{\text{ex}}$) and aspartase ($L\text{-Asp}_{\text{in}} \rightarrow \text{Fum}_{\text{in}} + \text{NH}_{3(\text{in})}$) result in an overall reaction ($L\text{-Asp}_{\text{ex}} \rightarrow \text{Fum}_{\text{ex}} + \text{NH}_{3(\text{in})}$), that is, the net uptake of NH_3 coupled to the antiport of two C4-compounds (nitrogen shuttle). Fumarate and NH_3 rate are released from L-aspartate by the function of aspartase (AspA; main pathway, black). A minor route (presented in gray) uses the Krebs-Henseleit and the arginine succinyl-transferase (AST) pathway for release of fumarate and NH_3 (Shaibe *et al.*, 1985; Goux *et al.*, 1995). Ammonia released by AspA, but also from the AST route represents the source for ammonia assimilation (Shaibe *et al.*, 1985; Goux *et al.*, 1995). The fumarate produced by either the AspA or the AspA independent route (Krebs-Henseleit/AST reactions) is excreted by DcuA as shown in the present study.

DcuA performs L-aspartate/ C_4 -dicarboxylate antiport to supply nitrogen (but not carbon) and function as a nitrogen or ammonia shuttle. The C_4 -dicarboxylates serve only as the vehicle for nitrogen transport.

The consumption of 3 mM L-aspartate shown in the experiment of Fig. 6 was used for growth of an OD_{578} of 1. This OD corresponds to a cell mass production of 281 mg dry weight per liter (Engel *et al.*, 1992). The 42 mg of nitrogen supplied by the 3 mmol per liter of L-aspartate correspond to 14.5% of the dry mass (281 mg) of the bacteria. This is in strict agreement with the theoretical amount of nitrogen (14%) in cell dry mass (Fuchs 2014). Therefore the nitrogen supplied by the L-aspartate was completely assimilated, demonstrating the physiological role and significance of DcuA as a nitrogen shuttle for L-aspartate in aerobically grown *E. coli*.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The strains of *E. coli* K12 are listed in Table 1. The bacteria were grown aerobically at 37°C in minimal medium M9 (Miller, 1992) with or without NH_4Cl (20 mM). Growth studies were performed on plates in M9 medium with agarose. The substrates were supplemented as stated for the individual experiments using glycerol (50 mM), succinate (10 mM), sodium fumarate (10 mM), L-aspartate (5 or 10 mM) and/or L-malate (10 mM). Growth was measured as the optical density at 578 nm (OD_{578}). Growth for transport experiments was carried out under aerobic conditions in M9 medium plus glycerol to an OD_{578} of 1, or in LB medium to an OD_{578} of 2, as indicated for the individual experiments.

Transport assay

The bacteria were grown to the corresponding OD, harvested by centrifugation, washed in aerobic buffer (100 mM sodium potassium phosphate (pH 7), 1 mM MgSO_4), and resuspended in the same buffer at an OD_{578} of 7.0–8.0. When indicated, the cell suspension was ‘activated’ by the addition of glucose (20 mM) or glycerol plus dimethylsulfoxide (DMSO, 20 mM) for 5 min at 37°C immediately before the uptake assay. For the uptake assay, the bacteria were incubated with 100 μM [U^{14}C]-aspartate, 100 μM [$2,3\text{-}^{14}\text{C}$]-fumarate or 100 μM [$2,3\text{-}^{14}\text{C}$]-succinate. Uptake was stopped by transferring 100 μl of the cell suspension into 900 μl of ice cold stopping solution (LiCl, 0.1 M), followed by vacuum filtration through glass fiber filters (APFF, $\varnothing 25$ mm, pore size 0.7 μm , Millipore). The filters were washed twice with 1 mL LiCl (0.1 M, 0°C) and transferred into scintillation vials with 4 ml of scintillation liquid (Rotiszint® eco plus, Roth). The uptake activity was calculated from the radioactivity accumulated in the bacteria per gram of dry weight (OD_{578} of 1 corresponds to 281 mg/L) per minute and the specific radioactivity (Engel *et al.*, 1992; Zientz *et al.*, 1996).

The concentration dependence of aspartate or succinate uptake was determined by the addition of 500 μl of energized or non-energized cell suspension to 500 μl of a solution of 5 to 2000 μM [U^{14}C]-aspartate or [$2,3\text{-}^{14}\text{C}$]-succinate at 37°C in 1.5 ml reaction tubes. The uptake was stopped after 60 s, followed by vacuum filtration to count the intracellular labeled substrate as described above. For competition assays, uptake was determined as described above but the bacteria were incubated simultaneously with a mixture of unlabeled competitor (1 mM) and the labeled substrate (100 μM). To measure antiport, the cells were prepared as described above. After 3 or 10 min of incubation with 100 μM [$2,3\text{-}^{14}\text{C}$]-fumarate, unlabeled succinate, fumarate, aspartate or arginine (2 mM)

Table 1. Strains of *E. coli* and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Genotype	Reference or source
AN387	Wildtype	Wallace and Young (1977)
MDO800	AN387, but <i>dctA</i> ::SpcR	Davies <i>et al.</i> (1999)
IMW159	AN387, but <i>dcuA</i> ::SpcR, <i>dcuC</i> ::Tn10, CamR	Zientz <i>et al.</i> (1996)
IMW160	AN387, but <i>dcuA</i> ::SpcR, <i>dcuB</i> ::KanR, <i>dcuC</i> ::Tn10, CamR	This work
IMW213	AN387, but <i>dctA</i> ::SpcR, <i>dcuA</i> ::SpcR, <i>dcuB</i> ::KanR, <i>dcuC</i> ::Tn10, CamR	This work
IMW575	AN387, but <i>glfP</i> ::KanR, <i>dctA</i> ::SpcR	This work
IMW374	MC4100, but $\lambda(\Phi(\text{dcuB}'-\text{lacZ}))$, <i>dcuB</i> ::KanR, <i>dcuC</i> ::Tn10 (CamR)	Kim <i>et al.</i> (2007)
JRG2821	AN387, but <i>dcuA</i> ::SpcR	Six <i>et al.</i> (1994)
MC4100	F- <i>araD139</i> $\Delta(\text{argF-lac})$ U169, <i>rpsL150</i> , (ΔlacZ), <i>relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> (1984)
BW25113	$\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW4099	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$, λ^- , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, $\Delta\text{aspA765::kan}$, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW5189	$\Delta\text{ychM724::kanR}$,	Baba <i>et al.</i> (2006)
pASK IBA3plus	Expression plasmid with tet promoter and C-terminal Strep-tag, AmpR	IBA, Göttingen
pMW2586	<i>dcuA</i> from <i>E. coli</i> AN387 cloned in pASK IBA3plus with C-terminal Strep-tag, AmpR	This work
pJL29	p(<i>lacZ</i> , <i>bla</i> ^r) protein fusion vector	Lucht <i>et al.</i> (1994)
pMW2499	pJL29 with <i>dcuA</i> - <i>lacZ</i> fusion, AmpR	This work

was added and the remaining radioactivity determined after 20, 40 and 60 s in a filtration assay.

Determination of C₄-dicarboxylates in the medium

The bacteria were grown aerobically at 37°C in minimal medium M9 without NH₄Cl supplemented with glycerol (50 mM) and aspartate (10 mM) to the late exponential phase. After centrifugation, the supernatant was analyzed enzymatically according to the manuals of the MAK060 Fumarate and MAK067 Malate Assay Kits (Sigma Aldrich) or as stated by Bergmeyer *et al.*, (1983) for the spectrophotometric measurement of aspartate.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft to GU (UN 49/19-1). The work is dedicated to Dr R. Krämer (Köln) for long-standing support and input of ideas.

References

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., *et al.* (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 1–11.
- Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., and Grassl, M. (1983). *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 8, Metabolites 3. Lipids, Amino Acids and Related Compounds. Verlag Chemie.
- Blattner, F.R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453–1462.

- Cronan, J.J., and Laporte, D. (2005) Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *EcoSal Plus* **1**.
- Davies, S., Golby, P., Omrani, D., Broad, S.A., Harrington, V.L., Guest, J.R., *et al.* (1999) Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5624–5635.
- Engel, P., Krämer, R., and Uden, G. (1992) Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. *J Bacteriol* **174**: 5533–5539.
- Engel, P., Krämer, R., and Uden, G. (1994) Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*: Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. *Eur J Biochem* **222**: 605–614.
- Fuchs, G. (2014) *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart and New York: Thieme.
- Golby, P., Kelly, D.J., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1998) Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 6586–6596.
- Golby, P., Kelly, P., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1998) Topological analysis of DcuA, an anaerobic C₄-dicarboxylate transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 4821–4827.
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D.J., Guest, J.R., and Andrews, S.C. (1999) Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 1238–1248.
- Goux, W.J., Strong, A.A.D., Schneider, B.L., Lee, W.N.P., and Reitzer, L.J. (1995) Utilization of aspartate as a nitrogen source in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 638–646.
- Janausch, I.G., Zientz, E., Tran, Q.H., Kröger, A., and Uden, G. (2002) C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta*. **1553**: 39–56.

- Kahane, S., Marcus, M., Metzger, E., and Halpern, Y.S. (1976) Effect of growth conditions on glutamate transport in the wild-type strain and glutamate-utilizing mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **125**: 762–769.
- Karinou, E., Compton, E.L., Morel, M., and Javelle, A. (2013) The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C₄-dicarboxylic acid transporter. *Molec Microbiol* **87**: 623–640.
- Kay, W.W. (1971) Two aspartate transport systems in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **23**: 7373–7382.
- Kay, W.W., and Kornberg, H.L. (1969) Genetic control of the uptake of C₄-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **3**: 93–96.
- Kay, W.W., and Kornberg, H.L. (1971) The uptake of C₄-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **18**: 274–281.
- Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martinez, C., et al. (2013) EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucl Acids Res* **41**: D605–612.
- Kim, O.B., Lux, S., and Uden, G. (2007) Anaerobic growth of *Escherichia coli* on D-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the L-tartrate carrier TtdT and L-tartrate dehydratase. *Arch Microbiol* **188**: 583–589.
- Kröger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., and Lenger, R. (1992) Bacterial fumarate respiration. *Arch Microbiol* **158**: 311–314.
- Lucht, J. M., Dersch, P., Kempf, B., and Bremer, E. (1994) Interaction of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 6578–6586.
- Miles, J. S., and Guest, J. R. (1987) Molecular genetic aspects of the citric acid cycle of *Escherichia coli*. In *Krebs Citric Acid Cycle*. Kay, J., and Weitzman, P. D. J. (eds). London: The Biochemical Society, pp. 45–65.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Osterman, A. (2009) Biogenesis and homeostasis of nicotinamide adenine dinucleotide cofactor. *EcoSal Plus*. **2009**: 3.
- Rahman, M., Ismat, F., Jiao, L., Baldwin, J.M., Sharples, D.J., Baldwin, S.A., and Patching, S.G. (2017) Characterisation of the DAACS family *Escherichia coli* glutamate/aspartate-proton symporter GltP using computational, chemical, biochemical and biophysical methods. *J Membrane Biol* **250**: 145–162.
- Raunser, S., Appel, M., Ganea, C., Geldmacher-Kaufner, U., Fendler, K., and Kühlbrandt, W. (2006) Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* **45**: 12796–12805.
- Reed, J.L., Patel, T.R., Chen, K.H., Joyce, A.R., Applebee, M.K., Herring, C.D., et al. (2006) Systems approach to refining genome annotation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17480–17484.
- Sanchuki, H.B.S., Gravina, F., Rodrigues, T.E., Gerhardt, E.C.M., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., et al. (2017) Dynamics of the *Escherichia coli* proteome in response to nitrogen starvation and entry into the stationary phase. *Biochim Biophys Acta* **1865**: 344–352.
- Schneider, B.L., Kiupakis, A.K., and Reitzer, L.J. (1998) Arginine catabolism in the arginine succinyltransferase pathway of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 4278–4286.
- Shaibe, E., Metzger, E., and Halpern, Y.S. (1985) Metabolic pathway for the utilization of L-arginine, L-ornithine, agmatine, and putrescine as nitrogen sources in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**: 933–937.
- Silhavy, T., Berman, M., and Enquist, L. (1984) *Experiments with Gene Fusions*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Six, S., Andrews, S.C., Uden, G., and Guest, J.R. (1994) *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C₄-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). *J Bacteriol* **176**: 6470–6478.
- Uden, G., Strecker, A., Kleefeld, A., and Kim, O.B. (2016) C₄-Dicarboxylate utilization in aerobic and anaerobic growth. In: *EcoSal Plus* 2014. <https://doi.org/10.1128/EcosalPlus.ESP-0021-2015>.
- Wallace, B.J., and Young, I.G. (1977) Aerobic respiration in mutants of *Escherichia coli* accumulating quinone analogues of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta* **461**: 75–83.
- Wallace, B., Yang, Y.J., Hong, J., and Lum, B. (1990) Cloning and sequencing of a gene encoding a glutamate and aspartate carrier of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**: 3214–3220.
- Willis, R.C., and Furlong, C.E. (1975) Purification and properties of a periplasmic glutamate-aspartate binding protein from *Escherichia coli* K12 strain W3092. *J Biol Chem* **250**: 2574–2580.
- Woods, S.A., Miles, J.S., Roberts, R.E., and Guest, J.R. (1986) Structural and functional relationships between fumarase and aspartase. Nucleotide sequences of the fumarase (*fumC*) and aspartase (*aspA*) genes of *Escherichia coli* K12. *Bioch J* **237**: 547–557.
- Zientz, E., Six, S., and Uden, G. (1996) Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C₄-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: Role of the three Dcu carriers in uptake and exchange. *J Bacteriol* **178**: 7241–7247.
- Zientz, E., Bongaerts, J., and Uden, G. (1998) Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. *J Bacteriol* **180**: 5421–5425.
- Zientz, E., Janausch, I.G., Six, S., and Uden, G. (1999) Function of DcuC as the C₄-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3716–3720.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The *E. coli* dicarboxylic acid transporters DauA act as a signal transducer by interacting with the DctA uptake system

Eleni Karinou^{1,4}, Paul A. Hoskisson², Alexander Strecker³, Gottfried Uden³ & Arnaud Javelle^{1,2}

The Slc26A/SulP family of ions transporter is ubiquitous and widespread in all kingdom of life. In *E. coli*, we have demonstrated that the Slc26 protein DauA is a C₄-dicarboxylic acids (C₄-diC) transporter active at acidic pH. The main C₄-diC transporter active at pH7 is DctA and is induced by C₄-diC via the DcuS/R two component system. DctA interacts with DcuS, the membrane embedded histidine kinase, to transfers DcuS to the responsive state, i.e. in the absence of DctA, DcuS is permanently “on”, but its activity is C₄-diC-dependent when in complex with DctA. Using phenotypic characterization, transport assays and protein expression studies, we show that at pH7 full DctA production depends on the presence of DauA. A Bacterial Two Hybrid system indicates that DauA and the sensor complex DctA/DcuS physically interact at the membrane. Pull down experiments completed by co-purification study prove that DauA and DctA interact physically at the membrane. These data open a completely new aspect of the C₄-diC metabolism in *E. coli* and reveals how the bacterial Slc26A uptake systems participate in multiple cellular functions. This constitutes a new example of a bacterial transporter that acts as a processor in a transduction pathway.

Under aerobic conditions, *Escherichia coli* can oxidise C₄-dicarboxylic acids (C₄-diC, succinate, fumarate, malate, tartrate, aspartate and the aromatic monocarboxylate orotate) and use them as sole carbon and energy sources¹. At neutral pH, the main C₄-diC importer is DctA (TC 2.A.23.1.7), from the dicarboxylate/amino acid:cation symporter (DAACS) family of carriers. DctA has a wide repertoire of substrates (succinate, fumarate, malate, aspartate, tartrate, orotate)². It has been shown that a *dctA* mutant retains the ability to grow on succinate as the sole carbon source under acidic conditions, suggesting there is another succinate transporter encoded in the genome of *E. coli*³. We identified DauA (previously named YchM, TC 2.A.53.3.11) as the main transporter for C₄-diC (succinate/fumarate/aspartate) active under acidic conditions⁴ and in subsequent work, DauA from *Deinococcus geothermalis* was reported to act as a proton/fumarate symporter⁵, with the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium homologue displaying fumarate binding activity⁶. DauA belongs to the Solute Carrier 26 (Slc26) and sulphate transporter (SulP) family of ion transporters which is a superfamily of transporter proteins conserved from bacteria to man⁷. Proteins within the Slc26/SulP family are involved in various biological functions, transporting a broad spectrum of substrate, from ions to carboxylic acids^{8–10}. At least 10 Slc26 transporter have been identified in human, playing critical role in various cellular function and are medically relevant, acting as tumor suppressors or being involved diseases such as congenital chloride diarrhea, diastrophic dysplasia, Pendred syndrome and nonsyndromic deafness⁹. SulP proteins in fungi and plants are uptake system for sulfate^{11,12}. Members of the Slc26/SulP family are diverse in terms of substrate specificity and mechanism of transport but share a common protein structure. They contain an integral membrane domain containing two inverted repeats of seven transmembrane segments, resembling the fold of the uracil transporter, UraA, and a cytoplasmic

¹Division of Molecular Microbiology, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, DD1 5EH, UK.

²Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, 161 Cathedral Street, Glasgow, G4 0RE, UK. ³Institute for Microbiology and Wine Research, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany. ⁴Present address: Section of Microbiology and MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, London, United Kingdom. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.J. (email: arnaud.javelle@strath.ac.uk)

⁵Present address: Section of Microbiology and MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Imperial College London, London, United Kingdom. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.J. (email: arnaud.javelle@strath.ac.uk)

Sulfate Transporter and Anti-Sigma Factor Antagonist (STAS) domain^{5,13,14}. Although the function of the STAS domain has yet to be fully elucidated, it was thought to be important for targeting the proteins to the membrane. Recent work replaced the bacterial Slc26A transporters STAS domains with the green fluorescent protein (GFP) and demonstrated that the STAS domain does not play a direct role in protein targeting in bacteria, but rather it is required for protein stabilization and functionality^{14–17}.

We have demonstrated in a previous study that in *E. coli*, DauA and DctA were the main aerobic C₄-diC transporters under acidic and neutral conditions, respectively⁴. At pH7, the expression of *dctA* is induced by external C₄-diC via the DcuS-DcuR two-component regulatory system where DcuS is the membrane embedded histidine kinase and DcuR the DNA binding response regulator¹⁸. It has also been reported that DctA, via a cytoplasmic amphipathic helix (8b), interacts with the cytoplasmic PAS (Per, Arnt, Sim) domain of the membrane embedded sensor kinase DcuS¹⁹. It was proposed that DctA acts as a co-sensor in the DctA/DcuS complex¹⁹, however more recent studies indicates that DctA controls the functional state of DcuS such that in the absence of DctA, DcuS is permanently “on” but in the presence of DctA, the DcuS activity is dependent on the presence of external C₄-diC²⁰. Under anaerobic condition, the transporter DcuB takes over the role of DctA and interacts with DcuS²¹. We have shown that in the absence of DauA, at neutral pH, DctA expression and activity was reduced, indicating that DauA does not only transport C₄-diC at acidic pH but is also involved in the regulation of carboxylic acids metabolism⁴. Hence, the present study aimed to define the role of DauA in C₄-diC metabolism at neutral pH. Phenotypic characterization, *in vivo* assays of fumarate transport and studies of proteins expression provide compelling evidence that high-level of DctA production and activity depends on the presence of DauA at pH7. *In vivo* studies using a Bacterial Two Hybrid system (BTH) and fluorescence microscopy indicates that DauA and the sensor complex DctA/DcuS interact physically at the membrane to facilitate the cross-talk between the two systems. The complex formed by DauA and DctA/DcuS was further characterized biochemically. Surprisingly, co-purification/mass spectrometry analysis suggested that DauA interacts with DctA but not DcuS. This finding was confirmed *in vitro* by pull-down experiments. Finally, by co-expressing various truncated proteins in the BTH system, we show that DctA and DauA interact via their transmembrane domain and not their helix 8b and STAS domains respectively. This result reveals a completely new aspects of C₄-diC metabolism in *E. coli* and suggest a multifunctional role of DauA in *E. coli* physiology, possibly linking fatty acid and C₄-diC metabolism.

Results

DauA is necessary for activity/production of DctA at pH7. We have previously observed that a Δ *dauA* mutant is defective in growth at pH7 on minimal medium where succinate is the sole carbon source⁴. This led us to hypothesize that DauA plays a role in the regulation of C₄-diC metabolism at neutral pH. To test this hypothesis, we examined the monitored aerobic growth of the isogenic wild type and Δ *dauA*, Δ *dctA* and Δ *dauA*/ Δ *dctA* strains, on plates with minimal medium (pH7) containing 50 mM of either glucose or fumarate as the sole carbon source (Fig. 1A) for 24 hr at 37 °C. Although the wild type strain did not present any growth defect, the *dauA* mutant grew less well and the other two strains did not grow. As a control, it has to be noted that all four strains grew equally well in the presence of glucose (Fig. 1A). In order to quantify these phenotypes, we compared the growth in liquid eM9 medium of the same four strains at pH7, supplemented with 50 mM glucose (Fig. 1B) or 50 mM fumarate (Fig. 1C) as sole carbon source. All four strain grew equally well on glucose with a specific growth rate (μ) of = 0.13 h⁻¹ for the wild-type, Δ *dauA*, Δ *dauA*/ Δ *dctA* and 0.12 h⁻¹ for Δ *dctA* respectively (Fig. 1B). On fumarate as sole carbon source, the Δ *dauA* strain did not grow quite as well (μ) = 0.04 h⁻¹) as the wild-type strain (μ) = 0.07 h⁻¹), whilst the Δ *dctA* and the double mutant strains showed equally poorest growth (μ) = 0.01 h⁻¹; Fig. 1C). Together these data confirm that DctA is the main fumarate transporter at pH 7 and suggests that DauA is essential for full DctA activity/expression.

To understand whether DauA is essential for DctA activity or production, we measured the *in vivo* [¹⁴C]-fumarate uptake in the isogenic wild type and Δ *dauA*, Δ *dctA* and Δ *dauA*/ Δ *dctA* strains. [¹⁴C]-fumarate accumulation were measured by filtration after addition of 40 μ M [¹⁴C]-fumarate for six minutes. The cells trapped on the filter were washed and the level of radioactivity measured. These [¹⁴C] accumulation was measured performed after induction of the cells for 6 hr in fumarate at pH 7. The [¹⁴C]-fumarate uptake activity was linear over 6 mins for all of the strains tested (Fig. 1D), with the uptake activity for the wild-type strain being 17.7 \pm 2.8 nmol/min/OD₆₀₀ and the Δ *dauA* strain exhibiting 2.6-fold lower rates of uptake (6.7 \pm 1.0 nmol/min/OD₆₀₀). A negligible accumulation was measured for the Δ *dctA* and Δ *dauA*/ Δ *dctA* cells.

To assess whether the reduced DctA transport activity observed in the absence of DauA correlated with a decrease of DctA production, we examine the amount of DauA and DctA present when fumarate was supplied as the sole carbon source in a wild-type, Δ *dctA* and Δ *dauA* background respectively.

In order to measure the proteins production, we introduced, in the chromosome, an His tag fused with the C-terminal and of *dauA* in the wild-type and Δ *dctA* backgrounds and a fused with the C-terminal end of *dctA* in the wild-type and Δ *dauA* backgrounds.

The presence of this epitope tag did not affect both proteins function as the growth of the strains expressing Strains DauA-H₆ (μ) = 0.059 h⁻¹) and DctA-H₆ (μ) = 0.063 h⁻¹) on minimal medium containing fumarate as sole carbon source was similar to the growth to the strains producing the native forms of DauA and DctA (μ) = 0.071 h⁻¹), and likewise strains DauA-H₆, Δ *dctA* (μ) = 0.007 h⁻¹) and DctA-H₆, Δ *dauA* (μ) = 0.043 h⁻¹) present a similar growth compare to the strains producing untagged proteins (Figs 1C, 2A). To measure the presence of DctA in cells growing on fumarate, we grew strains overnight in M9 medium supplemented with glucose as the carbon source, washed then two time and subsequently cultured for 6 hrs on M9 minimal medium containing fumarate. We examined for the presence of DctA and DauA in the membrane fractions by Western immunoblotting using anti-His antibodies, with the constitutively expressed TatC used as a membrane protein loading control. DctA-H₆ and DauA-H₆ were only detected in the membrane, indicating that the proteins were correctly targeted to the membrane (data not shown). The production of DauA-H₆ was equivalent in the wild

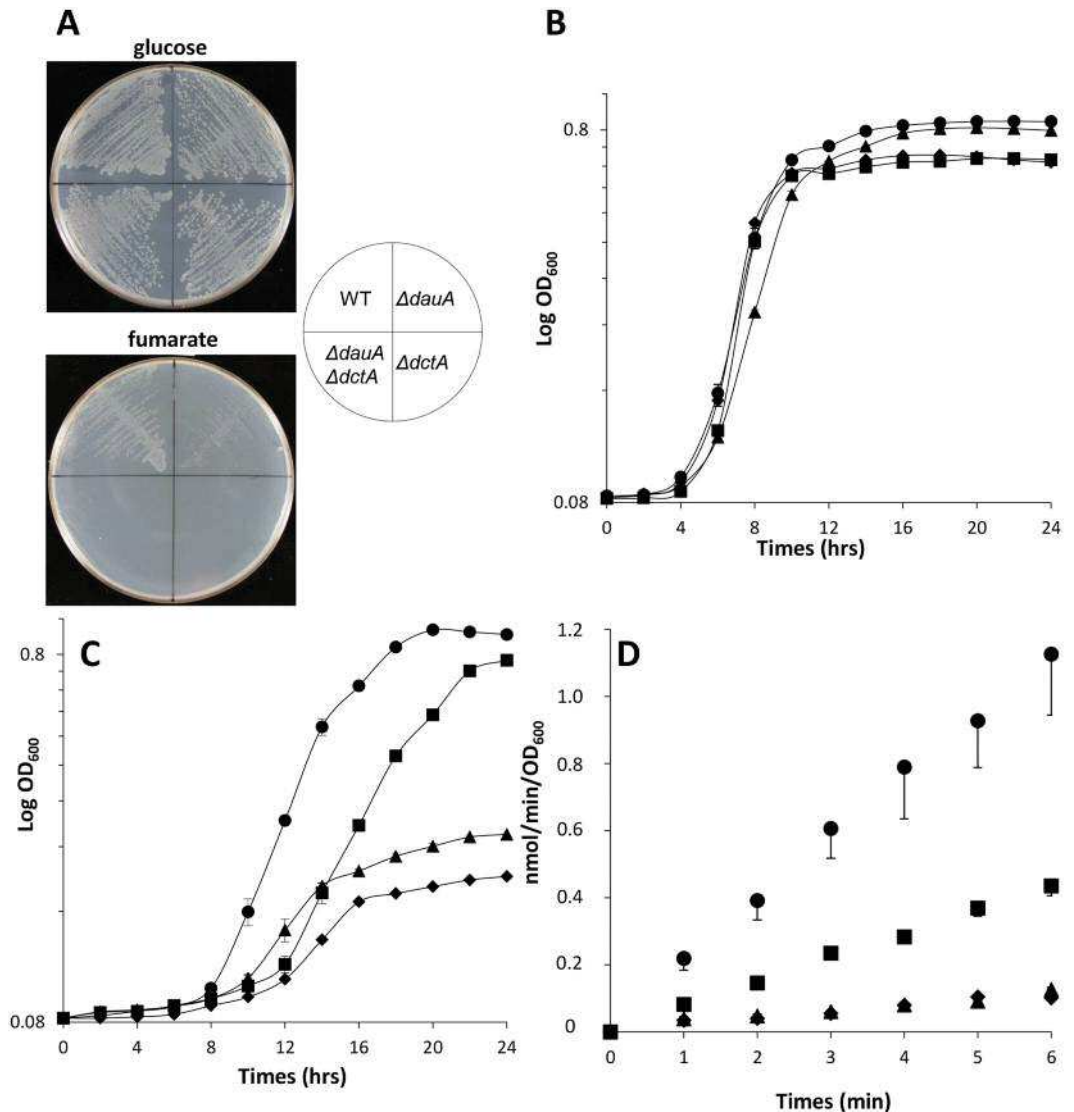


Figure 1. The production/activity of DctA depend on the presence of DauA. (A) Growth of the isogenic wild-type and $\Delta dctA$, $\Delta dauA$ and $\Delta dctA/\Delta dauA$ strains on MOPS minimal medium (pH 7) containing 50 mM of fumarate or glucose as sole carbon source. The plates were incubated for 24 hrs at 37°C. (B) The wild-type (●), $\Delta dctA$ (▲), $\Delta dauA$ (■) and $\Delta dctA/\Delta dauA$ (◆) strains grew in eM9 minimal medium at pH 7 containing 50 mM glucose as sole carbon source. Growth at 600 nm were monitored using microplates. All results are the averages of at least 4 independent test series. Error bars represent the standard deviation. (C) Same than B but the medium contained 50 mM fumarate as sole carbon source. (D) Time dependence of ^{14}C -fumarate accumulation in BW25113 (wild-type; ●), EK1 ($\Delta dauA$; ■), EK2 ($\Delta dctA$; ▲) and EK3 ($\Delta dctA/\Delta dauA$; ◆) strains. Measurements done after the cells were grew for 6 hrs in M9 containing 50 mM fumarate as the sole carbon source at pH 7. All results are the averages of at least 6 independent test series. Error bars represent the standard deviation.

type and $\Delta dctA$ strains (Fig. 2B). It was also apparent that less DctA-H₆ was produced in the DctA-H_{6 $\Delta dauA$ strain, suggesting that the presence of DauA is necessary for optimal DctA production (Fig. 2B). It also confirms our hypothesis in light of the data for the transport assay and the DauA-dependent phenotype observed in a $\Delta dauA$ strain in minimal medium with fumarate as sole carbon source.}

DauA interacts *in vivo* with the DctA/DcuS complex. It is known that DctA forms a complex at the membrane with the sensor kinase DcuS, the complex being localized at the poles of the cell. Hence we look at the localization of DauA to assess if it is also localized at the cellular pole. The subcellular localization of DauA was tested by *in vivo* fluorescence microscopy of a N-terminal fusion of DauA to monomeric mYFP. Expression of *mYFP-dauA* is under the control of the *ara* promoter. Bacteria grown with 10 μM or 50 μM arabinose showed fluorescence, but not those grown with 0 μM Ara. From bacteria induced with 10 μM or 50 μM arabinose 91 and 76 cells were analyzed for fluorescence (Fig. 3A). The bacteria were selected from 5 random sections each, and all bacteria within these sections were analyzed. From the bacteria grown with 10 μM arabinose 21% (19 of 91

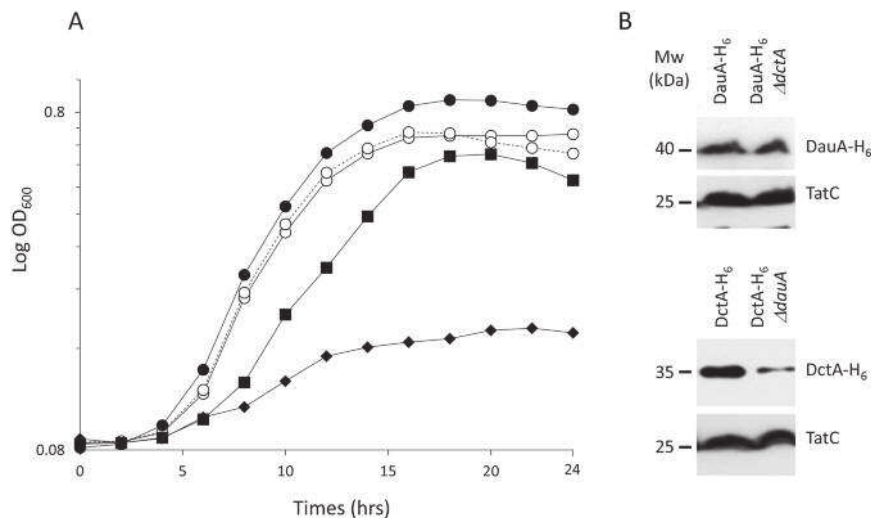


Figure 2. The presence of DauA is necessary for optimal DctA production. **(A)** The wild-type (●), DauA-H₆ (○), DctA-H₆ (dashed line), DauA-H₆ΔdctA (◆) and DctA-H₆ΔdauA (■) strains were grown in eM9 minimal medium at pH 7 containing 50 mM fumarate as sole carbon source and the curves at 600 nm were recorded using microplates. All results are the averages of at least 4 independent test series. **(B)** Membrane fractions were prepared from DctA-H₆, DctA-H₆ΔdauA, DauA-H₆, DauA-H₆ΔdctA after growth for 6 hrs in M9 minimal medium supplemented with 50 mM fumarate as sole carbon source at pH 7. Samples were subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting with an anti-His antibody. The same membranes were subsequently stripped and re-hybridized with a polyclonal anti-TatC antibody as a control.

cells) showed fluorescence, from the 50 μM arabinose grown 39% (30 of 76 cells). The green fluorescent spots of the mYFP fusion protein from all bacteria with fluorescence had polar localization (Fig. 3B–D), even in the bacteria with very low induction (10 μM arabinose). Polar localization depends on the fusion of mYFP to DauA, whereas free YFP is randomly distributed in the cellular cytoplasm. The polar localization is specific for DauA (Fig. 3) since membrane proteins with random distribution in the membrane like the Tar mutant Tar(1–331) show membraneous, but no polar localization³⁷. The amounts of mYFP-DauA that were present in the bacteria with polar localization were estimated by immunoblotting (Fig. S1). In the experiment the levels of mYFP-DauA were compared to chromosomally encoded DauA-His6. Expression of the chromosomal *dauA-his6* is under the control of the *dauA* promoter which causes expression of DauA-His6 at wild-type levels. The levels of YFP-DauA in the bacteria grown with 10 μM arabinose are very similar to those of *E. coli* expressing His6-DauA at pH 5 under succinate induction. Therefore the polar localization of mYFP-DauA which is shown in Fig. 3 is not due to artificial over-production or aggregation artifacts of the protein. This observation is in agreement with the model put forward that DauA interacts with the (polar) DctA/DcuS complex⁴.

Secondly, To identify any potential interaction between DauA and DctA and/or DcuS, we used a Bacterial Two Hybrid (BTH) system approach, utilising the functional reconstitution of adenylate cyclase (CyaA) from the separate T18 and T25 domains in an *E. coli cyaA*⁻ reporter strain²². In the BTH system, the two candidate proteins to be tested for interaction can be N- or C-terminal fused with the T18 or T25 domain of CyaA. Previous work in our group has shown that production of DauA may be affected by altering the N-terminus¹⁴. To avoid this we used the pUT18 and pKNT25 plasmids that result in C-terminal fusions of DauA, DctA and DcuS with the T18 and T25 domain. In this assay, we used the known interacting pair DctA-DcuS as a positive control (Fig. 4A – 252 miller units). The background activity (negative control) was measured by transforming the cell with non-interacting pairs and determined as being below 150 miller units (Fig. 4B). Interestingly, the activity measured for the pairs DauA-T18/DctA-T25 (1202 Miller units) and DcuS-T18/DauA-T25 (960 Miller units) were 5 and 4 times higher respectively than the positive control DcuS-T18/DctA-T25 (252 Miller units), and more than 8 times higher than the background activity (below 150 Miller units). The reciprocal pairings of DauA-T18/DcuS-T25 (408 Miller units) and DctA-T18/DauA-T25 (412 Miller units) also showed high β-galactosidase activity, suggesting there is interaction between DauA and DctA and DcuS. One concern when expressing membrane proteins from the high copy plasmid pUT18 is that they might saturate the cell membrane resulting in non-specific interactions. To verify that interactions between DauA and DctA and/or DcuS were specific, we tested the interaction between DauA and the membrane protein, AmtB. AmtB is an ammonium transporter which is not known to interact with any components of the C₄-diC acid metabolism. The β-galactosidase activity measured when DauA and AmtB were co-expressed in the reporter strain *cyaA*⁻ was below the background level (150 Miller units), suggesting the observed DauA interactions with DctA and DcuS are indeed specific.

DauA interacts *in vitro* with DctA but not DcuS. The data above suggest that DauA may physically interact with both DctA and DcuS. The explanation for this results is certainly due to the fact that the BTH reporter strain *cyaA*⁻ expresses chromosomally encoded DctA and DcuS. It is possible that the chromosomally encoded proteins interact with the T18/T25 chimeric proteins encoded by the plasmid. This means that

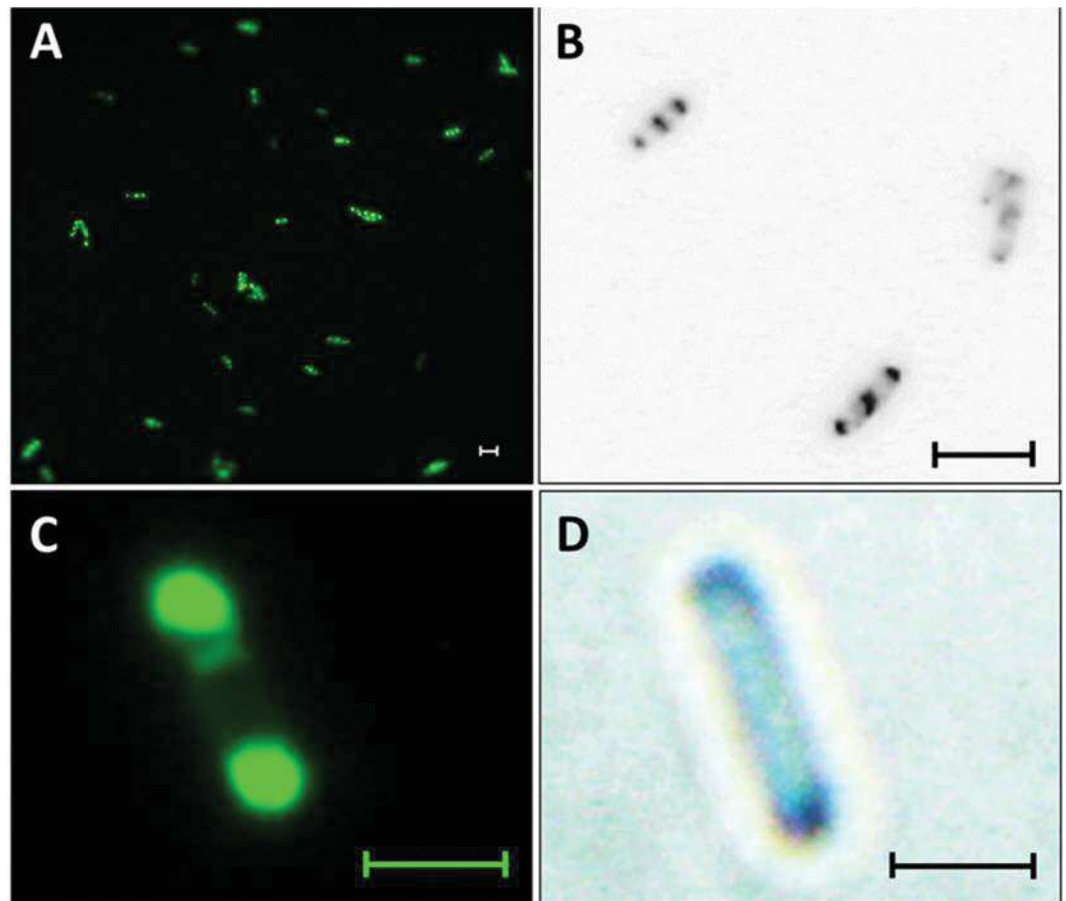


Figure 3. Polar localization of mYFP-DauA in *E. coli* EK1 (Δ dauA with plasmid pMW2010 encoding *his6-mYFP-dauA*). The bacteria were grown in the presence of 10 μ M (C, D) or 50 μ M (A, B) arabinose and analyzed by fluorescence microscopy, pictures B presented in black and white, blue coloring. (A) represents an overview, C and D single cells. The bars correspond to 5 μ M (A), 3.5 μ M (B), and 2.5 μ M (C, D).

DauA fused with the fragment T18 or T25 interact with the chromosomally encoded DctA which would bring DauA-(T18/T25) in close proximity with DcuS-(T18/T25) and thus gives positive result with the DauA/DcuS pair. The inverse may also explain the positive result i.e. DauA-(T18/T25) interacting with the chromosomally encoded DcuS that give a positive result with the DauA/DctA pair. Therefore, in order to distinguish whether DauA interact directly with DctA or DcuS, we sought to confirm the interaction biochemically. Through the expression of DauA at the native levels from the chromosome, we looked for proteins which co-purified with DauA, using DauA-H₆ and WT cells as a control. The cells were grown overnight in LB supplemented with fumarate as an inducer of DctA and DauA was purified initially by IMAC. The elution fractions of two biological replicates were analyzed by nano-liquid chromatography on-line coupled to mass spectrometry (nLC-MS/MS). Proteins identified in the non-tagged strain grown under the same conditions were considered non-specific and they were subtracted from the protein list. Proteins that were present in both biological replicates were considered as potential DauA interacting partners (Table 1). Firstly, DctA was identified in the list, but not DcuS supporting our hypothesis that DauA interacts with DctA. The low sequence coverage and small number of unique peptide detected for DctA and DauA reflect the difficulty in analysing integral membrane proteins by nLC-MS/MS.

To confirm that DauA and DctA are interacting *in vitro*, a strain harboring a chromosomally encoded His-tagged version of DauA and a chromosomally encoded FLAG-tagged version of DctA were used. The cells were grown overnight in LB supplemented with fumarate as an inducer for DctA expression and DauA was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). The eluted fractions were further purified by FLAG affinity chromatography with the presence of DauA and/or DctA in the fractions monitored by western blotting using anti-His or anti-FLAG antibodies. We hypothesized that if we re-purify the IMAC eluted fractions using an anti-FLAG matrix we should be still able to detect both DauA and DctA if these proteins interact *in vivo*. Initial IMAC purification detected DauA in the eluted fractions (Fig. 5). The membrane was subsequently stripped and reblotted using anti-FLAG antibody, revealing the presence of DctA in the same elution fractions (Fig. 5). The same fractions were analyzed for the presence of DcuS using a specific anti-DcuS antibody however no signal was detected, indicating that DauA does not interact with DcuS directly. Next, these elution fractions were purified using an anti-FLAG matrix. The western blot analysis of separate membranes for each antibody (His and FLAG) showed that DctA co-purified with DauA. We observed an apparent increase in molecular mass for

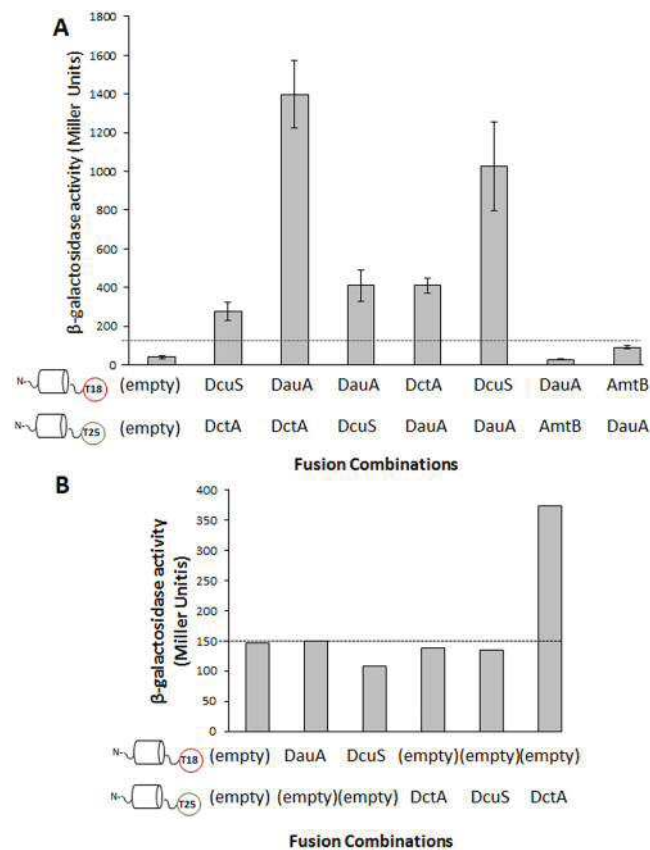


Figure 4. Interaction of DauA with DctA/DcuS. **(A)** β -galactosidase activity was used to quantify the BTH results. BTH101 (*cyaA*⁻ reporter strain) was co-transformed with the respective plasmid pairs. The activity measure for the pair DctA-T25/DcuS-18 was used as a positive control. All the results are the average of at least five independent biological repeats. Error bars represent standard error of the mean. **(B)** The background activity was measured by non-interacting pairs and was determined below 150 Miller units. The data presented are representative of one experiment.

both proteins following the second purification and is likely due to aggregation because of the acidic conditions used to elute the protein from the anti-FLAG matrix. Taken together, these data from the co-purification/mass spectrometry analysis and pull-down experiment confirmed that DauA and DctA interact physically *in vivo*.

DauA and DctA interact via their transmembrane domain. We have presented both *in vivo* and *in vitro* evidence that shows that DauA interacts with DctA. To identify the domains of both proteins involved in the interaction we exploited the BTH system. It is known that Slc26a proteins interact with various partners mainly via their STAS domain in plants, animals and bacteria^{23,24}. To test the potential involvement of DauA STAS domain in the interaction with DctA we generated plasmid constructs expressing a truncated DauA lacking the STAS domain (DauA₁₋₄₄₄) and plasmid constructs expressing only the STAS domain fused to the T18 or the T25 domain of adenylate cyclase. In *E. coli*, it has been shown the DctA interact with DcuS via its cytoplasmic amphipathic helix 8b (TM8)¹⁹. To test whether helix 8b is involved in complex formation between DctA and DauA, we expressed the TM8 of DctA fused at the N-terminus with MalE, and the T25 fragment on the C-terminus (Fig. 6). MalE is involved in maltose uptake and only active in the periplasm. When this construct was expressed, it was able to confer growth on maltose to a *malE* mutant indicating that the fusion to MalE is located in the periplasmic. β -galactosidase activity indicated a clear interaction of DauA₍₁₋₄₄₄₎ with DctA. Furthermore, no interaction was detected between DauA and helix 8b of DctA. Finally, the isolated STAS domain of DauA does not interact with DctA (Fig. 6). These results suggest that DauA and DctA interact primarily via their transmembrane domain.

Discussion

Interconnected functionality in bacteria physiology. The results presented in this study underpin a fundamental question in bacterial physiology; how microbes integrate various physiological inputs in order to maximize nutrient utilization, cell growth to rapidly adapt to their environment. In this context, an increasing number of reports have confirmed the existence of co-regulation between various metabolic pathways in bacteria²⁵⁻²⁷. The consequences of these co-regulatory mechanisms is to preserve a metabolic equilibrium by adjusting central metabolism to the challenge produced by changes to nutrient source, starvation and/or stress. Metabolic co-regulation represents a safety net that allows rapid reprogramming of metabolism to facilitate cell adaptation. Functional studies on bacterial DauA have identified various carboxylic acids, bicarbonate and sulfate

Gene	Description	Unique peptides detected	Seq. covered %
<i>atpF</i>	ATP synthase subunit b	2–3	16–23
<i>cls</i>	Cardiolipin synthase (CL synthase) (EC 2.7.8.-)	2–6	5–15
<i>dauA</i>	C ₄ -dicarboxylic acid transporter DauA	5–12	7–19
<i>dctA</i>	Aerobic C ₄ -dicarboxylate transport protein	2–4	8–25
<i>fruA</i>	PTS system fructose-specific EIIBC component (EIIBC-Fru)	1	3
<i>hflD</i>	High frequency lysogenization protein HflD	1–5	7–27
<i>lptB</i>	Lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB (EC 3.6.3.-)	1–5	8–32
<i>nikE</i>	Nickel import ATP-binding protein Nike (EC 3.6.3.24)	1–3	5–14
<i>ybhL</i>	Inner membrane protein YbhL	1	3
<i>ycaR</i>	UPF0434 protein YcaR	1–2	35
<i>zraS</i>	Sensor protein ZraS (EC 2.7.13.3)	1–2	6

Table 1. Potential DauA interacting partner identified by nLS-MS-MS.

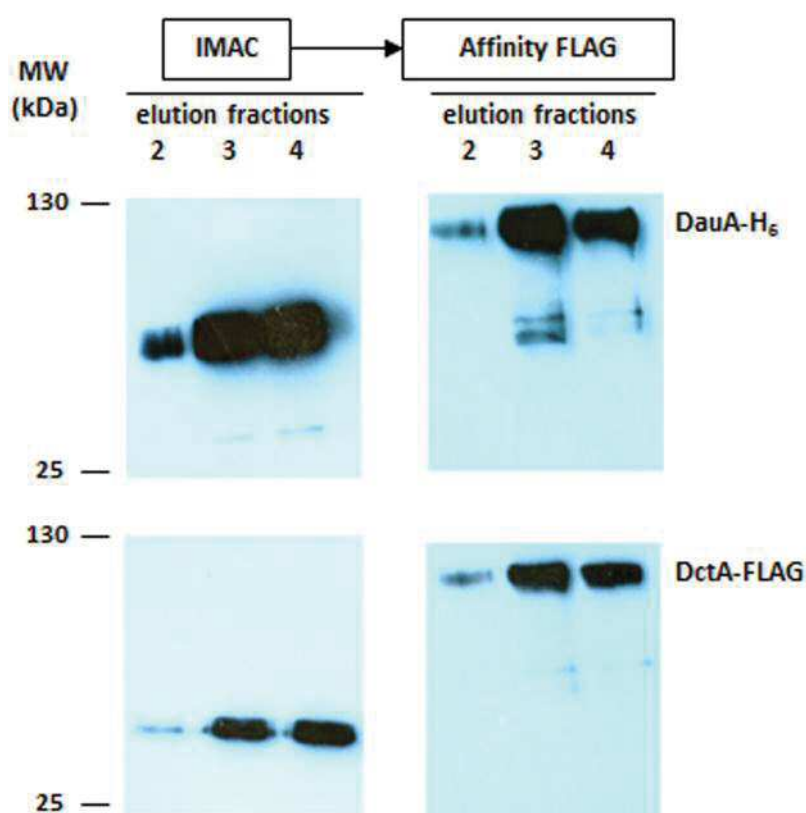


Figure 5. DauA and DctA form a complex. Chromosomally encoded C-terminally His-tagged DauA was purified by IMAC. Elution fractions were analyzed by Western immunoblotting using an anti-His antibody (top panel) and anti-FLAG antibody (bottom panel). The IMAC elution fractions were re-purified by FLAG affinity chromatography and analysed by Western blotting.

as substrates, highlighting the multifunctional roles of bacterial Slc26A transport systems^{4–6,24,28}. Also, it is now well documented that the Slc26A transporters may initiate multiple interactions with different partners^{8,29,30}. Hence, investigations aimed at identifying other potential DauA interacting partners, as well as investigating the interactome of bacterial Slc26A transporters may lead to the discovery of new important sensory and regulation mechanisms and reveal how these transporters participate in multiple cellular functions and potentially initiate metabolic co-regulation⁸. In *E. coli*, the co-purification and co-crystallization of the DauA STAS domain with the acyl-carrier protein suggest a role for DauA in fatty acid metabolism²⁴. Hence, our data point toward a novel mechanism of metabolic co-regulation linking fatty acid biosynthesis and C₄-diC acids metabolism. The interdependence of C₄-diC metabolism via the TCA cycle and fatty acid biosynthesis have been shown in a range of bacteria and results in adaptation of membrane structure to temperature stress^{31,32}. In this context it is noteworthy to note that in *Bacillus subtilis*, the stressosomes complex involved in the response to various stress (temperature, pH, osmolarity) is made of multiple copies of STAS domain containing proteins¹⁵.

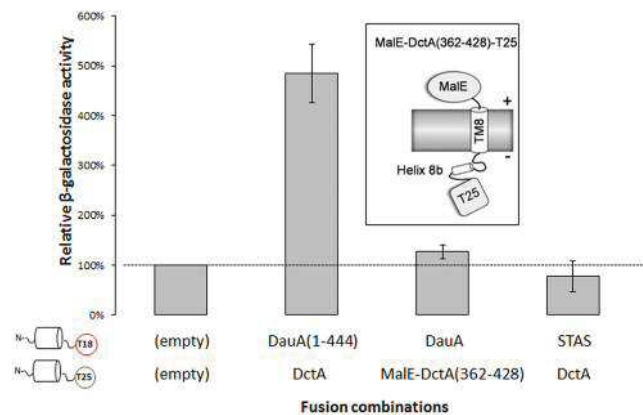


Figure 6. DauA sites required for interaction with DctA. β -galactosidase activity was used to quantify interaction. BTH101 cells co-transformed with the respective plasmid pairs. The activity was determined after growth in LB supplemented with the appropriate antibiotics. The activity measured from strain co-transformed with the two empty plasmids was used as a negative control. Activities are presented as percentage relative to the negative control. All results are the average of at least three independent biological repeats. Error bars represent the standard deviation. Insert: Topology of MalE -DctA Helix 8b fusion relative to the cytoplasmic membrane¹⁹.

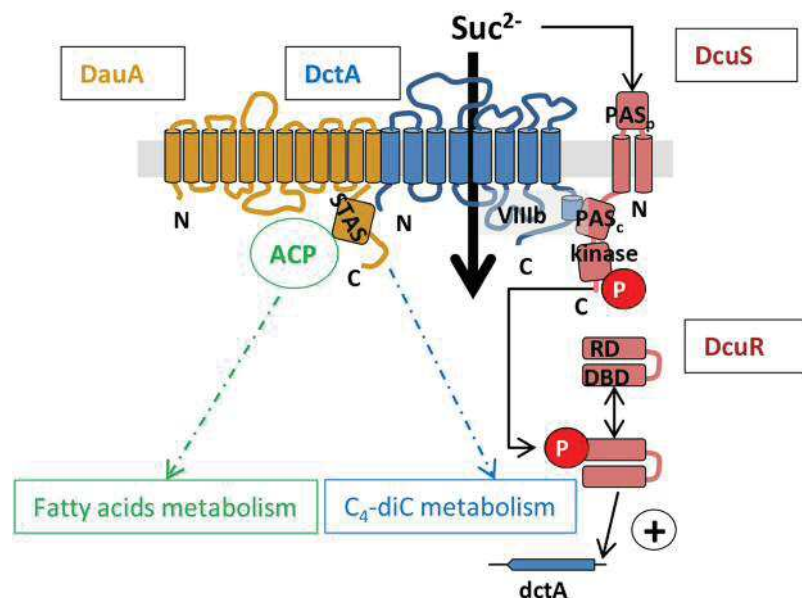


Figure 7. Model of the DauA/DctA complex function and integration of DauA in fatty acids and C_4 -diC metabolism. ACP: Acyl Carrier Protein, RD: regulator domain, DBD: DNA Binding Domain.

Model for DauA/DctA interaction. Based on our results, we propose a model for the function of DauA (Fig. 7).

Firstly, we have clearly shown, by phenotypic investigation, transport assay and western blot analysis that, when *E. coli* was grown at pH7 in minimal medium containing fumarate as sole carbon source, DauA was essential for optimal DctA function/expression. We have previously shown that, under our experimental conditions, the production of DctA dependent on the DcuS/DcuR two component system⁴.

Secondly, realization of the physical and functional interactions between bacterial C_4 -diC sensor kinases and transporters as accessory proteins has emerged in recent years and appears to be a common feature: in *E. coli*, under aerobic conditions, DctA forms a permanent complex with DcuS¹⁹. The role of DctA is to confer a fumarate-sensing function on DcuS (DcuS being constitutively “on” in the absence of DctA), hence the concept of an “sensitivity switch” for DctA²⁰. Under anaerobic conditions, the C_4 -diC transporter DcuB takes over the role of DctA and forms a functional complex with DcuS²¹.

Taking into account the above evidence, our first hypothesis was that, under our experimental conditions, DauA may form a complex with DcuS. Our results using the bacterial two-hybrid analysis are in line with this hypothesis, and indicate that DauA forms a complex with DcuS and/or DctA. In order to dissect the hierarchy of this complex, we used co-purification and mass spectrometry analysis, which showed to our surprise that DauA

interacts with DctA but not DcuS. This has been clearly confirmed by pull-down experiments and western blot analysis. Taken together, these results prove that DauA/DctA form a complex at the membrane. Whether DauA/DctA and DcuS form a tripartite complex at the membrane or the impact of DauA on DctA production occurs only via the DauA/DctA interaction remains to be determined. However, it has been shown that i) DctA and DcuS form a permanent complex, independently of their exposure to C₄-diC¹⁹, ii) the function of DctA in converting DcuS to the sensory active state is independent of its transport activity, that (iii) the site for perceiving the C₄-diC as the stimulus resides in DcuS^{19,20}, and iv) under our experimental condition, DctA production depends totally on the presence of DcuS⁴. Therefore it is unlikely that the effect of DauA is due to the modulation of DctA activity, but may rather impact the “switch” function of DctA within the DctA/DcuS complex (Fig. 7). Finally, DauA appears to be inactive at pH7, hence its function as a sensor is independent of its transport activity. There is an increasing number of bacterial sensors that require an uptake system for normal function and sensing in bacteria. In these system, the uptake system can act as activity switch, positive or negative reporter of transporter flux or a signaling hub for the integration of multiple input (for review see^{33,34}). In *E. coli*, the phosphate ABC transporter PtsSCAB₂ interacts with the two-component system PhoR/B for phosphate sensing³⁵, the hexose phosphate transporter UhpC interact with the sensor kinase UhpB³⁶, the carboxylic acids transporter DctA and DcuB interact with DcuS³⁷. Interestingly, in all these system, the sensing can be perceived by the transporter (PtsSCAB₂) or the sensor kinase (DctA/DcuB), but the uptake process is dissociated from the sensor function of the associated transporter.

Interaction of Slc26A protein with other secondary transporters. The STAS domains are the central structural features of the C-terminal cytoplasmic domains of Slc26 anion transport proteins. So far, all the interactions between SLC26A/SulP transporters and other proteins that have been identified in humans, plants and bacteria involved the STAS domain^{8,23}. We have shown here via BTH analysis that the DauA/DctA complex interaction is between DauA and DctA transmembrane domains of the two proteins uncovering a potentially novel mechanism of integrating physiological signals (Fig. 7). Investigations aiming to identify precisely the interacting interfaces between DauA and DctA are needed. However, the interaction of Slc26A/SulP transporters with proteins localized in the membrane in humans, plants and bacteria seems to be the rule rather than the exception^{8,24,38}. Particularly relevant, the direct interaction of various human Slc26A uptake systems with other transporters is now very well documented. Firstly, the existence of physical and functional interactions between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel and several members of the SLC26 family (*i.e.* SLC26A3, A4, A5, A6, A8 and A9) has been established^{8,29,30}. These interactions induce a reciprocal and unidirectional mechanism of regulation: stimulation or inhibition have been reported. Secondly, biochemical and functional analyses reveal interaction between SLC26A6/A3 and the citrate transporter NaDC-1³⁹. The interaction results in mutual and reciprocal regulation which suggests a senso-regulatory molecular mechanism for oxalate/citrate homeostasis. This is a remarkable example of the interaction and co-regulation of carboxylic acid transporters³⁹. Having the above in mind, it is quite tempting to speculate that bacterial SLC26A uptake systems, amongst which DauA, might have similar roles. The relationship between DauA/DctA complex formation and the presence of C₄-diC, as well as whether the transporters regulate each others activity remains unclear and needs further investigation.

Methods

Bacterial strains and growth conditions. The strains and plasmids used in this study are listed in Table 2.

E. coli was routinely cultivated on Luria-Bertani broth (LB), LB-agar⁴⁰, M9 minimal medium⁴¹ or enriched M9 (eM9) medium⁴². Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml and Chloramphenicol 30 µg/ml were used when required.

Strain EK9 was constructed as follows: a fragment corresponding to the the last 501-base pairs (bp) of *dctA* containing the FLAG tag before the termination codon and a fragment corresponding to the 500 bp sequence downstream of *dctA* were amplified by PCR and cloned simultaneously into pBluescript (Stratagene). The *dctA*(-FLAG)-tagged was subcloned into pMAK705 and transferred into the chromosome of EK4 as described⁴³.

Growth experiments. *E. coli* grew overnight in eM9 medium, washed twice in eM9 (carbon source free) at pH 7 and diluted to an OD₆₀₀ of 0.05 in eM9 medium containing the appropriate carbon source at the appropriate pH. Growth was monitored for 24 hrs using a Synergy 2 platereader (Biotek).

β-galactosidase assays. *E. coli* strains were cultured overnight in M9 minimal medium containing glucose as sole carbon source. The next day the cells were washed twice in carbon free M9 and diluted to an OD₆₀₀ of 0.6 in succinate-M9. After 6 hrs, cells were harvested for measurement of β-galactosidase activity. β-galactosidase activity was measure according to Karinou *et al.*⁴

Subcellular Fractionation. Cells were grown as for the β-galactosidase assays and fractionated according to procedures described previously⁴⁶. The DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) was used to measure protein concentration using bovine serum albumin as the standard.

Western immunoblotting. Anti-His antibody (Qiagen); anti-FLAG antibody (Sigma), rabbit polyclonal anti-TatC antibody (kind gift of T. Palmer) polyclonal rabbit anti-DcuS (G. Uden, unpublished) were use to detect the proteins and the Western blotting was performed as described previously⁴⁶. Proteins were detected using one of the following antibodies: anti-His antibody (Qiagen); anti- FLAG antibody (Sigma), rabbit polyclonal

Strains/ Plasmids	Genotype	Source
<i>E. coli</i> K-12		
WT (BW25113)	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}$, λ -, <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i>	44
EK1	BW25113, but ΔdauA	4
EK2	BW25113, but ΔdctA	4
EK3	BW25113, but $\Delta\text{dauA}/\Delta\text{dctA}$	4
EK4	BW25113 encoding DauA-His ¹	4
EK5	EK2 encoding DauA-His ¹	4
EK6	BW25113 encoding DctA-His ¹	4
EK7	EK1 encoding DctA-His ¹	4
EK9 IMW385	EK4 encoding DctA-FLAG ¹ MC4100, but $\lambda[\Phi(\text{dctA-lacZ})\text{hyb Amp}^{\text{R}}]$	This study 45
EK8	IMW385, but ΔdauA	4
Plasmid		
pBluescript-II KS+	Amp ^R	Stratagene
pMAK705	pSC101 derivative- rep(ts) - Cm ^R	43
pMW2031	<i>yfp(A206K)-dauA</i> with N-terminal His6-Tag, pBAD30 derivative (Amp ^R)	

Table 2. Strains and plasmid use in this work.

anti-TatC antibody raised against purified *E. coli* TatC protein (kind gift of T. Palmer) polyclonal rabbit anti-DcuS raised against purified *E. coli* DcuS (G. Unden, unpublished).

Bacterial two-hybrid (BTH) system. This genetic screening is based on the reconstitution, in an *E. coli* *cyaA*⁻ strain (deficient in endogenous adenylate cyclase), of a signal transduction pathway that takes advantage of the positive control exerted by cAMP. Two putative interacting proteins are genetically fused to two complementary fragments, T25 and T18, which constitute the catalytic domain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Association of the two-hybrid proteins results in functional complementation between T25 and T18 fragments and leads to cAMP synthesis. Cyclic AMP then triggers transcriptional activation of catabolic operons, such as lactose or maltose. *E. coli* *cyaA*⁻ are unable to ferment maltose: they form white colonies on MacConkey indicator media containing maltose, while *cyaA*⁺ bacteria form red colonies on the same media (the fermentation of maltose results in the acidification of the medium which is revealed by the colour change of the dye phenol red)²².

Plasmids harboring fusion proteins to T18 and T25 were co-transformed in *E. coli* *cyaA*⁻ strain BTH101 and plated onto MacConkey medium supplemented with maltose, and cultured at 30 °C for 48 h. Red colonies signified possible interactions. An average colony was inoculated in 5 ml LB medium supplemented with appropriate antibiotics, and grown overnight at 30 °C. The next day potential interactions were quantified measuring β -galactosidase activity.

Fluorescence microscopy. For the expression of mYFP-DauA plasmid pMW2031 encoding a fusion of His6-mYFP (monomeric YFP(A206) variant) to the N-terminus of DauA (His6-mYFP-DauA) was transformed into strain EK1. The cells EK4 or EK1pMW2031 were grown at pH 5 in M9 medium (Miller 1992) with 50 mM Na-succinate and arabinose (as indicated) to OD₅₇₈ of 0.8. The membrane fraction (Janausch *et al.* 2002) (10 to 30 μ g of protein) was subjected to SDS PAGE and DauA-His6 or His6-mYFP-DauA were detected in the Western blot by antibodies against the His6-tag (monoclonal first antibody (H-3), Santa Cruz) and m-IgG_K BP-HRP (second antibody, Santa Cruz) as the second antibody. For microscopy the bacteria were grown aerobically at 30 °C in LB medium (Miller 1992) supplemented with ampicillin (100 μ g/ml). Overnight cultures were diluted 1/50 and grown to mid-exponential growth phase (OD₅₇₈ 0.8). Then the bacteria were induced by 0, or 10 or 50 μ M L-arabinose for one hour. 5 μ l of the culture was washed and resuspended in 1x PBS buffer. The cells were fixed on microscope slides that were freshly coated with a thin layer of 1% agarose and covered with a coverslip. *In vivo* fluorescence microscopy was conducted with a Keyence Biozero BZ-8000 microscope.

***In vivo* [¹⁴C]-fumarate transport assays.** *In vivo* [¹⁴C]-fumarate transport assays were adapted from⁴⁷. Briefly, cells were cultured in the same way as for the β -galactosidase assays using the carbon source and pH indicated. After 6 hrs, cells were harvested, washed twice in M9 minimal medium without carbon source and resuspended in the same medium to give a final OD 600 nm of 0.6. At zero time [¹⁴C]-fumarate (55 mCi/mmol). Samples of 300 μ l were taken at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 min, and uptake was terminated by filtration through nitrocellulose filters (Millipore type HA; 0.45 μ m pore size) under a constant vacuum. The radioactivity present on the filter was determined using a scintillation counter. Data were calibrated by using internal standards spotted on filters and counted in the same experiment.

Purification of DauA for mass spectrometry analysis. EK2 cells were grown overnight in 3 L LB medium supplemented with fumarate for the induction of DctA. The next day the cells were pelleted by centrifugation, resuspended in lysis buffer A (Tris 50 mM, pH7.6, 100 mM NaCl, 0.05 M EDTA) and lysed with a constant cell disrupter (three passes at 20 kpsi). Cell debris was removed by centrifugation at 20,000 g for 45 min and the supernatant was further centrifuged at 20,000 g for 2 h. The pelleted membrane fraction was resuspended

and membranes proteins were extracted with 2% DDM for 1 h at 4 °C and loaded onto a Co²⁺-affinity column (HisTrap, GE Healthcare). The protein was purified using an FPLC (AKTA purifier -GE Healthcare).

DauA/DctA pull down. EK9 cells were grown and the membrane proteins were extracted as described above. Solubilized membrane proteins were incubated with cobalt coated sepharose beads and incubated for 1 h at 4 °C. DauA-His was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) and eluted using 500 mM imidazole. The elution fractions were further purified using Anti-FLAG[®] M2 affinity Gel (Sigma) according to the manufacturer's instructions and protein was eluted using 0.1 M glycine HCl pH 3.

Data Availability. The data generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Unden, G. & Kleefeld, A. C4-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus* **1**, doi:10.1128/ecosalplus.3.4.5 (2004).
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kroger, A. & Unden, G. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*. **1553**, 39–56 (2002).
- Janausch, I. G., Kim, O. B. & Unden, G. DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers. *Arch. Microbiol.* **176**, 224–230 (2001).
- Karinou, E., Compton, E. L., Morel, M. & Javelle, A. The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. *Mol. Microbiol.* **87**, 623–640 (2013).
- Geertsma, E. R. *et al.* Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 803–808 (2015).
- Srinivasan, L., Baars, T. L., Fendler, K. & Michel, H. Functional characterization of solute carrier (SLC) 26/sulfate permease (SulP) proteins in membrane mimetic systems. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 698–705 (2016).
- Saier Jr, M. H. *et al.* Phylogenetic characterisation of novel transport protein families revealed by genome analysis. *Biochem. Biophys. Acta*. **1422**, 1–56 (1999).
- Alper, S. L. & Sharma, A. K. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol. Aspects Med.* **34**, 494–515 (2013).
- Mount, D. B. & Romero, M. F. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch.* **447**, 710–721 (2004).
- Romero, M. F. *et al.* Physiology of electrogenic SLC26 paralogues. *Novartis Found Symp* **273**, 126–138; discussion 138–147, 261–124 (2006).
- Hawkesford, M. J. & De Kok, L. J. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ.* **29**, 382–395 (2006).
- Loughlin, P., Shelden, M. C., Tierney, M. L. & Howitt, S. M. Structure and function of a model member of the SulP transporter family. *Cell Biochem. Biophys.* **36**, 183–190 (2002).
- Compton, E. L., Karinou, E., Naismith, J. H., Gabel, F. & Javelle, A. Low resolution structure of a bacterial SLC26 transporter reveals dimeric stoichiometry and mobile intracellular domains. *J. Biol. Chem.* **286**, 27058–27067 (2011).
- Compton, E. L. *et al.* Conserved structure and domain organization among bacterial Slc26 transporters. *Biochem. J.* **463**, 297–307 (2014).
- Sharma, A. K., Rigby, A. C. & Alper, S. L. STAS domain structure and function. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 407–422 (2011).
- Birke, A. S. & Javelle, A. Prestin and the good vibrations. *Biochem. J.* **473**, 2425–2427 (2016).
- Lolli, G., Pasqualetto, E., Costanzi, E., Bonetto, G. & Battistutta, R. The STAS domain of mammalian SLC26A5 prestin harbours an anion-binding site. *Biochem. J.* **473**, 365–370 (2016).
- Davies, S. J. *et al.* Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 5624–5635 (1999).
- Witan, J. *et al.* Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol. Microbiol.* (2012).
- Steinmetz, P. A., Worner, S. & Unden, G. Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C4-dicarboxylate sensor. *Mol. Microbiol.* **94**, 218–229 (2014).
- Worner, S. *et al.* Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C4-dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environ. Microbiol.* **18**, 4920–4930 (2016).
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5752–5756 (1998).
- Aravind, L. & Koonin, E. V. The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr. Biol.* **10**, R53–R55 (2000).
- Babu, M. *et al.* Structure of a SLC26 anion transporter STAS domain in complex with acyl carrier protein: implications for *E. coli* YchM in fatty acid metabolism. *Structure* **18**, 1450–1462 (2010).
- Huergo, L. F. & Dixon, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**, 419–435 (2015).
- Okahashi, N., Kajihata, S., Furusawa, C. & Shimizu, H. Reliable Metabolic Flux Estimation in *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism Using Intracellular Free Amino Acids. *Metabolites* **4**, 408–420 (2014).
- Shimizu, K. Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites* **4**, 1–35 (2013).
- Price, G. D., Woodger, F. J., Badger, M. R., Howitt, S. M. & Tucker, L. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 18228–18233 (2004).
- Chang, M. H. *et al.* Slc26a9 is inhibited by the R-region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via the STAS domain. *J. Biol. Chem.* **284**, 28306–28318 (2009).
- Homma, K. *et al.* Interaction between CFTR and prestin (SLC26A5). *Biochimica et biophysica acta* **1798**, (2010).
- Jung, S., Zeikus, J. G. & Hollingsworth, R. I. A new family of very long chain alpha,omega-dicarboxylic acids is a major structural fatty acyl component of the membrane lipids of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *J Lipid Res* **35**, 1057–1065 (1994).
- Jung, S., Lowe, S. E., Hollingsworth, R. I. & Zeikus, J. G. Sarcina ventriculi synthesizes very long chain dicarboxylic acids in response to different forms of environmental stress. *J. Biol. Chem.* **268**, 2828–2835 (1993).
- Piepenbreier, H., Fritz, G. & Gebhard, S. Transporters as information processors in bacterial signalling pathways. *Mol. Microbiol.* **104**, 1–15 (2017).
- Tetsch, L. & Jung, K. The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol. Microbiol.* **73**, 982–991 (2009).
- Hsieh, Y. J. & Wanner, B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol* **13**, 198–203 (2010).

36. Schwoppe, C., Winkler, H. H. & Neuhaus, H. E. Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. *FEBS J.* **270**, 1450–1457 (2003).
37. Unden, G., Worner, S. & Monzel, C. Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling: The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.* **68**, 139–167 (2016).
38. Shibagaki, N. & Grossman, A. R. Binding of cysteine synthase to the STAS domain of sulfate transporter and its regulatory consequences. *J Biol Chem* **285**, 25094–25102 (2010).
39. Ohana, E., Shcheynikov, N., Moe, O. W. & Muallem, S. SLC26A6 and NaDC-1 transporters interact to regulate oxalate and citrate homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1617–1626 (2013).
40. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
41. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119 (1985).
42. Kramer, J. *et al.* Citrate sensing by the C4-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: binding site and conversion of DcuS to a C4-dicarboxylate- or citrate-specific sensor. *J. Bacteriol.* **189**, 4290–4298 (2007).
43. Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P. & Kushner, S. R. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 4617–4622 (1989).
44. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 2006 0008, (2006).
45. Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Kramer, J. & Unden, G. The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* **284**, 265–275 (2009).
46. Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D. & Merrick, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.* **21**, 536–545 (2002).
47. Jack, R., de Zamaroczy, M. & Merrick, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of nif expression in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**, 1156–1162 (1999).

Acknowledgements

We thank Prof. Iain Hunter (SIBPS, Strathclyde University) for helpful comments on the manuscript. EK was supported by a studentship from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council doctoral training grant [BB/F017022/1] and AJ by a Medical Research Council new investigator grant (G1000054), a Scottish government/Royal Society of Edinburgh personal research fellowship and a chancellor fellowship from Strathclyde University. PAH would like to acknowledge the support of the Natural Environment Research Council (Grant: NE/M001415/1).

Author Contributions

E.K., G.U. and A.J., designed the experiments. E.K., A.S. and A.J. conducted the experiments. E.K., A.J. and G.U. analyse the data. A.J. wrote the manuscript. All authors contributed to discussion about the results and reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16578-w>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

11. Veröffentlichungen und Präsentationen

11.1. Veröffentlichungen

Strecker, A., Schubert, C., Zedler, S., Steinmetz, P., & Uden, G. (2018). DcuA of aerobically grown *Escherichia coli* serves as a nitrogen shuttle (L aspartate/fumarate) for nitrogen uptake. *Molecular microbiology*.

Karinou, E., Hoskisson, P. A., Strecker, A., Uden, G., & Javelle, A. (2017). The *E. coli* dicarboxylic acid transporter DauA act as a signal transducer by interacting with the DctA uptake system. *Scientific reports*, 7(1), 16331.

Wörner, S., Strecker, A., Monzel, C., Zeltner, M., Witan, J., Ebert Jung, A., & Uden, G. (2016). Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C₄ dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environmental microbiology*, 18(12), 4920-4930.

Uden, G., Strecker, A., Kleefeld, A., & Kim, O. B. (2016). C₄-Dicarboxylate Utilization in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus*, 7(1).

Graf, S., Broll, C., Wissig, J., Strecker, A., Parowatkin, M., & Uden, G. (2016). CitA (citrate) and DcuS (C₄-dicarboxylate) sensor kinases in thermophilic *Geobacillus kaustophilus* and *Geobacillus thermodenitrificans*. *Microbiology*, 162(1), 127-137.

11.2. Poster

Strecker, A., Steinchen, W. und Uden G. (2018). Signal transduction by the fumarate sensor DcuS across the membrane and to the kinase domain. 9th meeting in the series: Bacterial electron transfer processes and their regulation. Saint Tropez.

Strecker, A. und Uden G. (2017). The role of the anaerobic C₄-dicarboxylate-transporters DcuA, DcuB and DcuC on transport and regulation in *Escherichia coli*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Würzburg

Strecker, A. und Uden G. (2016). Transport and regulation by the anaerobic C₄-Dicarboxylate-Transporters in *Escherichia coli*. 31. Konferenz der Tagungsserie: Mechanisms of Gene Regulation, Bad Bergzabern

Strecker, A., Monzel, C. and Uden G (2016). Sensing and signal transduction by the C₄-dicarboxylate sensor histidine kinase DcuS of *E. coli*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jena

13. Danksagung

Herrn Prof. [REDACTED] danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Herzlichen Dank für Ihre Hilfsbereitschaft sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Vielen Dank für Ihre exzellente Betreuung, Anregungen und Ratschläge.

Herrn Prof. [REDACTED] danke ich für das Erstellen des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Frau Dr. [REDACTED] danke ich für die praktische und theoretische Heranführung an das Complexome Profiling.

Herrn Dr. [REDACTED] danke ich für die gute Zusammenarbeit und für die Durchführung der HDX-MS Experimente.

Dr. [REDACTED] danke ich für großartige Jahre an der Universität Mainz. Vielen Dank für deine Unterstützung in den unterschiedlichsten Situationen.

Vielen Dank [REDACTED] für die gute Zusammenarbeit. Es hat mir viel Spaß gemacht mit dir zu arbeiten.

Ein Dankeschön geht auch an [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

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)