

**Der C₄-Dicarboxylat- und Citratsensor
DcuS aus *Escherichia coli* –
Signalerkennung und Regulation**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Jens Krämer
geb. am 19.03.1978 in Mainz

Mainz, April 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.08

Inhalt

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
3. Material und Methoden.....	9
3.1. Verwendete Stämme von <i>E. coli</i>	9
3.2. Zucht und Medien	11
3.3. Molekulargenetische Methoden	17
3.5. Biochemische Methoden	29
4. Ergebnisse	38
4.1 Citraterkennung durch die C ₄ -Dicarboxylat-/Citrat-Sensorkinase DcuS.....	38
Unterscheidung von DcuS und CitA durch Subtyp-spezifische Aminosäurereste	39
Effektorspezifität von DcuS (Wildtyp, DcuS _{DC} und DcuS _{Cit})	49
Ergänzende Charakterisierung von C ₄ -Dicarboxylat- und Citrat-spezifischem DcuS ...	51
Affinität von DcuS für Thiomalat.....	52
Strukturuntersuchungen von Citrat-spezifischem DcuS	53
4.2 Konstruktion von Hybridproteinen aus DcuS und CitA	57
4.3 Der Antiporter DcuB als zusätzliche Signaleingangsstelle des DcuSR-Systems	61
Effekt von DcuB auf die Erkennung von spezifischen DcuS-Mutanten	65
4.4 Analyse der Osmostress-Antwort von DcuS.....	69
4.5 Strukturuntersuchungen von verkürztem DcuS	72
4.6 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR	75
Kinetik der Autophosphorylierung von rekonstituiertem DcuS	79
Phosphattransfer von DcuS auf DcuR	80
Dephosphorylierung von DcuR-P	82
4.7 Einfluss von CitA auf die Induktion DcuSR-regulierter Gene durch Citrat	85
5. Diskussion	89
Erkennung von Citrat durch die C ₄ -Dicarboxylat-Bindestelle von DcuS.....	89
Der Antiporter DcuB als akzessorischer Sensor in der DcuSR-abhängigen Regulation ..	94
Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR	98
6. Literatur.....	103
7. Anhang.....	113
8. Veröffentlichungen.....	115

1. Zusammenfassung

Das Zweikomponentensystem DcuSR aus *Escherichia coli* reguliert in Abhängigkeit von C₄-Dicarboxylaten die Expression der Gene der Fumaratatmung. Die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten erfolgt über die periplasmatische Domäne der Sensorkinase DcuS und führt zur Autophosphorylierung des konservierten Histidinrestes in der Kinasedomäne. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf den Responseregulator DcuR übertragen und führt zur Induktion der Zielgene. Dazu gehören der Antiporter DcuB (*dcuB*), die anaerobe Fumarase B (*fumB*) und die Fumaratreduktase (*frdABCD*).

DcuS detektiert neben C₄-Dicarboxylaten auch Citrat über die periplasmatische Domäne. In dem nah verwandten Sensor CitA wird Citrat spezifisch über die drei Carboxyl- und die Hydroxylgruppe durch die Bindestellen C1, C2, C3 und H erkannt. DcuS benötigt für die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten und Citrat die gleichen Bindestellen. Die Citratbindung von DcuS ähnelte der von C₄-Dicarboxylaten und unterschied sich von der Citraterkennung in CitA. DcuS konnte durch gerichtete Mutagenese der Bindungsstelle in Varianten überführt werden, die spezifisch für C₄-Dicarboxylate (DcuS_{DC}) oder Citrat (DcuS_{Cit}) waren. DcuS_{DC} und DcuS_{Cit} hatten komplementäre Substratspezifitäten und reagierten entweder auf C₄-Dicarboxylate oder auf Citrat (und Mesaconat). Citrat wurde vermutlich als C₄-Dicarboxylat (mit einem Acetylrest) und somit über die gleichen Bindestellen wie C₄-Dicarboxylate erkannt. Die Bindestellen C2 und C3 sind hoch konserviert und essentiell für die Bindung von zwei Carboxylgruppen von Citrat und C₄-Dicarboxylaten. Die Stellen C1 und H werden vermutlich für koordinative Zwecke benötigt.

Der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB hat neben der Transportaktivität eine regulatorische Aufgabe im DcuSR-System. Die Deletion von DcuB führte zur konstitutiven Expression der *dcuB*'-'*lacZ* Reporterengenfusion und anderer DcuSR-regulierter Gene in Abwesenheit von C₄-Dicarboxylaten. Die Effektor-unabhängige Expression setzte eine intakte periplasmatische Domäne von DcuS voraus und zeigte in Anwesenheit der spezifischen DcuS-Mutanten (DcuS_{DC}, DcuS_{Cit}) eine geänderte Antwort. Dies lässt vermuten, dass DcuB die regulatorischen Eigenschaften über eine direkte Wechselwirkung mit DcuS ausübt.

Um den phosphorylierten Responseregulator DcuR-P in den Ursprungszustand zurückzuführen, muss dieser dephosphoryliert werden. Die bisher unbekannte Dephosphatase kann dabei entweder von dem Responseregulator, der Sensorkinase oder einem weiteren Protein stammen. DcuR verfügt über eine intrinsische Phosphataseaktivität, die durch den Sensor geringfügig stimuliert wurde.

2. Einleitung

Regulation der anaeroben Atmung in *E. coli*

Viele Bakterien können unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen. Das fakultativ anaerobe γ -Proteobakterium *Escherichia coli* kann den Wechsel von aeroben auf anaeroben Stoffwechsel, je nach Vorhandensein von Sauerstoff, Nitrat und Fumarat, auf der Transkriptionsebene regulieren. So läuft in Anwesenheit von Sauerstoff nur der aerobe Stoffwechsel und keine anaerobe Atmung oder Gärung ab. In Abwesenheit von Sauerstoff unterdrücken Nitrat und Nitrit die Synthese der Gene für die Fumaratatmung (Gunsalus, 1992; Stewart, 1993; Goh *et al.*, 2005). Durch diese Regulation werden bevorzugt elektropositive Elektronenakzeptoren verwendet, die entsprechend einer Hierarchie die maximale ATP-Ausbeute ermöglichen. Außerdem wird auf diese Weise sichergestellt, dass nur die benötigten Stoffwechselwege induziert werden.

Die Regulation dieser Systeme erfolgt in *E. coli* fast ausschließlich über Zweikomponentensysteme (Parkinson und Kofoed, 1992; West und Stock, 2001). Der Übergang von aeroben auf anaeroben Metabolismus wird durch den Regulator FNR (Fumarat/Nitrat-Regulator) und das Zweikomponentensystem ArcBA reguliert (Gunsalus *et al.*, 1994). FNR stimuliert die Expression der Gene des anaeroben Stoffwechsels (Shaw *et al.*, 1982) und ArcBA hemmt die Gene des aeroben Stoffwechsels (Iuchi *et al.*, 1988). Die Regulation der Nitratatmung erfolgt über die Zweikomponentensysteme NarXL und NarQP (Stewart, 1995; Stewart und Rabin, 1995).

Das Zweikomponentensystem DcuSR in *E. coli*

Ein typisches Zweikomponentensystem besteht aus einer membranständigen oder cytosolischen Sensor kinase und einem intrazellulären Regulatorprotein. In *E. coli* sind 62 Proteine von Zweikomponentensystemen bekannt, davon sind 30 Sensor kinasen und 32 Responseregulatoren (Mizuno *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 2000). Die Sensor kinase nimmt einen Reiz wahr und wandelt diesen durch Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in ein zelluläres Signal um. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf das Regulatorprotein übertragen, welches dadurch in seinen aktiven Zustand gebracht wird. Dieses Regulatorprotein ist zumeist ein DNA-Bindeprotein und aktiviert oder reprimiert die Transkription der Zielgene.

Das Zweikomponentensystem DcuSR (C₄-Dicarboxylate-uptake) aus *E. coli* ist für die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten, wie z.B. Fumarat, Malat und Aspartat, im Medium

zuständig (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999). Es besteht aus der membranständigen Sensor-Histidinkinase DcuS und dem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR (Abb. 1). Die Sensorkinase besteht aus zwei Transmembranhelices, die über eine periplasmatische Domäne verbunden sind, und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne. Auf die zweite Transmembranhelix folgt eine cytoplasmatische PAS-Domäne, die möglicherweise eine zweite Signaleingangsstelle darstellt, und eine Kinasedomäne mit dem konservierten Histidinrest (His349). PAS-Domänen sind Bestandteile sehr vieler pro- und eukaryotischer Sensorproteine und sind an der Wahrnehmung von Sauerstoff, Licht, des Redoxpotentials und anderen Stimuli beteiligt (Zhulin *et al.*, 1997, 1998; Gong *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1999; Repik *et al.*, 2000). Eine Stabilisierung von Dimeren durch PAS-Domänen ist ebenfalls beschrieben (Gu *et al.*, 2000; Chapman-Smith *et al.*, 2003).

Die Sensorkinase DcuS erkennt die C₄-Dicarboxylate im Periplasma und transduziert das Signal über die Membran. Die Autophosphorylierung erfolgt dabei an dem konservierten Histidinrest unter Verbrauch von ATP.

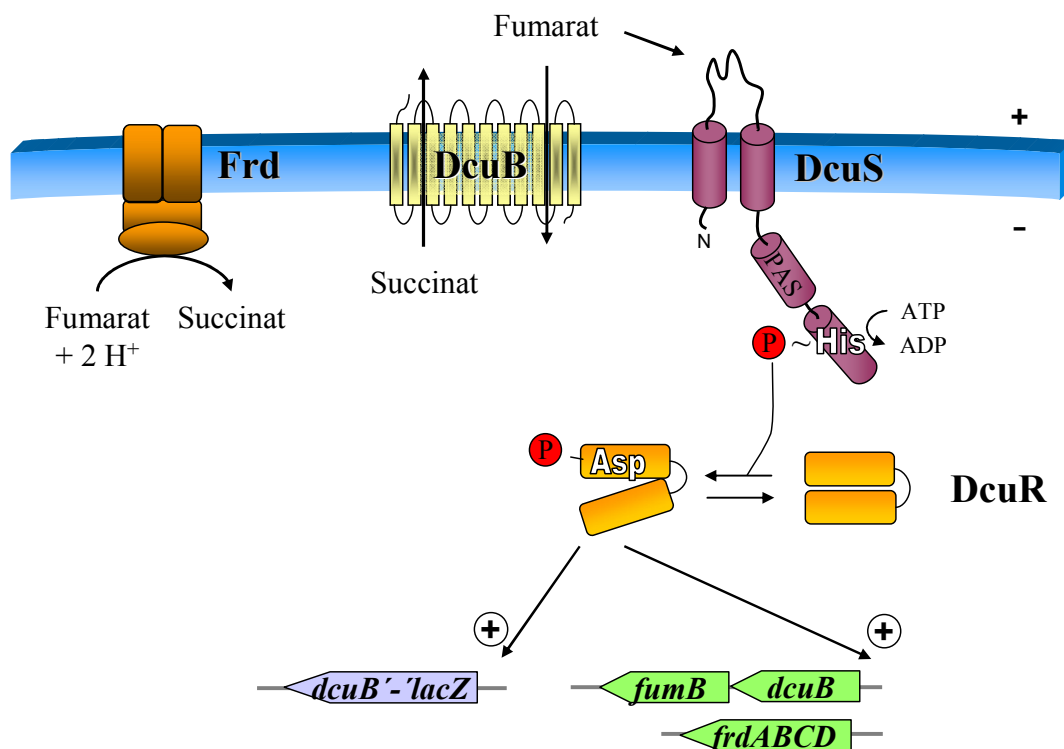


Abb. 1: Modell des Zweikomponenten-Regulationssystems DcuSR von *E. coli*. Die membranständige Sensorkinase DcuS erkennt C₄-Dicarboxylate über die periplasmatische Domäne. Dies führt zur Autophosphorylierung des Histidinrestes der Kinasedomäne. Der Phosphatrest wird auf den Aspartatrest des Regulatorproteins DcuR übertragen und bedingt eine Konformationsänderung. Als DNA-Bindeprotein induziert DcuR die Expression der Gene der Fumaratatmung. Abkürzungen: *fumB* = Fumarase B; *dcuB* = Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB; *frdABCD* = Fumaratreduktase; *dcuB'-lacZ* = Reportergenfusion; DcuS = Sensorkinase; DcuR = Responseregulator

Die energiereich gebundene Phosphatgruppe (His349~P) wird als nächstes auf den konservierten Aspartatrest (Asp56) des Responseregulators übertragen (Janausch *et al.*, 2002). Der Responseregulator besteht aus einer N-terminalen Receiver-Domäne mit dem konservierten Aspartatrest und einer C-terminalen DNA-Bindedomäne (Zientz 1998 *et al.*; Golby *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002b). Die Phosphatgruppe in DcuR (Asp56-P) bedingt eine erhöhte Affinität ($< 1 \mu\text{M}$) über ein Helix-Turn-Helix-Motiv an die Zielpromoter (Janausch *et al.*, 2004; Abo-Amer *et al.*, 2004).

Zu den Zielgenen des DcuSR-Zweikomponentensystems gehören unter anaeroben Bedingungen die Gene der Fumaratatmung. Sie umfassen die Strukturgene der Fumaratreduktase (*frdABCD*-Operon), das Gen für den Succinat/Fumarat-Antiporter DcuB (*dcuB*) und das Gen für die anaerob exprimierte Fumarase B (*fumB*). Die Gene der Fumaratatmung werden zusätzlich durch den globalen Sauerstoffsensor FNR, der die Gene des anaeroben Stoffwechsels induziert, reguliert (Shaw *et al.*, 1982). C₄-Dicarboxylate können nach Umwandlung in Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren in der Fumaratatmung genutzt werden. Dabei wird ein Protonengradient über der Membran erzeugt (skalärer Mechanismus). Die Energiegewinnung erfolgt mittels ATP-Synthase durch Elektronentransportphosphorylierung. So wird Malat über die Fumarase B zu Fumarat hydrolysiert, und Aspartat wird über die L-Aspartase zu Fumarat desaminiert. Die C₄-Dicarboxylate werden dazu durch den Antiporter DcuB aufgenommen und zu Succinat reduziert. Dabei können Wasserstoff oder NADH+H⁺ über den Redoxmediator Menachinon als Elektronendonoren fungieren. Succinat kann anaerob wegen des unvollständigen Citratzyklus nicht verstoffwechselt werden und wird über den Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB über die Membran aus der Zelle ausgeschieden (Kröger *et al.*, 2002). Die Gene *dcuB* und *fumB* bilden ein Operon, in dem *fumB* über den Promoter von *dcuB* cotranskribiert wird. Es wurden auch einzelne Transkripte für *fumB* gefunden (Golby *et al.*, 1998). Ein weiteres Zielgen von DcuSR ist *dctA*, welches für den aeroben C₄-Dicarboxylat-Carrier DctA codiert. DctA dient der Aufnahme von Succinat unter aeroben Bedingungen im Symport mit 2-3 Protonen (Gutowski *et al.*, 1975). Zusätzlich transportiert DctA auch Fumarat und Malat, die unter aeroben Bedingungen im Citratzyklus zu CO₂ oxidiert werden.

Signalerkennung durch die Sensorkinasen DcuS und CitA

DcuS gehört zur Gruppe der DcuS/CitA-Histidinkinasen und ist mit dem Sensor CitA nah verwandt. Beide zeigen eine ähnliche Topologie mit einer periplasmatischen Sensordomäne, zwei Transmembranhelices und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne (Janausch *et al.*,

2002, 2002b; Kaspar *et al.*, 2002, 1999; Bott, 1997). DcuS und CitA sind typische Sensor-Histidinkinasen mit Signalerkennung im Periplasma und anschließender Signaltransduktion über die Membran (Mascher *et al.*, 2006). CitA ist der Sensor des Zweikomponentensystems CitAB, welches die Gene der Citratfermentation in *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli* reguliert. Zu den Zielgenen in *Klebsiella* gehören die Citrat-Lyase-Ligase, der Citrat-Carrier CitS, die Oxalacetat-Decarboxylase sowie CitA und CitB, die in zwei divergierenden Clustern (*citCDEFG* und *citS-oadGAB-citAB*) organisiert sind (Bott, 1997). In *E. coli* werden die Zielgene der Citrat-Lyase (*citCDEFXG*) und der Citrat/Succinat-Carrier Cit (*citT*) gemeinsam transkribiert (Kaspar *et al.*, 2002). Die Citrat-Lyase spaltet Citrat in Acetat und Oxalacetat, wobei letzteres in *E. coli* nach Umwandlung in der Fumaratatmung reduziert wird (Bott, 1997). In *Klebsiella* wird Oxalacetat zu Pyruvat decarboxyliert und in mehreren Schritten unter ATP-Gewinnung zu Acetat umgesetzt. Die Citratfermentation in *Klebsiella* und *E. coli* unterscheidet sich in den Endprodukten und der Energieausbeute (Bott, 1997).

Die meisten *E. coli* Stämme sind nicht in der Lage Citrat unter aeroben Bedingungen zu metabolisieren, da ein geeigneter Carrier fehlt. Unter anaeroben Bedingungen ist die Umsetzung von Citrat in Anwesenheit von oxidierbaren Co-Substraten (z.B. Glucose, Lactose, Pyruvat) zu Acetat und Succinat möglich (Bott, 1997; Kaspar *et al.*, 2002). Vermutlich ist Wachstum auf Citrat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle aufgrund des Fehlens der Oxalacetat-Decarboxylase nicht möglich (Lüttgens und Gottschalk, 1980). Dieses Enzym ist in *Klebsiella pneumoniae* vorhanden und spaltet Oxalacetat in CO₂ und Pyruvat, welches letztlich unter Energiekonservierung zu Acetat umgesetzt wird (Bott, 1997).

Die Struktur der periplasmatischen Domäne von DcuS (DcuS-PD) wurde mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) gelöst (Abb. 2A; Pappalardo *et al.*, 2003). Die Struktur der periplasmatischen Domäne von CitA (*K. pneumoniae*) und die Interaktion mit Citrat konnten durch Kristallographie und Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt werden (Abb. 2B; Gerharz *et al.*, 2003). Beide Strukturen sind der Per-Arnt-Sim Domäne (PAS-Domäne) des Photoaktiven Gelben Proteins (PYP) aus *Halorhodospira halophila* ähnlich (Borgstahl *et al.*, 1995). Die periplasmatischen Domänen von DcuS und CitA mit ca. 140 Aminosäuren bilden einen hydrophoben Kern aus vier (DcuS) und fünf (CitA) β -Faltblättern, der die Substratbindestelle bildet. CitA (*K. pneumoniae*) interagiert mit Citrat direkt über polare und positiv geladene Aminosäuren, u.a. Arg109, His112, Arg150, Lys152 (Reinelt *et al.*, 2003; Gerharz *et al.*, 2003). DcuS verfügt über die korrespondierenden Reste Arg107, His110, Arg147 und Phe149, die bei der Bindung von C₄-Dicarboxylaten essentiell sind (Janausch *et al.*, 2002).

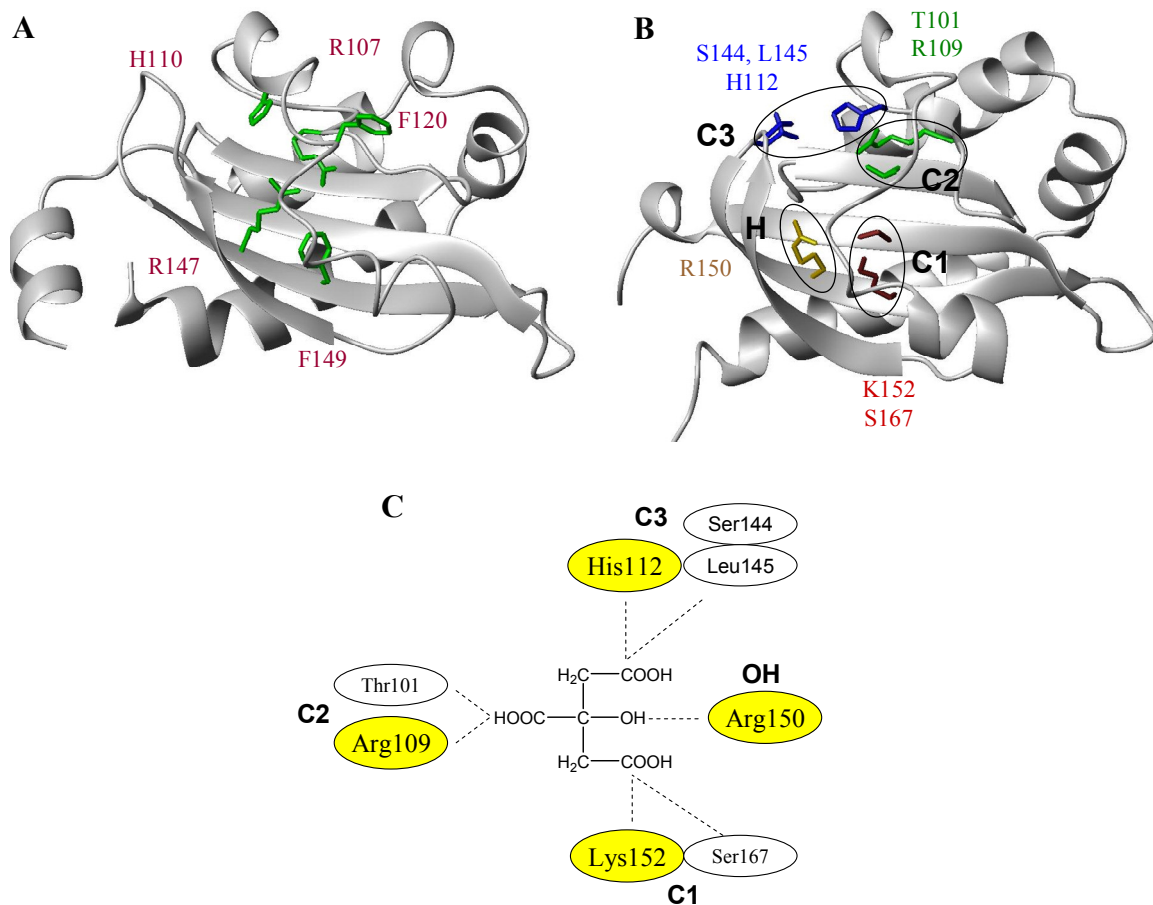


Abb. 2: Die Effektorbindung von DcuS und CitA erfolgt über die periplasmatische Domäne. Die essentiellen Aminosäurereste der periplasmatischen Domänen zur Bindung von Fumarat in DcuS (**A**) und Citrat in CitA (**B**) sind eingezeichnet. (**C**) Die Koordination von Citrat in CitA erfolgt durch Wasserstoffbrücken über die Carboxyl-Bindestellen C1, C2, C3 und H (abgeändert nach Reinelt *et al.*, 2003). Bei der Effektorbindung beteiligte Aminosäuren in CitA mit homologen essentiellen Resten in DcuS sind gelb unterlegt.

Durch Mutagenese der Aminosäurereste kam die Expression einer *dcuB'*-*lacZ* Reportergenfusion, die durch das DcuSR-System bei Anwesenheit von Fumarat stimuliert wird, zum Erliegen. Vermutlich binden auch in DcuS positiv geladene Aminosäurereste die C₄-Dicarboxylate und lösen so die Signaltransduktion aus. So wurde *in vitro* die Autophosphorylierung von DcuS durch die C₄-Dicarboxylate Fumarat, Succinat und Malat stimuliert (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005).

Die periplasmatische Domäne der Histidin-Autokinase CitA fungiert als hochspezifischer Citratrezeptor in *Klebsiella* (Kaspar *et al.*, 1999), die Citrat als einziges Substrat mit einem apparenten K_D-Wert von 5,5 µM bei pH 7 bindet (Gerharz *et al.*, 2003). CitA aus *E. coli* ist ebenfalls affin (K_D 0,15 – 1 µM), und neben Citrat werden Isocitrat (K_D 15 µM) und Tricarallylat (K_D 50 µM), aber nicht Malat, gebunden (Kaspar *et al.*, 2002). DcuS wird von diversen C₄-Dicarboxylaten, wie Fumarat, Malat, Aspartat, aber auch von Citrat, stimuliert.

Die Bindung dieser Effektoren (apparente K_D -Werte 2 – 13 mM) ist im Gegensatz zu CitA um den Faktor 1000 weniger affin (Kneuper *et al.*, 2005).

Ziele der Arbeit

Obwohl die Zweikomponentensysteme die größte Gruppe bakterieller Sensorsysteme zur Verarbeitung von Umweltsignalen darstellen (Dutta *et al.*, 1999), ist relativ wenig über die genaue Funktionsweise der Signaltransduktion bekannt. Mit dieser Arbeit soll das bisherige Verständnis der Signalwahrnehmung und Verarbeitung des Zweikomponentensystems DcuSR von *E. coli* erweitert werden.

I) Die Sensordomäne der Fumarat-sensitiven Sensorkinase DcuS spielt eine wesentliche Rolle in der Erkennung von C₄-Dicarboxylaten und Citrat im Medium. Durch Punktmutagenesen konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren der periplasmatischen Domäne von DcuS eine wichtige Funktion bei der Bindung von Fumarat *in vivo* besitzen (Pappalardo *et al.*, 2003; Janausch *et al.* 2004). So verlor DcuS durch Mutagenese essentieller Aminosäurereste (R107, H110, R147, F149) der periplasmatischen Domäne die Fähigkeit zur Induktion des Zielgens *ducB* durch Fumarat.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob DcuS für die Citraterkennung die gleichen Aminosäurereste verwendet wie für die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten. Dazu sollte die periplasmatische Domäne von DcuS mit der periplasmatischen Domäne der nah verwandten und gut untersuchten Sensorkinase CitA aus *K. pneumoniae* verglichen werden. Um ein besseres Verständnis für die Effektorbindung von DcuS zu erlangen, sollten über bioinformatische Analysen (Kooperation Prof. Lupas, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) Aminosäuren identifiziert werden, die DcuS in einen spezifischen Sensor entweder für C₄-Dicarboxylate oder Citrat umwandeln. Die Mutationen sollen gerichtet in Plasmid-codiertem DcuS erfolgen und in einer DcuS-Insertionsmutante auf ihre Auswirkung auf die Expression der Reporterfusion *dcuB'*-*lacZ* mit verschiedenen Effektoren getestet werden.

Die Sensorkinase DcuS ist ein C₄-Dicarboxylat- und Citratsensor, der die Effektoren über die periplasmatische Domäne mit geringer Affinität bindet. Die nah verwandte Sensorkinase CitA aus *K. pneumoniae* ist im Gegensatz zu DcuS ein hochspezifischer und affiner Citratrezeptor. Um die Signaltransduktion über die Membran besser zu verstehen, sollte eine spezifische und affine Sensorkinase durch DcuS-CitA-Hybride konstruiert werden, die in Phospholipiden rekonstituiert werden kann. Ein solches Konstrukt wäre aufgrund der möglichen

Rekonstitution in Membranen (DcuS) und der hohen Affinität zum Substrat (CitA) ein idealer Sensor für weitere Untersuchungen.

II) Weitere Untersuchungen betrafen die Rolle des Antiporters DcuB bei der Signalerkennung durch DcuS. DcuB hat neben seiner Funktion als Transporter eine Funktion als Regulator im DcuSR-System. In einer *dcuB*-Deletionsmutante war die Induktion der Zielgene von DcuSR von Fumarat unabhängig (Kleefeld, 2006). Dieser Effekt lässt eine Wechselwirkung zwischen dem Carrier und dem Sensor vermuten. Anscheinend benötigt DcuS trotz der Sensordomäne im Periplasma den Carrier DcuB, um auf die Anwesenheit von Substrat zu reagieren. DcuB hat einen hemmenden Einfluss auf die Funktion von DcuS. In Liposomen, die nur DcuS und kein DcuB enthalten, ist DcuS somit bereits weitgehend im aktiven Zustand und wird durch Fumarat nur noch schwach stimuliert (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005).

Die direkte Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuS konnte bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Mit bakteriellen Two-Hybrid-Systemen und mit FRET-Messungen waren aufgrund der unbekannten Topologie von DcuB und der Hydrophobizität keine direkten Interaktionen zwischen dem Sensor und dem Transporter nachweisbar. Aus diesem Grund sollten spezifische Punktmutanten von DcuS genutzt werden, um Hinweise auf eine Interaktion von DcuB mit DcuS zu erhalten.

III) In Zweikomponentensystemen detektiert der Sensor das Signal und phosphoryliert im Anschluss den passenden Responseregulator, der dadurch in den aktivierten Zustand überführt wird. Um den Grundzustand wiederzuerlangen, muss der Responseregulator dephosphoryliert werden. Dies geschieht entweder durch eine intrinsische Phosphataseaktivität des Regulators, eine Phosphataseaktivität des Sensors oder durch ein weiteres Protein. Aufgrund von Phosphorylierungsstudien wird vermutet, dass im DcuSR-System der Sensor oder der Regulator die Funktion der Phosphatase übernimmt. Die Phosphataseaktivität von DcuSR und die beteiligten Komponenten sollten weiter charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Stämme von *E. coli*

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

Stämme	Genotyp	Referenz
AN387	Wildtyp	Wallace & Young, 1997
MG1655	CGSC 6300, <i>fnr</i> ⁻ , l- F- P1-sensitiv	Jensen <i>et al.</i> , 1993
MC4100	F- <i>araD139 Δ(argF-lac)U169, rpsL150 relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR, ΔlacZ</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F' <i>hsdS gal1</i> (DE3), mit IPTG-induzierbarer chromosomaler T7-RNA-Polymerase, Proteinüberproduktionsstamm	Studier und Moffat, 1986
C43(DE3)	Spontanmutante von BL21(DE3), gesteigerte Überproduktion von Membranproteinen	Miroux und Walker, 1996
JM105	<i>thi strA endA sbcB15 hsdR4 Δ(lac-proAB)F' traD36 proAB⁺ lacIq lacZΔM15</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985,
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺, lacIq lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
XL1-Blue	F ⁻ , <i>recA1⁻</i> , (<i>mk⁺</i> , <i>rk⁻</i>) <i>supE44, endA1, thi-1, λ⁻, gyrA96, relA1, (lac⁻) [F⁻, proAB, lacI_q, Z ΔM15 Tn10(Tet^R)]</i>	Site-directed mutagenesis, Stratagene
BW25113	BD792, aber <i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514, Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph⁻¹</i>	Datsenko & Wanner
JW4083	BW25113, aber <i>ΔfumB</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006 (NIG collection)
IMW237	MC4100, <i>λ(Φ(dcuB'-lacZ)hyb, amp^R)</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW260	MC4100, <i>λ(Φ(dcuB'-lacZ)hyb amp^R) dcuS::cam^R</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW503	MC4100 aber <i>ΔdcuB</i> , <i>λ(ΦdcuB' - lacZ)</i>	Kleefeld <i>et al.</i> , 2008
IMW536	P1(IMW497) x IMW535, MC4100 <i>λ(dcuB' - lacZ) dcuS::Spc^R dcuB::Cam^R</i>	Kleefeld <i>et al.</i> , 2008
IMW543	MC4100 <i>λ(Φ(dcuB' - lacZ)hyb, bla⁺), citA::kan^R, dcuS::cam^R</i>	Müller, 2007

Plasmide	Genotyp	Referenz
pET28a	Überexpressionsplasmid, His-tag, <i>Kan^R</i> , pBR322-origin, 40 – 50 Kopien pro Zelle	Novagen
pACYC184	p15A-origin, Tet ^R , Cam ^R , (low-copy, ~ 15 Kopien pro Zelle)	Chang & Cohen, 1978
pMW181	pET28a mit 2,2 kb <i>XbaI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment <i>dcuS</i> (mit eigenem Promoter), Kan ^R	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW145	periplasmatische Domäne <i>dcuS</i> in pET28a, Kan ^R	Pappalardo <i>et al.</i> , 2003
pMW423	pMW145, aber periplasmatische Domäne DcuS-PD(T101G F120M I125S) ₄₅₋₁₈₀	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pKP2	pUC19 mit 2,2 kb <i>BamHI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment <i>citA</i> aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> , Amp ^R	Bott, Jülich
pMW99	pJL29, aber (<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i>) hyb, Amp ^R	Zientz <i>et al.</i> , 1998
pMW151	pET28a mit 2,2 kb <i>XbaI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von <i>dcuS</i> (zur Überexpression), Kan ^R	Janausch <i>et al.</i> , 2002
pMW228	pME6010 mit <i>dcuB</i> + Promotorbereich, <i>EcoRI</i> - <i>XhoI</i> , 10,1kb, Tet ^R	Kleefeld <i>et al.</i> , 2008
pMW266	pET28a mit 0,7 kb <i>NdeI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von <i>dcuR</i> (zur Überexpression), Kan ^R	Janausch, 2002
pMW236	pMW181, aber DcuS H110A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW237	pMW181, aber DcuS R147A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW277	pMW181, aber DcuS F149A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW292	pMW181, aber DcuS F120A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW298	pMW181, aber DcuS A164S, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW296	pMW181, aber DcuS M103A, Kan ^R	Kneuper <i>et al.</i> , 2005
pMW344	pMW181, aber DcuS T101G, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW345	pMW181, aber DcuS F149K, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW351	pMW181, aber DcuS T101G, F120M, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW352	pMW181, aber DcuS F149K, A164S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW353	pMW181, aber DcuS T101G, F120M, I125S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW354	pMW181, aber DcuS F141S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW355	pMW181, aber DcuS Q159V, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW356	pMW181, aber DcuS Q159V, M103A, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW368	pMW181, aber DcuS F120M, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007

Plasmide	Genotyp	Referenz
pMW369	pMW181, aber DcuS T101G, I125S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW370	pMW181, aber DcuS T101G, F120M, I125S, F149K, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW371	pMW181, aber DcuS T101G F120M, I125S, Q159V, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW372	pMW181, aber DcuS T101,G F120M, I125S, F149K, A164S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW373	pMW181, aber DcuS I125S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW374	pMW181, aber DcuS T101G, F120M, I125S, A164S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW390	pMW181, aber DcuS F120M, I125S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW398	pMW181, aber DcuS R107A, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW409	pMW181, aber DcuS F149K, A164S, F141S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW410	pMW181, aber DcuS T101G, F120M, I125S, F141S, Kan ^R	Krämer <i>et al.</i> , 2007
pMW473	<i>dcuS</i> -wt aus MG1655 mit eigenem Promotor über <i>Xba</i> I und <i>Hind</i> III in pACYC184 kloniert. Cam ^R , Tet ^R (low-copy, ~ 10 Kopien pro Zelle)	Müller, 2007
pMW522	pET28a mit <i>fumB</i> über <i>Nde</i> I und <i>Eco</i> RI, 1,6 kbp, Kan ^R	Kleefeld <i>et al.</i> , 2008
pMW543	pMW473, aber T101G, F120M, I125S, Cam ^R , Tet ^R	Müller, 2007
pMW545	pMW473, aber I125S, Cam ^R , Tet ^R	Müller, 2007
pMW546	pMW473, aber F120M, I125S, Cam ^R , Tet ^R	Müller, 2007

3.2. Zucht und Medien

Für alle genetischen Arbeiten sowie für Vorkulturen (sofern nicht anders angegeben) wurden die Bakterien in 5-50 ml Luria Bertani-(LB)-Medium unter Schütteln (Innova 4000, New Brunswick Scientific) über Nacht bei 37°C inkubiert. Den Medien wurden bei Bedarf Antibiotika zugesetzt. Bei Zugabe von zwei und mehr Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert.

Die Überproduktion von unmarkiertem Protein erfolgte in LB-Medium mit 55,4 ml/l 2M Glucose. Die Glucose diente als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator und verhinderte eine basale Expression der Zielproteine vor Induktion in pET28a-Derivaten.

Isotopenmarkiertes Protein wurde in M9-Medium ohne NH_4Cl überproduziert, dem 1 g/l ^{15}N - NH_4Cl , 10 mM Glucose, und die Zusätze CaCl_2 und MgSO_4 zugesetzt wurden. Für doppelt markiertes Protein wurde die Glucose durch 7 mM ^{13}C -Glucose (Promochem, Wesel) als C-Quelle ersetzt. Die Vorkulturen wurden in LB-Medium plus Antibiotikum unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Gegebenenfalls wurden für Festkörper-NMR-Untersuchungen unmarkierte Aminosäuren im Medium (reverse Markierung) angeboten. Die Zucht erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die maximal 20 %ig befüllt wurden. Die Kulturen wurden mit 2 % Inokulum beimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Die Induktion erfolgte nach ca. 2 – 3 h bei einer OD_{578} 0,5 – 0,7 mit 1 mM IPTG. Nach 4 – 5 h wurden die Zellen geerntet. Um die Expression zu überprüfen, wurden vor und nach der Induktion 1 ml der Kultur entnommen. Eine erfolgreiche Überproduktion zeigte sich durch eine überexprimierte Bande des entsprechenden Proteins nach SDS-PAGE.

Für die Bestimmungen der β -Galactosidase-Aktivität nach Zucht unter anaeroben Bedingungen wurden die Kulturen in angereichertem M9-Medium (eM9) mit allen Zusätzen sowie Glycerin als Kohlenstoffquelle und Elektronendonator und Dimethylsulfoxid (DMSO) als Elektronenakzeptor gezüchtet. Als Effektoren wurden jeweils 20 mM Fumarat, Fumarsäure, Succinat, L-Aspartat, und D-Tartrat, Mercaptobernsteinsäure/succinat (= Thiomalat), Mesaconat, Citrat, Isocitrat, Itaconsäure, Tricarallylat, Glutarat, 2,3-Dimethylsuccinat und Phthalat (Nitropropionat 5 mM) verwendet. Die Vorkulturen wurden ebenfalls in eM9-Medium wie angegeben plus Antibiotika und den jeweiligen Induktoren in Reagenzgläsern à 5 ml als semi-anaerobe Standkulturen über Nacht bei 37°C gezüchtet. Die anaeroben Hauptkulturen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit mit 1 – 5 % Inokulum beimpft und in Kulturen à 5 ml in gasdichten Sovirell-Röhrchen 3 x 10 min entgast. Anschließend wurde mit 1,2 atm Stickstoff (N_2 5,0, Reinheit >99,999 %, Linde) begast und bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Die Zucht erfolgte in der Regel bis zu einer OD_{578} von 0,5 – 0,7, jedoch nicht länger als 48 h.

Zur Bestimmung des apparenten K_D -Wertes wurde die β -Galactosidase-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Induktors bestimmt. Die Zuchten erfolgten in eM9-Medium plus Glycerin und DMSO, wobei den Vorkulturen kein Effektor zugegeben wurde. Die 5 ml Hauptkulturen wurden mit den jeweiligen Effektoren in steigenden Konzentrationen von 0 - 50 mM gezüchtet.

Um die Expression der chromosomal codierten Reportergenfusion *dcuB'*-*'lacZ* unter hyperosmotischen Bedingungen zu testen, wurde IMW237 unter anaeroben Bedingungen in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO über Nacht semi-anaerob gezüchtet. Die anaerobe Zucht der Hauptkultur erfolgte bei 37°C mit 2 % Inokulum im gleichen Medium, allerdings mit den angegebenen Effektoren (Na-Fumarat, Tris-Fumarsäure pH 7) bzw. hochmolaren Soluten (Sorbitol, NaCl, KCl) bis zur exponentiellen Phase bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8.

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

- 10 g/l Pepton (Gibco, Nr.140, 30392-021)
- 5 g/l Hefeextrakt (Servabacter 24540, Serva)
- 5 g/l NaCl (Roth, 9265.2)

LB-Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar (Fluka, 05040)

Antibiotikazusätze

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin (Roth, K029.1)	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycinsulfat (Roth, T832.1)	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Spectinomycin (Sigma, S900.7)	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol (Fluka, 23275)	20 mg/ml in EtOH	20 µg/ml
Tetracyclin (Fluka, G06717)	15 mg/ml in EtOH/ H ₂ O (1:1)	15 µg/ml

Bei gleichzeitiger Verwendung verschiedener Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert.

SOC-Medium

- 20 g/l Bacto-Trypton (Serva, 37422)
- 5 g/l Hefeextrakt (Servabacter 24540, Serva)
- 0,584 g/l NaCl (Roth, 9265.2)
- 0,19 g/l KCl (Roth, 6781.1)
- 2,03 g/l MgCl₂ x 6 H₂O (Fluka, 63535)
- 2,46 g/l MgSO₄ x 7 H₂O (Roth, T888.2)
- 3,96 g/l Glucose x 1 H₂O (Roth, 6887.1)

NZY⁺-Medium, pH 7,5

- 10 g/l säurehydrolysiertes Casein (AHC, Pepton No. 5, Gibco, 80007-057)
- 5 g/l Hefeextrakt (Servabacter 24540, Serva)
- 5 g/l NaCl (Roth, 9265.2)
- 12,5 ml/l 1M MgCl₂ (Fluka, 63535)
- 12,5 ml/l 1M MgSO₄ (Roth, T888.2)
- 10 ml/l 2M Glucose (Roth, 6887.1)

Glycerin-MOPS

- 1 mM MOPS (Roth, 6979.2)
- 15 % Glycerin (Roth, 4043.3)

M9-Medium (Miller, 1992)

Stamm-Lösung (10x konzentriert, pH 7,0)

- 60 g/l Na₂HPO₄ (Roth, 40984.2)
- 30 g/l KH₂PO₄ (Roth, 3904.1)
- 5 g/l NaCl (Roth, 9265.2)
- 10 g/l NH₄Cl (Fluka, 09718)

Für angereichertes M9 (eM9) wurde die Stammlösung mit allen Zusätzen, Glycerin und DMSO versehen. Für isotope markierte Zuchten wurde das M9-Medium ohne NH₄Cl angesetzt und autoklaviert. Die Zugabe von 1 g/l ¹⁵N-NH₄Cl anstelle 10 g/l ¹⁴N-NH₄Cl erfolgte mittels Sterilfiltration. Weitere Erläuterungen siehe Zusätze, Kohlenstoffquelle und Elektronenakzeptor, Isotope, Aminosäuren, Induktoren und Solute.

Zusätze

- 10 ml/l CaCl₂, 10 mM (Roth, 6781.1)
- 1 ml/l MgSO₄, 1 M (Roth, T8222.2)
- 10 ml/l säurehydrolysiertes Casein; AHC (Serva, Nr. 48614), 10 %
- 5 ml/l L-Tryptophan, 1 % (Serva, 37422)

Für isotope markierte Zuchten wurden die aminosäurehaltigen Zusätze Casein und L-Tryptophan ausgelassen.

Kohlenstoffquelle (Elektronendonator) und Elektronenakzeptor

(Endkonzentration zur β -Galactosidase-Aktivität-Bestimmung)

50 mM Glycerin (Roth, 4043.3)

20 mM Dimethylsulfoxid (DMSO, Fluka, 41640)

Isotope (für markierte Zuchten)

1 g/l ^{15}N - NH_4Cl (Spectra Stable Isotopes, 5300)

7 mM ^{13}C -Glucose (Promochem, Wesel)

Die Isotope wurden in 10 ml Wasser gelöst und steril filtriert. Die Isotope wurden von der Arbeitsgruppe Griesinger zur Verfügung gestellt.

Aminosäuren (Endkonzentration für revers markierte Zuchten)

1 mM L-Phenylalanin (Roth, 4491.3)

1 mM L-Isoleucin (Roth, 3922.1)

1 mM L-Leucin (Sigma, G2H0243)

1 mM L-Arginin (Roth, 3144.1)

1 mM L-Lysin (Roth, 4207.1)

4 mM L-Valin (Roth, 4879.1)

Für die Festkörper-NMR-Messungen wurden die Aminosäuren getrennt steril zugegeben.

Induktoren (Effektoren)

(Endkonzentration zur β -Galactosidase-Aktivität-Bestimmung)

50 mM Glycerin (Roth, 4043.3)

20 mM Dimethylsulfoxid (DMSO, Fluka, 41640)

20 mM Fumarat (Roth, 47970)

20 mM Fumarsäure (Roth, 3748.1)

20 mM Succinat (Roth, 3195.1)

20 mM L-Malat (Fluka, 02290)

20 mM L-Aspartat (Fluka, 11189)

20 mM L-Tartrat (Fluka, 60413)

20 mM D-Tartrat (Fluka, 95320)

20 mM Maleinat (Fluka, 63180)

5 mM Nitropropionat (Fluka, 73808)

20 mM Mesaconat (Lancaster, 6572)

20 mM Thiomalat (Mercaptosuccinat) (Lancaster, 8306)

20 mM tri-Na-Citrat (Roth, 4088.1)

20 mM Isocitrat (Sigma, 093K3853)

20 mM Itaconat (Fluka, 59950)

20 mM Glutarat (Sigma, G3407)

20 mM Tricarallylat (Fluka, 91048)

20 mM 2,3-Dimethylsuccinat (Fluka, 39670)

20 mM Phthalat (Sigma, 04924)

Der pH-Wert der Effektoren wurde auf pH 7,0 eingestellt und durch Autoklavieren (außer Malat, Thiomalat, Nitropropionat und 2,3-Dimethylsuccinat durch Sterilfiltration) sterilisiert. Alle Effektoren wurden 20 mM verwendet, außer Nitropropionat mit 5 mM, da höhere Konzentrationen wachstumshemmend wirkten.

Solute

800 mM D-Sorbitol (Sigma, S-1876)

200 mM NaCl (Roth, 9265.2)

200 mM KCl (Roth, 6781.1)

Die Stammlösung, die Zusätze, C-Quellen, Elektronenakzeptoren und Effektoren (pH 7,0) wurden getrennt autoklaviert bzw. steril filtriert. Zur Verwendung wurde die Stammlösung mit den Zusätzen, C-Quellen, Elektronenakzeptoren, Aminosäuren, Effektoren und Solute je nach Verwendung versetzt und mit gereinigtem Wasser (Umkehr-Osmose, Purelab Prima 20, ELGA) zur Endkonzentration aufgefüllt.

Lösungen für den β -Galactosidase-Test

4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galctopyranosid (ONPG, Fluka, 73660)

1 M Na₂CO₃ (Fluka, 71351)

Chloroform (Roth, 3313.2)

0,1 % SDS (Roth, CN30.2)

β -Galactosidase-Reaktionspuffer (pH 7,0)

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer

10 mM KCl (Roth, 6781.1)

1 mM MgCl₂ (Fluka, 63535)

2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol (Roth, 4227.1)

3.3. Molekulargenetische Methoden

Sofern nicht anders angegeben wurden die molekularbiologischen Standardmethoden wie Polymerasekettenreaktionen (PCR) und Ligationen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Ligationen wurden in den molaren Verhältnissen von Vektor zu Insert von 1:3, 1:5 und 1:10 bei 16°C über Nacht bzw. für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gerichtete Mutagenese wurde mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (USA) durchgeführt. Die Herstellung elektrokompenter Zellen und die Transformation erfolgten nach Farinha *et al.* (1990). Genomische DNA wurde mit Nucleospin C+T (Macherey & Nagel) isoliert. Die analytische Plasmidisolierung wurde mit dem Plasmid-Mini-Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Reinigung von PCR- und Ligationsprodukten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit und Isolierungen von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit durchgeführt (jeweils Qiagen, Hilden). Die Restriktionsenzyme stammen von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986). Die Reaktionen wurden entweder im iCycler (Bio-Rad), MyCycler (Bio-Rad) oder Progene Thermocycler (Techne) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma MWG Biotech (Ebersberg).

Je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und Schmelzpunkte der verwendeten Primer wurde das Programm abgeändert. Pro 1 kb zu amplifizierende Nukleotide wurden für die *Taq* Polymerase (Abgene) und für die *Pfu* Ultra Polymerase (Stratagene) eine Elongationszeit von 60 Sek. genutzt. Der Primer-Schmelzpunkt (T_m) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC \%} - 650/n$$

n = Anzahl der Nukleotide

Die Hybridisierung wurde 5° C unter dem niedrigeren T_m -Wert der beiden Primer durchgeführt. In der Regel wurden die Oligonukleotide so generiert, dass die Schmelztemperaturen identisch sind. Das Reaktionsvolumen beträgt für die Ansätze mit der *Taq* oder der *Pfu* Ultra Polymerase jeweils 50 µl (Tab. 2).

Tab. 2: Endkonzentrationen der verschiedenen Komponenten für die PCR-Ansätze (50 µl) mit unterschiedlichen Polymerasen

Komponenten	<i>Taq</i> (Abgene)	<i>Pfu</i> Ultra (Stratagene)
PCR-Puffer	1 x	1 x
10 mM dNTP-Mix	200 µM jeweils	250 µM jeweils
MgCl ₂	1,5 - 3 mM	Im Puffer enthalten (2 mM)
Primer	0,5 µM jeder	0,5 µM jeder
Template	50 - 100 ng	50 - 100 ng
Polymerase	2,5 U	2,5 U
Dimethylsulfoxid	1 - 10 %	1 - 10 %
H ₂ O	Ad 50 µl	Ad 50 µl

Zur Amplifizierung der gewünschten Gene und Genabschnitte wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet (Tab. 3). Für die Klonierung wurde entweder die *Taq*-Polymerase (Abgene) oder die Proof-reading Polymerase *Pfu* Ultra (Stratagene) eingesetzt. Zur Amplifikation der PCR-Produkte wurden folgende Programme genutzt:

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

Amplifikationsprofil	<i>Taq</i> (Abgene)	<i>Pfu</i> Ultra (Stratagene)	
Initiale Denaturierung	94°C, 3 min	95°C, 2 min	
Denaturierung	94°C, 20 sek	95°C, 30 sek	} 30 Zyklen
Hybridisierung*	Primer $T_a = T_m - 5^\circ \text{C}$	Primer $T_a = T_m - 5^\circ \text{C}$	
(30 Zyklen)	30 sek	30 sek	
Elongation	72°C, 1 min/kb	72°C, 1 min/kb	
Finale Elongation	72°C, 10 min	72°C, 10 min	

* Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer sollte jeweils zwischen 55 - 80°C liegen

Gerichtete Mutagenese von *dcuS*

Zur Generierung von Punktmutanten wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Die DNA-Sequenz wurde schrittweise so mutiert,

dass pro Mutagenesereaktion nur eine Aminosäure gerichtet ausgetauscht wurde. Zur Konstruktion von Mehrfachmutanten wurden mehrere Mutagenesen nacheinander durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 4 angegeben.

Damit wurden Mutationen in den Plasmiden pMW145, einem Plasmid zur Überexpression der periplasmatischen Domäne von DcuS und in pMW181 bzw. pMW473, Plasmide zur Komplementation von *dcuS*-Mutanten, eingeführt. Dazu wurden Primer kreiert, die den gewünschten Aminosäure-Austausch auf DNA-Ebene enthielten.

Die Berechnung des T_m -Wertes der Oligonukleotide zur Mutagenese erfolgte nach folgender Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\% \text{ GC}) - (675/N - \% \text{ Fehlpaarung})$$

N ist die Anzahl der Basen des Mutagenese-Primers. % GC gibt den prozentualen GC-Gehalt der Oligonukleotide und % Fehlpaarung den prozentualen Anteil an Fehlpaarungen des Primers im Bezug auf die Ausgangssequenz an.

Die Mutationen wurden mittels Sequenzierung mit den Standard-Primern T7-Prom. und T7-Term. bzw. den Primern pMW181-Seq1 und pMW181-Seq2 kontrolliert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise (Mainz) bzw. Agowa (LGC group, Berlin) durchgeführt.

Tab. 4: Verwendete Mutageneseprimer zur gerichteten Mutagenese von *dcuS* (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T_m [°C]	Schnittstelle
pMW181-Seq1	CCT CTC TCA TCA GTA TGA TTA TC	57,1	
pMW181-Seq2	GAT TAA AAA ACC AGC GAT AAC CGG	59,3	
Mutagenese-Primer	Sequenz (5'→3')	T_m [°C]	Aminosäure-Austausch
ppD-DcuS-T101G-For	GAT CTG CTG TTT ATT GTC GTT <u>GGC</u> GAT ATG CAA AGT CTT C	80,0	T101G
ppD-DcuS-T101G-Rev	GAA GAC TTT GCA TAT <u>CGC</u> CAA CGA CAA TAA ACA GCA GAT C	80,0	T101G
ppD-DcuS-M103A-For	TGT CGT TAC CGA <u>TGC</u> <u>GCA</u> AAG TCT TCG CTA CTC G	78,0	M103A
ppD-DcuS-M103A-Rev	CGA GTA GCG AAG ACT TTG <u>CGC</u> ATC GGT AAC GAC A	78,0	M103A
ppD-DcuS-R107A-For	CCG ATA TGC AAA GTC TTG <u>CCT</u> ACT CGC ATC CTG AAG	77,0	R107A
ppD-DcuS-R107A-Rev	CTT CAG GAT GCG AGT <u>AGG</u> CAA GAC TTT GCA TAT CGG	77,0	R107A
ppD-DcuS-H110A-For	CTT CGC TAC TCG <u>GCA</u> CCT GAA GCC CAG C	72,4	H110A

Mutagenese-Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Aminosäure-Austausch
ppD-DcuS-H110A-Rev	GCT GGG CTT CAG <u>GTG</u> <u>CCG</u> AGT AGC GAA G	72,4	H110A
ppD-DcuS-F120M-For	CGT ATT GGT CAG CCA <u>ATG</u> AAA GGT GAT GAC	80,0	F120M
ppD-DcuS-F120M-Rev	GTCATC ACC TTT <u>CAT</u> TGG CTG ACC AAT ACG	80,0	F120M
ppD-DcuS-F120M-I125S-For	CCA <u>ATG</u> AAA GGT GAT GAC <u>TCG</u> CTT AAA GCG CTG AAT GGC G	80,0	F120M-I125S
ppD-DcuS-F120M-I125S-Rev	CGC CAT TCA GCG CTT TAA <u>GCG</u> <u>AGT</u> CAT CAC CTT <u>TCA</u> <u>TTG</u> G	80,0	F120M-I125S
dcuS-ppD-I125S-for2	CCA TTT AAA <u>GGT</u> GAT GAC <u>TCG</u> CTT AAA GCG CTG AAT GGC G	80,0	I125S
dcuS-ppD-I125S-rev2	CGC CAT TCA GCG CTT TAA <u>GCG</u> <u>AGT</u> CAT CAC CTT TAA ATG G	80,0	I125S
ppD-DcuS-F141S-For	CTA TCA ATC GCG GTT <u>CTC</u> TGG CGC AGG CTT TAC	80,6	F141S
ppD-DcuS-F141S-Rev	GTA AAG CCT GCG CCA <u>GAG</u> <u>AAC</u> CGC GAT TGA TAG	80,6	F141S
ppD-DcuS-F149K-For	CGC AGG CTT TAC GCG TAA <u>AAA</u> CCC CCA TCT ACG ATG AAA ATC	78,1	F149K
ppD-DcuS-F149K-Rev	GAT TTT CAT CGT AGA TGG GGG <u>TTT</u> <u>TTA</u> CGC GTA AAG CCT GCG	78,1	F149K
ppD-DcuS-Q159V-For	CTA CGA TGA AAA TCA TAA <u>AGT</u> <u>AAT</u> TGG CGT GGT GGC GAT C	79,6	Q159V
ppD-DcuS-Q159V-Rev	GAT CGC CAC CAC GCC AAT <u>TAC</u> TTT ATG ATT TTC ATC GTA G	79,6	Q159V
ppD-DcuS-A164S-For	CAA ATT GGC GTG GTG <u>TCT</u> ATC GGC CTT GAG TTA AGC C	79,1	A164S
ppD-DcuS-A164S-Rev	GGC TTA ACT CAA GGC CGA <u>TAG</u> <u>ACA</u> CCA CGC CAA TTT G	79,1	A164S

*Restriktionsschnittstellen der PCR-Primer und veränderte Nukleotidsequenzen (Codons) von *dcuS*, die zu Aminosäureaustauschen führen, sind unterstrichen.

Überproduktion der periplasmatischen Domäne von DcuS

Um eine Überproduktion der periplasmatischen Domäne DcuS zu erreichen, wurde der codierende Bereich der periplasmatischen Domäne (DcuS-PD) in pET28a (Novagen) kloniert. Der Abschnitt des *dcuS*-Gens, der für die periplasmatische Domäne codiert wurde mit den Primern pd-DcuS-Nde2 (ATTTACTTCTCGCATATGAGTGATATG) und –HindIII (GACCAGATAAAGCTTCAGCGACTG) mittels PCR aus chromosomaler DNA von *E. coli* AN387 K-12 amplifiziert und in die *NdeI*- und *HindIII*-Schnittstellen von pET28a kloniert. Dies führte zu dem Plasmid pMW145 gezeigt in Abb. 3 (Pappalardo *et al.*, 2003).

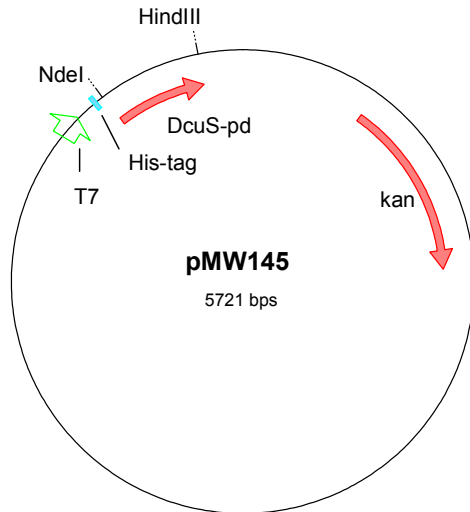


Abb. 3: Das Expressionsplasmid pMW145 dient der Überproduktion der periplasmatischen Domäne von DcuS von Aminosäure Ser45 bis Arg180. Die Expression steht unter Kontrolle eines T7lac-Promoters. Stromaufwärts der periplasmatischen Domäne von DcuS befinden sich ein His₆-Anhang zur Affinitätschromatographie und eine Thrombinspaltstelle. Das Plasmid pMW423 enthält die mutierte periplasmatische Domäne der Citrat-spezifischen Mutante DcuS(T101G F120M I125S).

Um die Citrat-spezifische periplasmatische Domäne der DcuS-Variante DcuS(T101G F120M I125S) zu überproduzieren, wurde die periplasmatische Domäne aus Plasmid pMW353 [DcuS(T101G F120M I125S)] mit den selben Primern amplifiziert und in pET28a kloniert, resultierend in pMW423. Somit umfasst die periplasmatische Domäne von DcuS in beiden Fällen den Bereich zwischen den beiden Transmembranhelices (TM I und II) und beginnt mit Serin an Position 45 (S45, Ser45) und endet mit Arginin an Position 180 (R180, Arg180). N-terminal vor der periplasmatischen Domäne von DcuS befindet sich ein induzierbarer T7lac-Promoter, ein His₆-Anhang und eine Thrombinspaltstelle (Abb. 3 und 4). Zur Überexpression wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3), der ein chromosomales Gen für die T7-Polymerase trägt, mit pMW145 und pMW423 transformiert und aerob in M9-Medium mit dem Stickstoffisotop ¹⁵N-NH₄Cl gezüchtet und zur Untersuchung mittels Flüssig-NMR vorbereitet.

NMGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMS₄₅DMTRDGLANKALAVARTLADSPEIRQGLQKKPQESGI
QAIAEAVRKRNDLLFIVVT₁₀₁→G₁₀₁DMQSLRYSHPEAQRIGQPF₁₂₀→M₁₂₀KGDDI₁₂₅→S₁₂₅LKA
LNGEENVAINRGFLAQLRVFTPIYDENHKQIGVVAIGLELSRVTQQINDSR_{180C}

Abb. 4: Aminosäuresequenz von pMW145 bzw. pMW423 zur Überproduktion DcuS₄₅₋₁₈₀. Das Derivat umfasst die Aminosäuren 45 bis 180. Das Protein besitzt N-terminal einen His₆-Anhang (rot und fett) und eine Thrombinspaltstelle (rot und unterstrichen). Die Aminosäuresequenz, die aus DcuS stammt ist schwarz dargestellt, die Aminosäureaustausche in der Dreifachmutante DcuS(T101G F120M I125S) im Vergleich zum Wildtyp sind mit Pfeilen markiert. Die Indices beziehen sich auf die Positionen der Aminosäuren in DcuS.

Überproduktion der Sensorkinase DcuS

Die Überproduktion und Reinigung von kompletten Wildtyp-DcuS erfolgte ebenfalls über einen induzierbaren T7lac-Promoter und His-tag Affinitätschromatographie. Mittels PCR wurde der Genbereich mit den Primern DcuS-N (CACACAAGGAAGCATATGAGACA-TTC, *NdeI*-Schnittstelle) und DcuS-C (ATTAAAAGCTTGATCATCTGTTCGAC, *HindIII*-Schnittstelle) aus *E. coli* AN387 amplifiziert und in *HindIII* und *NdeI*-restringiertes Plasmid pET28a (Novagen) kloniert. Somit codiert das Plasmid pMW151 (Abb. 5) das komplette DcuS-Protein mit 543 Aminosäuren und zusätzlichen 20 Aminosäuren des His-tags und der Thrombinspaltstelle (Janausch *et al.*, 2002).

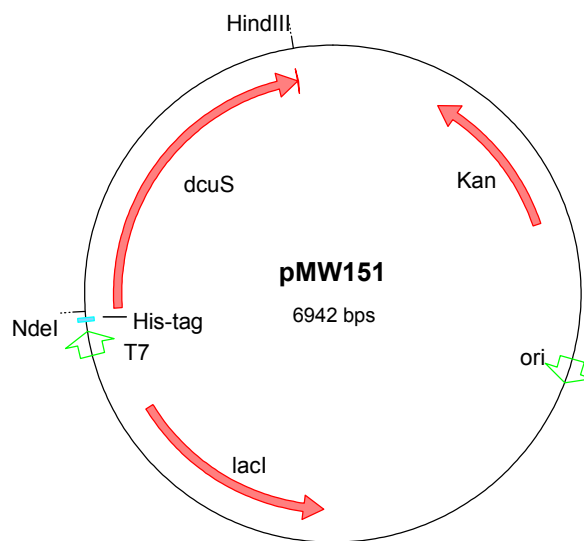


Abb. 5: Das Expressionsplasmid pMW151 zur Überexpression von His₆-DcuS. Die Überproduktion von DcuS steht unter der Kontrolle des T7lac-Promoters. Stromaufwärts befinden sich der T7lac-Promoter, die Sequenz für den His-tag und eine Thrombinspaltstelle.

Überexpression des Responseregulators DcuR

Die Überproduktion von DcuR wurde, wie mit DcuS, in pET28a (Novagen) durchgeführt. Das 0,7 kb große Gen für *dcuR* wurde mit den Primern pDcuR-Nde-22 (GAGGTCGAACAT-ATGATCAATG, *NdeI*-Schnittstelle) und pDcuR-Hind-22 (TAACCAGCGAAGCTT-TATTGGC, *HindIII*-Schnittstelle) amplifiziert und über die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* in das Plasmid pET28a ligiert (Abb. 6). Über das resultierende Plasmid pMW266 (Janausch, 2002) konnte somit DcuR mit 239 Aminosäuren plus zusätzlichen 20 Aminosäuren des N-terminalen His-tags und der Thrombinspaltstelle überproduziert und mittels Affinitätschromatographie isoliert werden.

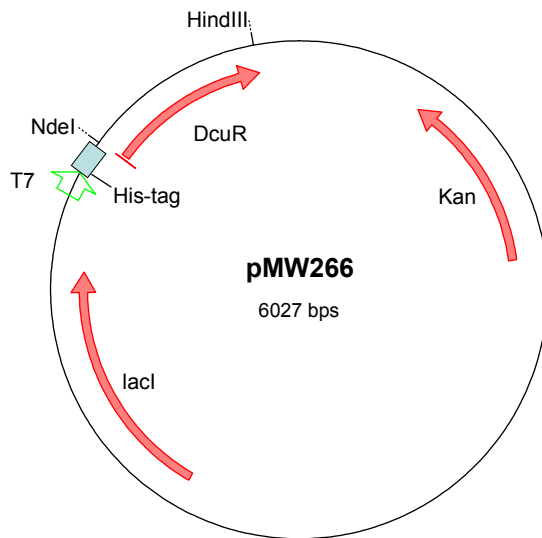


Abb. 6: Das Expressionsplasmid pMW266 zur Überexpression von His₆-DcuR. Die Überproduktion von DcuR steht unter der Kontrolle des T7lac-Promoters. Stromaufwärts befinden sich der T7lac-Promoter, die Sequenz für den His-tag und eine Thrombinspaltstelle.

Komplementation von *dcuS*-Mutanten und Effekt von *dcuB*-Mutanten

Um den Effekt von C₄-Dicarboxylaten auf die Expression der DcuSR-regulierten Gene *in vivo* zu untersuchen, wurde die β -Galactosidase-Aktivität der Stämme IMW237 und IMW260 mit Plasmid pMW181 und Derivaten bestimmt. IMW237 enthält eine *dcuB'*-*lacZ* Reporter-Genfusion. IMW260 entspricht IMW237 bis auf die Inaktivierung von *dcuS* durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette. Die Komplementation des inaktiven *dcuS*-Gens wurde durch Transformation von IMW260 mit pMW181 erzielt. Das Plasmid pMW181 enthält ein 2,2 kb *XbaI*/*HindIII*-Fragment mit dem vollständigen *dcuS*-Gen und dessen Promoter (Abb. 7). Dadurch kann der Effekt von C₄-Dicarboxylaten auf die DcuSR-regulierten Gene mittels *dcuB'*-*lacZ* Reporter-Genfusion, deren Expression unter anaeroben Bedingungen von DcuSR und dem globalen anaeroben Transkriptionsaktivator FNR abhängt, *in vivo* untersucht werden.

Um zusätzlich den Effekt von *dcuB*-Mutanten auf die Induktion DcuSR-abhängiger Gene mittels *dcuB'*-*lacZ*-Fusion zu untersuchen, wurde der Stamm IMW536 verwendet. Bei diesem Stamm ist das Gen für *dcuS* durch eine Spectinomycinresistenz und das Gen für *dcuB* durch eine Chloramphenicolresistenz inaktiviert worden (Kleefeld, 2006).

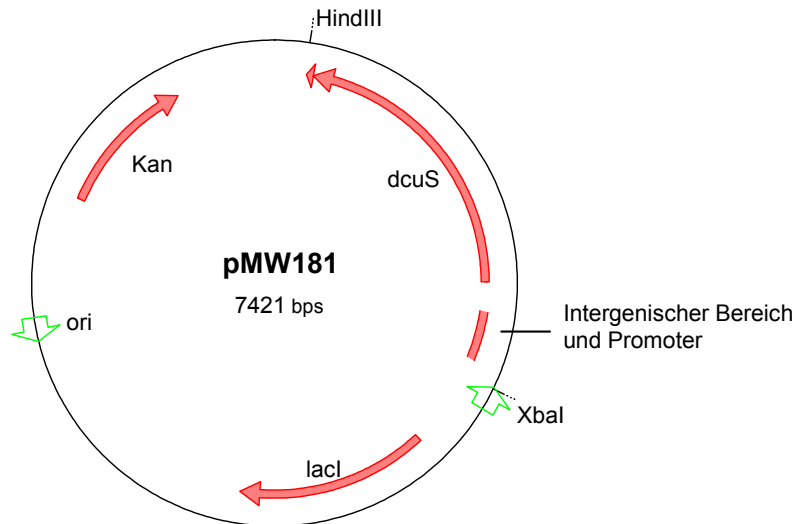


Abb. 7: Das Plasmid pMW181 zur Komplementation von *dcuS*-Mutanten. Das Plasmid enthält eine Kopie des kompletten chromosomalen Gens *dcuS* mit eigenem Promoter mit 2,2 kb.

Zur Komplementation von *dcuS*-Mutanten wurde neben dem Plasmid pMW181 (pET28a mit *dcuS* und eigenem Promoter) das Plasmid pMW473 (pACYC184, p15Aori) konstruiert. Dazu wurde aus genomischer DNA von *E. coli* K12 MG1655 mittels PCR das *dcuS*-Wildtypgen amplifiziert und über *XbaI* und *HindIII*-Schnittstellen in restringiertes Plasmid pACYC184 kloniert (Müller, 2007).

Durch gerichtete Mutagenese an pMW473 wurden die *dcuS*-Punktmutanten pMW543, pMW545 und pMW546 hergestellt. Nach Transformation in den *dcuS*- und *citA*-Defektstamm IMW543 konnte der Einfluss von CitA auf die Citraterkennung mittels β -Galactosidase-Test untersucht werden.

Konstruktion von pET28a-fumB

Das Gen *fumB* für die anaerobe Fumarase B wurde von chromosomaler DNA aus *E. coli* MG1655 mit den Oligonukleotiden fumB-NdeI-for1 (AGGCTGGAACATATGTCAAACA-AAC) und fumB-EcoRI-rev2 GCTGGGCCGAATTCGTTACTTA amplifiziert. Das 1,6 kb Fragment wurde in pET28a (Novagen, 40 – 50 Kopien pro Zelle) hinter einen T7 Polymerase regulierten T7lac Promoter mit den Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* resultierend in Plasmid pET28a-fumB (pMW522) kloniert.

Überexpression von verkürztem DcuS-Konstrukt

Für Strukturuntersuchungen von C-terminal verkürztem DcuS mittels Festkörper-NMR (Solid-state NMR) wurde am 3'-Ende gekürztes DcuS in das Plasmid pET28a hinter einen induzierbaren *T7lac* Promoter kloniert (Kneuper, 2005). Dazu wurde der Genabschnitt, der für den N-terminalen Bereich von DcuS bis zum Ende der cytoplasmatischen PAS-Domäne codiert, per PCR mit den Primern *dcuStmr* (CACAAGGAAGCATATG-AGACATTC) und *dcuSPAS3* (AGACCCTCGAGTTACTGCATC) amplifiziert. Über die Primer wurden die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in die Amplifikate eingeführt, über die das Zielfragment mit 1003 bp in pET28 kloniert wurde. An Aminosäureposition Arg333 (CGA) wurde über den Primer *dcuSPAS3* ein Stoppcodon (TAA) zum Translationsabbruch eingeführt. Das resultierende Plasmid pMW309 ermöglicht die Proteinüberexpression von DcuS/PAS von Aminosäure 1 (Methionin) bis inklusive Position 332 (Glutamin) und eine anschließende Isolation mittels Affinitätschromatographie über einen N-terminalen His-tag (Abb. 8).

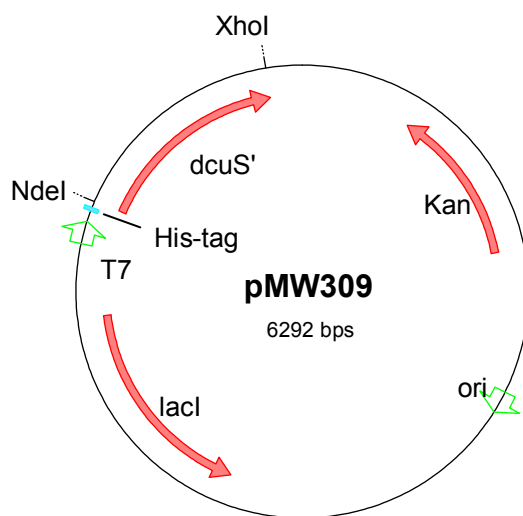


Abb. 8: Das Expressionsplasmid pMW309 zur Überexpression von His₆-DcuS-PD/PAS. Die Überproduktion von C-terminal verkürztem DcuS (DcuS/PAS) steht unter Kontrolle des *T7lac*-Promoters. Stromaufwärts von *dcuS*, nach dem *T7lac*-Promoter, befindet sich die Sequenz für einen His-tag.

Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mittels IPTG in *E. coli* C43(DE3), einer Spontanmutante von BL21(DE3) zur verbesserten Überexpression von Membranproteinen, der eine chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerasegens unter Kontrolle des induzierbaren *lacUV5*-Promoters trägt.

Somit umfasst das Plasmid pMW309 die periplasmatische Domäne, beide Transmembranhelices und die cytoplasmatische PAS-Domäne von DcuS von Aminosäure Met1 bis Gln332 und einem N-terminalen His-tag von 20 Aminosäuren (Abb. 9).

^NMGSSHHHHHSSGLVPRGSHM₁RHSLPYRMLRKRPMKLSTTVILMVSAVLFSVLLV
 VHLYFSQISDMTRDGLANKALAVARTLADSPEIRQGLQKKPQESGIQAIAEAVRKRN
 DLLFIVVTDMQSLRYSHPEAQRIGQPFKGDDILKALNGEENVAINRGFLAQLRVFTPI
 YDENHKQIGVVAIGLELSRVTTQQINDSRWSIIWSVLFGMLVGLIGTCILVKVLKKILFG
 LEPYEISTLFEQRQAMLQSIKEGVVAVDDRGEVTLINDAAQELLNYRKSQDDEKLSTL
 SHWSQVVDVSEVLRDGTTPRRDEEITIKDRLLLINTVPVRSNGVIIGAISTFRDKTEVR
 KLMQ_{332C}

Abb. 9: Aminosäuresequenz von DcuS-PD/PAS. N-terminal befindet sich ein His-tag (His₆, blau und fett) und zusätzliche Aminosäuren (blau). Die Aminosäuresequenz von DcuS (schwarz) umfasst die Aminosäuren Met1 - Gln332.

Konstruktion der DcuS- und CitA-Hybride

Zur Herstellung von Hybriden (Chimären) aus DcuS und CitA wurden Genbereiche von *dcuS* aus *E. coli* und *citA* aus *Klebsiella pneumoniae* in drei verschiedenen Konstrukten kombiniert. Dazu wurden in Plasmid pMW181 (pET28a mit Wildtyp *dcuS* und eigenem Promoter) geeignete Restriktionsschnittstellen per gerichteter Mutagenese mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit eingeführt (Stratagene). Durch Restriktionsverdau konnte der zu substituierende Genbereich herausgeschnitten und nach Agarose-Gelelektrophorese der gewünschte Bereich per Gel-Elution extrahiert werden. Für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Bereiche von *citA* von Plasmid pKP2 mittels PCR wurden Oligonukleotide synthetisiert, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in der Mitte der Sequenz trugen. Nach Verdau und Reinigung konnten die Amplifikate in identisch restringiertes Plasmid pMW181 ligiert werden. Die verbleibenden Restriktionsschnittstellen wurden per Mutagenese in den entsprechenden Wildtypzustand zurückgeführt. Die verwendeten Mutageneseprimer sind in Tab. 5 aufgeführt.

Auf diese Weise wurden die DcuS-CitA-Konstrukte I - III (KI - III) generiert. In Konstrukt I ist die periplasmatische Domäne von *dcuS* durch den homologen Bereich von *citA* ersetzt worden. In Konstrukt II wurde der N-terminale Bereich von DcuS bis zum Anfang der zweiten Transmembranhelix ersetzt. In Konstrukt III ersetzt CitA den kompletten N-terminalen Bereich bis hinter die zweite Transmembranhelix.

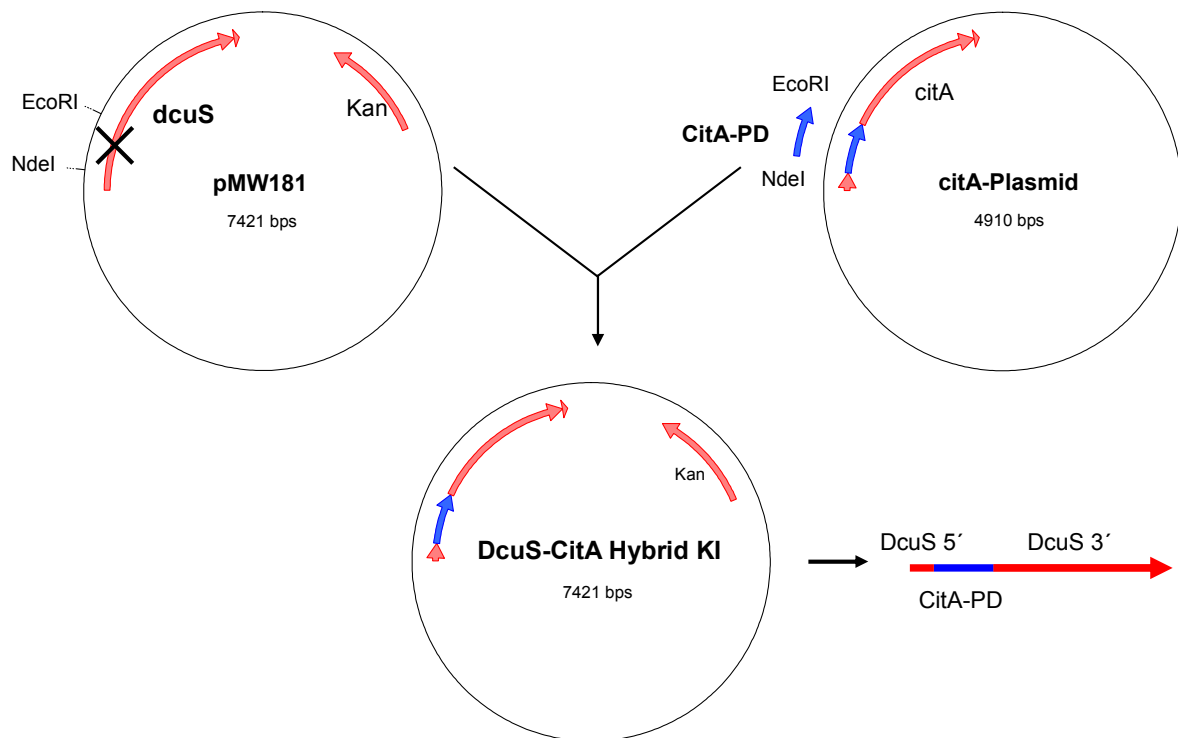


Abb. 10: Klonierungsschema zur Herstellung der Hybridkonstrukte DcuS-CitA KI-III am Beispiel von Konstrukt I. Um bestimmte Genbereiche von *dcuS* per Restriktionsverdau zu entfernen, z.B. im Falle von KI die periplasmatische Domäne, wurden in Plasmid-codiertem *dcuS* (pMW181) per Mutagenese die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* eingeführt. Der homologe Genbereich von *citA* (periplasmatische Domäne CitA, CitA-PD) wurde von Plasmid pKP2 mittels PCR amplifiziert, analog restringiert und mit dem Plasmid ligiert. In dem entstandenen Hybridkonstrukt DcuS-CitA-KI wurde die periplasmatische Domäne von *dcuS* durch die von *citA* aus *Klebsiella* substituiert.

Tab. 5: Verwendete Mutageneseprimer und Standardprimer zur Konstruktion von DcuS/CitA-Hybriden (MWG Biotech, Ebersberg, HPSF gereinigt)

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Effekt	Konstrukt
Mutagenese				
NdeI-DcuSI-for	ATT TAC TTC TCG CAA ATC <u>CAT</u> <u>ATG</u> ATG ACG CGA GAT GGG CTA GC	79,5	<i>NdeI</i> in pMW181 eingeführt	I
NdeI-DcuSI-rev	GCT AGC CCA TCT CGC GTC ATC <u>ATA TGG</u> ATT TGC GAG AAG TAA AT	79,5	<i>NdeI</i> in pMW181 eingeführt	I
EcoRI-DcuS1-for	AGT TAA GCC GTG TGA CCG <u>AAT</u> <u>TCA</u> TCA ATG ACA GTC GCT GG	80,7	<i>EcoRI</i> in pMW181 eingeführt	I, II
EcoRI-DcuS1-rev	CCA GCG ACT GTC ATT GAT <u>GAA</u> <u>TTC</u> GGT CAC ACG GCT TAA CT	80,7	<i>EcoRI</i> eingeführt	I, II

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Effekt	Konstrukt
NdeI-DcuSII-for	TGT CAC ACA AGG AAG CTC <u>ATA</u> <u>TGA</u> CAT TCA TTG CCC TAC C	79,0	<i>NdeI</i> in pMW181 eingeführt	II, III
NdeI-DcuSII-rev	GGT AGG GCA ATG AAT GTC <u>ATA</u> <u>TGA</u> GCT TCC TTG TGT GAC A	79,0	<i>NdeI</i> in pMW181 eingeführt	II, III
EcoRIDcuSIII-f2	CAT TCT GGT TAA GGT ACT <u>GGA</u> <u>ATT</u> CAT CCT TTT CGG CCT GG	78,5	<i>EcoRI</i> in pMW181 eingeführt	III
EcoRIDcuSIII-r2	CCA GGC CGA AAA GGA <u>TGA</u> <u>ATT</u> <u>CCA</u> GTA CCT TAA CCA GAA TG	78,5	<i>EcoRI</i> in pMW181 eingeführt	III
PCR				
K1-NdeI-CitA-fl	GAC ATT ACC <u>CAT ATG</u> CGT CTG C	60,0	<i>NdeI</i> in <i>citA</i> -Amplifikat	I
EcoRI-CitAKP-re2	CAG GCT GAG <u>GAA TTC</u> TTC CAG	59,8	<i>EcoRI</i> in <i>citA</i> -Amplifikat	I, II
NdeI-CitAKP-for1	GGA GAT ATA CAC <u>ATA TGT</u> ATC TAC CC	59,8	<i>NdeI</i> in <i>citA</i> -Amplifikat	II, III
K3-EcoICitAK-r2	GCA TCT <u>GGA ATT</u> CGA TAT GCA GT	58,8	<i>EcoRI</i> in <i>citA</i> -Amplifikat	III
Rückmutation der Schnittstellen in Wildtyp				
R-NdeI-K1-for	ATT TAC TTC TCG CAA ATC <u>GAG</u> <u>GAG</u> CGT CTG CAT TAT CAG GTC	78,8	<i>NdeI</i> entfernt	I
R-NdeI-K1-rev	GAC CTG ATA ATG CAG ACG <u>CTC</u> <u>CTC</u> GAT TTG CGA GAA GTA AAT	78,8	<i>NdeI</i> entfernt	I
R-EcoRI-K2-for	CCA TTG AGC AAC TGG AAA <u>ACC</u> <u>AGA</u> TCA ATG ACA GTC GCT GGA G	79,8	<i>EcoRI</i> entfernt	I, II
R-EcoRI-K2-rev	CTC CAG CGA CTG TCA TTG <u>ATC</u> <u>TGG</u> TTT TCC AGT TGC TCA ATG G	79,8	<i>EcoRI</i> entfernt	I, II
R-NdeI-K2-for	GTC ACA CAA GGA AGC TCA <u>TGT</u> <u>CTA</u> TCT ACC CAA TGT ATA C	79,8	<i>NdeI</i> entfernt	II
R-NdeI-K2-rev	GTA TAC ATT GGG TAG ATA <u>GAC</u> <u>ATG</u> AGC TTC CTT GTG TGA C	79,8	<i>NdeI</i> entfernt	II
R-NdeI-K3-for	TGT CAC ACA AGG AAG CTC <u>ATG</u> <u>TCT</u> ATC TAC CCA ATG TAT AC	79,5	<i>NdeI</i> entfernt	III
R-NdeI-K3-rev	GTA TAC ATT GGG TAG ATA <u>GAC</u> <u>ATG</u> AGC TTC CTT GTG TGA CA	79,5	<i>NdeI</i> entfernt	III
R-EcoRI-K3-for	GCT TCT CAC TGC ATA TCA <u>AAA</u> <u>AAA</u> TCC TTT TCG GCC TGG AAC C	79,6	<i>EcoRI</i> entfernt	III
R-EcoRI-K3-rev	GGT TCC AGG CCG AAA AGG <u>ATT</u> <u>TTT</u> TTG ATA TGC AGT GAG AAG C	79,6	<i>EcoRI</i> entfernt	III

* Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die Sequenzen, welche dem Wildtypzustand von *dcuS* und *citA* nach Entfernung der Schnittstellen entsprechen, sind ebenfalls unterstrichen.

Herstellung elektrokompenter Zellen

Die Herstellung von elektrokompenten Zellen erfolgte nach Farinha *et al* (1990). Hierzu wurde eine Vorkultur in LB-Medium gezogen und eine LB-Hauptkultur von 30 ml 1 %ig mit Inokulum im 300 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln (170-180 Upm) bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ 0,5 bis 0,7. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 10.000 Upm im Rotor 16F6-38 (Eppendorf) wurden die Zellen in 10 ml einer eisgekühlten Glycerin-MOPS-Lösung (15 % Glycerin, 1 mM MOPS) resuspendiert, zentrifugiert und einmal gewaschen. Das Zellpellet wurde erneut in 1 ml Glycerin-MOPS-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 5.000 Upm im Rotor 16F24-11 (Eppendorf) wurde das Pellet in 200 µl Lösung resuspendiert und in Aliquots à 40µl bei -80°C gelagert.

3.5. Biochemische Methoden

Überproduktion der periplasmatischen Domäne von DcuS

Für die Überproduktion der periplasmatischen Domäne von DcuS (DcuS-PD) wurden kompetente Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsplasmid pMW145 transformiert (Pappalardo *et al.*, 2003). Die Hauptkultur wurde 2 %ig aus einer aeroben Vorkultur aus LB-Medium plus Kanamycin angeimpft. Die Zucht erfolgte aerob in M9-Medium mit dem schweren Stickstoffisotop ¹⁵N in einem Gesamtvolumen von 3,2 l in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Schütteln (180 Upm) bei 30°C. Dazu wurden 8 Erlenmeyerkolben jeweils mit 400 ml Medium (20 % des Kolbenvolumens) befüllt. Die Induktion erfolgte bei OD_{578nm} 0,5 bis 0,7 mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Galactopyranosid, Roth). Nach ca. 3 - 4 h folgte die Zellernte durch Zentrifugation (Beckman Avanti JE, JA 10 Rotor, 6.000 Upm, 20 min, 4°C) bei OD_{578nm} 1,3 – 1,5. Die Zellen wurden ab der Ernte immer gekühlt. Die Zellpellets wurden jeweils mit 30 ml Puffer 1_{PD} (50 mM Na/K-P_i-Puffer, pH 7,0; 200 mM NaCl; 10 mM Imidazol, Roth, 3899.2) gewaschen und über Nacht bei -80°C gelagert werden.

Zellaufschluss, Affinitätschromatographie und Konzentrieren von His₆-DcuS-PD

Zum Zellaufschluss wurden jeweils vier Zellpellets (ca. 4 g Nassgewicht pro Pellet) in 30 ml Puffer 1_{PD} vereint und getrennt mittels French Press durch konstanten Druck in 2 – 3 Durchgängen aufgeschlossen. Nicht-aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden im

Anschluss abzentrifugiert (Beckman Avanti JE, F21B Rotor, 10.000 Upm, 20 min, 4°C). Im Überstand befinden sich lösliche Proteine und ein Großteil der Membranen.

Die Reinigung der beiden proteinhaltigen Fraktionen erfolgte in zwei getrennten Durchgängen über eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule (Qiagen) mit einem Säulenvolumen von 3 ml. Dieses Säulenvolumen ist für eine Aufreinigung von bis zu 30 mg His₆-markierten Protein ausreichend. Dabei treten die freien Valenzen des His₆-Anhangs mit dem Ni²⁺-NTA-Komplex in Wechselwirkung und binden das Fusionsprotein an das Säulenmaterial. Zur Reinigung wurde ein Chromatographiesystem (Econosystem, Biorad) verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 10-fachen Volumen (30 ml) an Puffer 1_{PD} equilibriert. Anschließend wurde der erste proteinhaltige Überstand vom Zellaufschluß auf die Säule aufgetragen und mit 10-fachem Volumen Puffer 2_{PD} (Waschpuffer: 50 mM Na/K-P_i-Puffer pH 7,0; 200 mM NaCl; 20 mM Imidazol) gewaschen. Mit 20 ml Puffer 3_{PD} (Elutionspuffer: 50 mM Na/K-P_i-Puffer pH 7,0; 200 mM NaCl; 500 mM Imidazol) wurde das gebundene Protein durch das Histidin-Struktur analogon Imidazol eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Anschließend wurde die Säule zunächst mit Puffer 1_{PD} equilibriert (30 ml) und der zweite proteinhaltige Überstand vom Zellaufschluß aufgetragen, gewaschen und eluiert. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) mit Roti^R-Quant-Lösung (Roth) bestimmt, wobei das meiste Protein in den Fraktionen 2 - 8 mit einer Konzentration von 1 - 2 mg/ml war.

Anschließend wurden die proteinhaltigen Proben homogenisiert und in nach Beschreibung vorbehandelten Dialyseschläuchen (MWCO 10.000; ZelluTrans; Roth) vereint und 1 – 2 h gegen 100-faches Volumen Puffer 4_{PD} (50 mM Na/K-P_i-Puffer pH 7,0; 200 mM NaCl; 5 mM Imidazol) bei 4°C dialysiert. Die Dialyse wurde spätestens bei beginnender Proteinaggregation beendet.

Zur Abspaltung des His₆-Anhangs wurden die dialysierten Proben vereint und mit Thrombin-Protease (15-20 U/mg Protein; Amersham, Pharmacia Biotech) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut über eine mit 15 ml Puffer 4_{PD} equilibrierte Säule gereinigt. Der His₆-Anhang bindet per Affinitätschromatographie an die Säule, das His₆-freie Zielprotein läuft durch die Säule und wurde als Durchlauf gesammelt. Mit 2 - 3 ml Puffer 1_{PD} ohne Imidazol wurde nachgespült und ebenfalls in Fraktionen gesammelt.

Zur Konzentrierung der Proteinlösung wurde die Proteinlösung in 5 ml Vivaspin-Concentrator-Röhrchen mit einer Ausschlussgröße von 10.000 (Molecular weight cut off; MWCO, Vivascience, Sartorius) überführt und mehrfach zentrifugiert (Beckman Avanti JE,

JA-14 Rotor, 7.000 Upm, 30 – 60 min, 4°C). Das eingeeingte Protein wurde im Überstand (Puffer 4_{PD}) resuspendiert und die Konzentration regelmäßig bestimmt.

Für die Flüssig-NMR-Spektroskopie wurden die Proben mit einem Endvolumen von 300 – 310 µl vorbereitet. Die Proteinlösung mit 25 – 30 mg/ml Protein in Puffer 4_{PD} (50 mM Na/K-P_i-Puffer pH 7; 200 mM NaCl; 5 mM Imidazol) wurde auf eine Endkonzentration mit 10% D₂O, 0,01 – 0,03% NaN₃, 50 µM Pefabloc und 50 mM Glycin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die NMR-Spektroskopie wurde von der Arbeitsgruppe Prof. C. Griesinger, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen durchgeführt.

Überproduktion von DcuS und von dem verkürztem Konstrukt DcuS-PD/PAS

Für die Überproduktion von DcuS-His₆ wurde *E. coli* C43(DE3) mit pMW151 transformiert. Die Zucht erfolgte in LB-Medium mit 55,4 ml/l 2 M Glucose um eine basale Proteinexpression vor der Induktion zu verhindern. Das komplette Wildtyp-DcuS wurde für die Phosphorylierungsversuche eingesetzt.

Zur Überproduktion des verkürzten DcuS-Konstrukts His₆-DcuS-PD/PAS für die Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde pMW309 in *E. coli* C43(DE3) transformiert. Die uniform markierte Zucht erfolgte in M9 Medium (ohne ¹⁴N-NH₄Cl) mit ¹⁵N-NH₄Cl, ¹³C-Glucose und mit den Zusätzen CaCl₂ und MgSO₄. Für revers markierte Zuchten wurden zusätzlich unmarkierte Aminosäuren (F, I, L, R, K, V) angeboten.

Für die Hauptkulturen wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit maximal 20 % des Gesamtvolumens befüllt und mit 2 % Inokulum einer LB-Vorkultur plus Antibiotikum beimpft. Die aerobe Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 30°C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 – 0,8. Die Induktion wurde mit 1 mM IPTG (Roth) eingeleitet und nach weiteren 4 – 5 h wurden die Zellen bei OD₅₇₈ 5 - 6 geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Beckman Avanti JE, JA10 Rotor, 6.000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet und anschließend das Pellet in Puffer 1_{Rek} gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Pellets konnten über Nacht bei -80°C gelagert werden oder direkt weiterverwendet werden.

Zellaufschluss

Jedes Pellet wurde einzeln in 20 ml Puffer 1_{Rek} (50 mM TrisHCl pH 7,7; 10 mM MgCl₂) resuspendiert und per French Press in 3 Durchgängen bei 1200 Psi aufgeschlossen. Dies war im Gegensatz zur Isolierung der periplasmatischen Domäne von DcuS nötig, um eine erhöhte

Ausbeute an membranständigen DcuS zu gewährleisten. Nicht-aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation (FiberLite F21B Rotor, 10.000 Upm 10 min, 4°C) abgetrennt. Die Membranfraktion wurde durch Ultrazentrifugation (Beckman Coulter Optima LE-80K, Kontron TFT70.38 Rotor, 200.000 x g, 65 min, 4°C) erhalten. Diese wurde in zwei Durchgängen mit Membranwaschpuffer (1 mM TrisHCl pH 7,7; 3 mM EDTA) gewaschen (Kontron TFT70.38 Rotor, 200.000 x g, 20 min). Zum Homogenisieren im Potter S (Braun, Melsungen) wurde das Nassgewicht des Pellets bestimmt und pro g Membran 10 ml Puffer 2_{Rek} (50 mM TrisHCl pH 7,7; 0,5 M NaCl; 10 % Glycerin; 10 mM Imidazol) verwendet.

Homogenisieren, Solubilisieren und Affinitätschromatographie

Die Solubilisierung der membranständigen Proteine erfolgte im Potter durch sukzessive Zugabe des Detergenz Empigen BB (N-N-Dimethyl-N-dodecyl-betain, 35%ig in Wasser, Fluka, 45165) bis zur Endkonzentration von 2 %. Die Solubilisierung wurde für 30 min auf Eis und unter Rühren fortgesetzt. Anschließend folgte die Abtrennung der Membranen bei 300.000 x g für 50 min. Der Überstand enthielt die aus den Membranen gelösten Proteine und wurde in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Die Reinigung von His₆-DcuS/PAS erfolgte per Affinitätschromatographie über eine Ni²⁺-NTA-Matrix (Qiagen) mit einem Säulenbettvolumen von 2 ml und einer Bindekapazität von 5-20 mg 6xHis-Protein / ml Matrix). Proteine mit 6xHis-Label binden hierbei nicht-kovalent an die Ni²⁺-Ionen und Proteine ohne His₆-tag laufen durch die stationäre Phase. Die Reinigung wurde entweder mittels Econosystem (Biorad) oder per Schwerkraft bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde die Säulenmatrix mit 30 Vol. Puffer 3_{Rek} (50 mM TrisHCl pH 7,7; 0,5 M NaCl; 10 % Glycerin; 20 mM Imidazol; 0,04 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid-Lösung, 30 %, Fluka) equilibriert und anschließend mit löslichem Protein beladen (Flussrate 0,5 ml/min, Schwerkraft teils schneller). Die Säule wurde mit 20 Vol. Puffer 3_{Rek} gewaschen. Die Elution resultierte in Puffer 4_{Rek} (wie Puffer 3_{Rek} aber mit 500 mM Imidazol) und wurde in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Zur Bestimmung der Konzentrationen per Bradford mit Roti^R-Quant (1976) und der Reinheit mittels SDS-PAGE wurden jeweils 50 µl getrennt gesammelt.

Rekonstitution von DcuS

DcuS soll in *E. coli* Phospholipiden rekonstituiert werden. Dazu wurden 100 mg Phospholipide (20 mg/ml, *E. coli* Polar Lipid Extract, Avanti Polar Lipids) im Rotationsverdampfer getrocknet und in 5 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 80 mg

N-Octyl- β -D-Glucopyranosid (Gerbü) gelöst. Um das Detergenz zu entfernen und die Bildung von Liposomen aus den Phospholipiden zu ermöglichen, wurde die Lösung über Nacht gegen 3 x 1 Liter 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 dialysiert. Die daraus resultierende Liposomensuspension wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut, um unilamellare Vesikel zu erhalten.

Die Destabilisation der Phospholipide erfolgte mit dem Detergenz Triton X-100 (Gemisch aus p-t-Octylphenyl-polyoxyethylene). Zur Untersuchung von verkürztem DcuS-Konstrukt (DcuS-PD/PAS) wurde ein effektives Detergenz:Lipid Verhältnis von 2,5 eingehalten (Rigaud *et al.*, 1988; Rigaud *et al.*, 1995). Dies führt zu komplett detergenzgesättigten und destabilisierten Phospholipiden. Die verwendete totale Detergenzkonzentration (D_T) ergab sich nach Paternostre *et al.* (1988).

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

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

D_W = Konzentration des monomeren Detergenz in der wässrigen Phase (0,18 mM für Triton X-100)

$R_{\text{eff}} = (2,5)$, molares Verhältnis Detergenz / Lipid ($R_{\text{eff}} = D_{\text{total}} - D_{\text{water}} / [\text{Lipid}]$);

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

Zu den komplett destabilisierten Lipiden wurden 5 – 10 mg Proteinlösung zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Das Lipid:Protein-Verhältnis (w/w) betrug 7,5:1 und 10:1 (verkürztes DcuS-PD/PAS-Konstrukt). Das Detergenz wurde mittels Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad, 152-3920) entfernt (Holloway, 1973). Um die verbleibenden Luftblasen zu entfernen wurden die nicht-polaren Polystyrol Beads in 50 mM TrisHCl pH 7,7 aufgenommen und unter Rühren für 60 min anaerobisiert. Pro mg Triton X-100 wurden 5 mg Bio-Beads zugegeben und die Suspension für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge an frischen Bio-Beads zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Schütteltisch inkubiert. Am nächsten Tag wurden abermals die gleiche Menge an frischen Bio-Beads zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand der rekonstituierten Probe wurde von den Bio-Beads abgenommen und in Ultrazentrifugenröhrchen mit Rekonstitutionspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,7) auf mind. 20 ml aufgefüllt. Die Proteoliposomen wurden zentrifugiert (Kontron TFT70.38 Rotor, 300.000 x g, 50 min, 4°C) und zweimal gewaschen (300.000 x g, 15 min, 4°C). Die Pellets wurden in Puffer (50 mM TrisHCl pH 7,7) zu der gewünschten Konzentration aufgenommen und in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur langsam wieder aufgetaut. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Verwendung.

Für Phosphorylierungsversuche mit Wildtyp-DcuS (pMW151) erfolgte die Destabilisierung der Phospholipide mit 0,5% (w/v) Triton X-100. Die Rekonstitution in *E. coli* Phospholipide wurde im Rekonstitutionsverhältnis von 20:1 (w/w) durchgeführt. Nach der Inkubation mit den Bio-Beads wurde der Überstand entnommen, aliquotiert und nach schockfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Das Pelletieren der DcuS-haltigen Phospholipide per Ultrazentrifugation entfiel. Die übliche Konzentration an rekonstituiertem DcuS war 0,8 – 1 mg/ml.

Saccharose-Dichtegradient

Zur Überprüfung der Rekonstitution wurden in einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten 5, 10, 20 und 45 %ige Saccharoselösungen aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (50 % Saccharose in 50 mM TrisHCl pH 7,7) in 50 mM TrisHCl pH 7,7 frisch angesetzt. Für den Stufengradienten wurden nacheinander die Saccharoselösungen in Schichten in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und darauf geachtet, dass sich die verschiedenen Phasen nicht vermischen. Deshalb wurde mit der niedrigst konzentrierten Saccharoselösung begonnen und mit den weiteren Verdünnungen in aufsteigenden Konzentrationen unterschichtet. Auf die 5 %ige Saccharosephase wurde abschließend ein Aliquot der Probe, aufgenommen in 50 mM TrisHCl pH 7,7, aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 200.000 x g für 2 h (Kontron TFT70.38 Rotor) unter langsamer Beschleunigung und Abbremsung des Laufes.

Festkörper-NMR-Messungen

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde in der Gruppe von Dr. Marc Baldus in der Abteilung „NMR basierte Strukturbioogie“ von Prof. Griesinger am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Überproduktion von DcuR-His₆

Für die Isolation von DcuR-His₆ wurde pMW266, welches das komplette *dcuR*-Gen hinter einem induzierbaren T7lac-Promoter enthält, in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und in LB-Medium + Glucose, wie für DcuS angegeben, gezüchtet. Die Isolation wurde mit den angegebenen Puffern bei pH 7,0 und pH 7,7 getestet. Die Zellpellets aus 800 ml Zucht wurden zusammen in Puffer 2_{DcuR} (50 mM TrisHCl pH 7,0, 0,5 M NaCl, 10% Glycerin, 10 mM Imidazol pH 7,0) resuspendiert und per French Press bei 1200 Psi aufgeschlossen. Nach dem Abtrennen der Zelltrümmer per Zentrifugation (FiberLite F21B Rotor, 10.000 Upm, 10

min, 4°C) wurde der Überstand auf eine Ni-NTA-Matrix (3 ml), equilibriert mit 25 Vol. Puffer_{2DcuR}, aufgetragen. Nach dem Waschen mit 20 Vol. Puffer_{8DcuR} (50 mM TrisHCl pH 7,0; 0,5 M NaCl; 10% Glycerin; 40 mM Imidazol pH 7,0; 1 mM DTT) wurde DcuR-His₆ mit 10 ml Puffer_{9DcuR} (50 mM TrisHCl pH 7,0; 0,5 M NaCl; 10% Glycerin; 500 mM Imidazol pH 7,0; 1 mM DTT) eluiert und nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR

25 µg rekonstituiertes DcuS-His₆ (pMW151) wurde in Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,0, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 20 mM Fumarat) in einem Endvolumen von 60 µl aufgenommen. Der Ansatz (ca. 6,6 µM DcuS) wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Dies führte zu einer homogenen Pufferkonzentration im Lumen und der Umgebung der Proteoliposomen. Nach dem dritten Mal Auftauen wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur weiter inkubiert, um eine verbesserte Assemblierung der DcuS-haltigen Liposomen zu ermöglichen. Die Auto-Phosphorylierung von DcuS wurde durch Zugabe von 0,14 µM [γ ³³P]-ATP (110 TBq/mmol, Hartmann Analytic) gestartet und für 30 – 45 min inkubiert. Wenn angegeben, wurde die ATP-Konzentration mit unmarkiertem ATP bis 3.000 µM ergänzt. Die relative Menge an gebundenem Phosphat wurde durch Extrapolation berechnet. Dazu wurden die spezifische Radioaktivität (Gesamt-ATP/radioaktives ATP) und die Intensität des radioaktiven Signals (Schwärzung) multipliziert.

Zum Testen des Phosphatgruppentransfers von DcuS-His₆ auf DcuR-His₆ *in vitro* wurden pro µg DcuS 4 µg isoliertes DcuR beigegeben und zu den angegebenen Zeitpunkten 6 – 10 µl Probe entnommen und in 2x SDS-Puffer aufgenommen. Um die Effekte von kaltem, nicht-radioaktivem ATP, ADP und einem Überschuss von rekonstituiertem DcuS auf die Stabilität von phosphoryliertem DcuR zu testen, wurde radioaktiv phosphoryliertes DcuS mit DcuR für eine Minute inkubiert. Das in Liposomen rekonstituierte DcuS wurde per Zentrifugation (Sigma 1K15, 12024 Rotor, 21.000 x g, 5 min bei RT) sedimentiert. Eine übliche Pelletierung mittels Ultrazentrifugation (Kontron TFT70.38 Rotor, 300.000 x g, 15 min) mit speziellen Reaktionsgefäßen (Polyallomer Microfuge, maximal 186.000 x g, Eppendorf) war nicht nötig. Gelöstes DcuR befand sich im Überstand und konnte unverzüglich weiterverwendet werden. Die Abtrennung von verbleibendem [γ ³³P]-ATP, ADP und [γ ³³P]-PO₄³⁻ aus dem Überstand wurde per Gelfiltration mit Sephadex-haltigen Säulen (Ausschlussgröße 5.000 Da) durchgeführt (Microspin G-25 bzw. PD MiniTrap G-25, GE Healthcare, München). Sephadex besteht aus makroskopischen Beads, welche auf synthetischem Weg aus dem Polysaccharid

Dextran gewonnen werden. Diese organischen Ketten sind quervernetzt und bilden so ein dreidimensionales Netzwerk mit Poren. Moleküle, die kleiner sind als die Matrixporen, z.B. ATP, penetrieren in diese und werden zurückgehalten. Moleküle, die größer sind als die Poren der Säulenmatrix, in diesem Fall das Regulatorprotein DcuR-P, sind von der Matrix ausgeschlossen und eluieren zuerst.

Zu den erwähnten Zeitpunkten wurden im Überschuss 0,2 mM ATP, 0,2 mM ADP bzw. 50 µg rekonstituiertes und unphosphoryliertes DcuS hinzugefügt und Proben in 2x SDS-Puffer aufgenommen. Mittels SDS-PAGE, ohne vorheriges Kochen der Proben bei 95°C, wurden 2 µg DcuS bzw. 8 µg DcuR pro Spur elektrophoretisch getrennt und die Gele im Anschluss auf Phosphor Imaging Plates (BAS-MP2040, Fujifilm) für 16 – 48 h in den jeweiligen Kassetten exponiert. Die Imaging Platten wurden mit Saranfolie (Dow Chemical Company, U.S.A.) abgedeckt, so dass kein direkter Kontakt der Platte mit dem SDS-Gel stattfinden konnte. Die Phosphorylierung von Proteinen mit radioaktivem [$\gamma^{33}\text{P}$]-Phosphat wurde über einen Phosphoimager detektiert (Fluorescent Imagereader FLA7000, Fujifilm, Düsseldorf). Zur Quantifizierung der Phosphorylierung wurde die Software Gel-Pro Analyzer 6.0 (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA) genutzt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit der isolierten Proteine wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Dazu wurden 12,5 % Acrylamid-SDS-Gele (Oberer Stammepuffer: 0,5 TrisHCl pH 6,8, Unterer Stammepuffer: 1,5 M TrisHCl pH 8,8) mit Schichtdicken von 0,75 mm hergestellt. Das Ansetzen des SDS-Gele entspricht ansonsten den Angaben gemäß Sambrook *et al.* (1989). Zur Überprüfung der induzierten Zuchten wurden je 1 ml Probe vor und nach der Induktion entnommen und abzentrifugiert. Die Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer (100 mM TrisCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4 % SDS (w/v), 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin) (Farinha *et al.* 1990) erfolgte dem Wachstum der Kulturen entsprechend. Je OD_{578nm} von 1,5 wurde das Pellet mit 100 µl SDS-Probenpuffer versetzt und resuspendiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95°C gekocht und in einem Volumen von 10 µl in die Elektrophorese eingesetzt. Von den Elutionsfraktionen wurden je 10 µl Probe mit 10 µl 2xSDS-Probenpuffer versetzt und gekocht. Für die Elektrophorese wurden 10 – 20 µl, entsprechend 1 – 20 µg Protein, aufgetragen. Als Größenmarker diente ein Standard-Proteinmarker mit Bovinen Serum Albumin (BSA), Ovalbumin und Lysozym (5 µl). Der Gellauf erfolgte bei 120 V für 1,5 – 2 h (Bio-Rad, PowerPac Basic) in Laufpuffer (5,44 g/l Tris; 25,92 g/l Glycin; 9 ml/l 10% SDS). Anschließend wurden die

Polyacrylamidgele in Coomassie Blau Färbelösung (2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva); 5 % Methanol (Roth); 10 % Eisessig (Riedel-de Haen, in Umkehrosmose-Wasser)) unter Schütteln für 15 – 25 min fixiert und gefärbt. Die Entfärbung erfolgte entweder mit Entfärbelösung (5 % Methanol; 10% Eisessig in Umkehrosmose-Wasser) oder mit Wasser, bis eine Unterscheidung der Banden möglich war.

Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Die β -Galactosidase-Aktivität wurde nach Miller (1992) bestimmt. Für die Zuchten wurden jeweils 5 ml Kulturvolumen angesetzt. Die Zellen wurden während der logarithmischen (exponentiellen) Wachstumsphase bei einer ΔOD_{578nm} von 0,5 bis 0,8, jedoch spätestens nach 48 h, verwendet. Alle β -Galactosidase-Tests wurden aus drei unabhängigen Zuchten mit je 4 Parallelbestimmungen wiederholt durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Citraterkennung durch die C₄-Dicarboxylat-/Citrat-Sensorkinase DcuS

Unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten reguliert das Zweikomponentensystem DcuSR die Gene der Fumaratatmung. Neben diversen C₄-Dicarboxylaten wie Fumarat, Succinat, L-Malat, L-Aspartat und Maleinat stimuliert auch das C₆-Tricarboxylat Citrat die Expression DcuSR-regulierter Gene. Es wird vermutet, dass die Stimulierung von DcuS durch Citrat ebenso wie durch die C₄-Dicarboxylate über die periplasmatische Domäne von DcuS (DcuS-PD) erfolgt.

DcuS ist ein Mitglied der CitA/DcuS Familie von Sensor-Histidinkinasen und ist mit 27 %iger Sequenzidentität mit CitA verwandt. Die CitA/DcuS-Familie beinhaltet Sensoren, die für das Erkennen von Di- und Tricarboxylaten spezifisch sind (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002b). CitA ist die membrangebundene Sensorkinase des Zweikomponentensystems CitA/CitB aus *Klebsiella pneumoniae* und ist für die Induktion der Gene der Citratfermentation (*citC*- und *citS*-Operon) verantwortlich (Bott *et al.*, 1995; Kaspar *et al.*, 1999). Beide Sensoren sind typische Sensor-Histidinkinasen und zeigen mit einer C-terminalen cytoplasmatischen PAS- und Kinase-Domäne und zwei Transmembranhelices, die über eine große periplasmatische Domäne verbunden sind, eine identische Topologie (Bott *et al.*, 1995; Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002b).

Die periplasmatische Domäne der Histidin-Autokinase CitA fungiert als spezifischer und affiner Citrat-Sensor mit einem K_D von 5,5 µM bei pH 7 (Gerharz *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu detektiert DcuS eine Mehrzahl an C₄-Dicarboxylaten und Citrat, allerdings mit geringer Affinität (Kneuper *et al.*, 2005). Die Stimulierung der Expression von DcuSR-abhängigen Genen durch C₄-Dicarboxylate und Citrat wurde *in vivo* durch Verwendung einer *dcuB*'-'*lacZ* Reportergenfusion charakterisiert. Der apparente K_D für die DcuSR abhängige Expression liegt bei 0,5 – 3,0 mM für C₄-Dicarboxylate und 7 mM für Citrat (Kneuper *et al.*, 2005).

Die Struktur der periplasmatischen Domäne und die Liganden zur Citraterkennung von CitA aus *Klebsiella pneumoniae* sind ausführlich charakterisiert (Reinelt *et al.*, 2003; Gerharz *et al.*, 2003). CitA erkennt Citrat in zweifach deprotonierter Form (Citrat-H²⁻) mit hoher Affinität (K_D 5,5 µM, pH 7,0) und Spezifität über die drei Carboxylgruppen (-COOH) und die Hydroxylgruppe (-OH). Dabei spielen die essentiellen Reste R109_C, H112_C und K152_C der Bindestellen C1, C2 und C3 eine entscheidende Rolle. Neben Citrat werden keine anderen C₆-Tricarboxylate (Isocitrat, Tricarballoylat) oder Dicarboxylate (Fumarat, Succinat, Malat,

Tartrat) von CitA als Effektoren detektiert (Kaspar *et al.*, 1999). Der Index C steht für Aminosäuren aus CitA; analog steht Index D für Positionen in DcuS. Der essentielle Rest R150_C gehört zur Hydroxyl-Bindestelle H. Die periplasmatische Domäne von DcuS verfügt über die homologen Reste R107_D, H110_D und F149_D der Bindestellen C1 bis C3 und R147_D für die Hydroxyl-Bindestelle. Diese Reste sind für alle für die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten essentiell. Demzufolge benötigt die Effektorerkennung in DcuS die gleichen Bindestellen (Liganden), die auch für die Citraterkennung in CitA verantwortlich sind, obwohl die dritte Carboxylgruppe und die Hydroxylgruppe nicht vorhanden sind.

Citrat ist für DcuS aus *E. coli* ebenfalls ein Effektor und stimuliert die Expression der Zielgene des DcuSR-Zweikomponentensystems. Der app. K_D ist mit 7 mM mit dem anderer C₄-Dicarbonsäuren vergleichbar (app. K_D 0,5 – 3,0 mM), jedoch ist DcuS um ein vielfaches weniger affin als die Citrat-spezifische Histidinkinase CitA (K_D 5,5 µM bei pH 7,0).

Folgend sollte untersucht werden, ob die Citraterkennung von DcuS die gleichen Reste und Bindestellen (C1 bis C3 und H-Stelle) benötigt, die auch für die C₄-Dicarboxylaterkennung gebraucht werden. Um die Unterschiede der C₄-Dicarboxylat- und Citraterkennung genauer zu untersuchen, wurden die Sequenzen und die vorhandenen Strukturinformationen von DcuS und CitA verwendet, um DcuS in einen spezifischen Sensor für C₄-Dicarboxylate und für Citrat umzuwandeln. In einer ausführlichen Analyse der 3D-Struktur der periplasmatischen Domänen von CitA und DcuS (Abb. 11), der Sequenzen beider Proteine (Abb. 12), und der Strukturen der Effektoren (Citrat bzw. C₄-Dicarboxylate) wurden Aminosäuren identifiziert, die für die Umwandlung des C₄-Dicarboxylat-Sensors in einen Citratsensor verantwortlich sein könnten (Kooperation mit Prof. Lupas, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen).

Unterscheidung von DcuS und CitA durch Subtyp-spezifische Aminosäurereste

Die Citratbindung der periplasmatischen Domäne von CitA erfolgt über die Bindungsstellen C1, C2 und C3 für die Carboxylatgruppen und über die H-Stelle für die Hydroxylgruppe (Reinelt *et al.*, 2003) (Abb. 11B-D). Die Reste R109_C und T101_C der Bindestelle C2 ligandieren die zentrale Carboxylgruppe von Citrat, und die Stelle C3 mit den Resten H112_C, S144_C und L145_C eine der seitlichen Carboxylgruppen. Die Stellen C2 und C3 befinden sich am Ausgang der Bindetasche (Abb. 11B). Weiter innerhalb der Bindetasche befinden sich die Reste der dritten Carboxylat-Bindestelle C1 mit den Liganden K152_C und S167_C und die Hydroxyl-Bindestelle H mit R150_C.

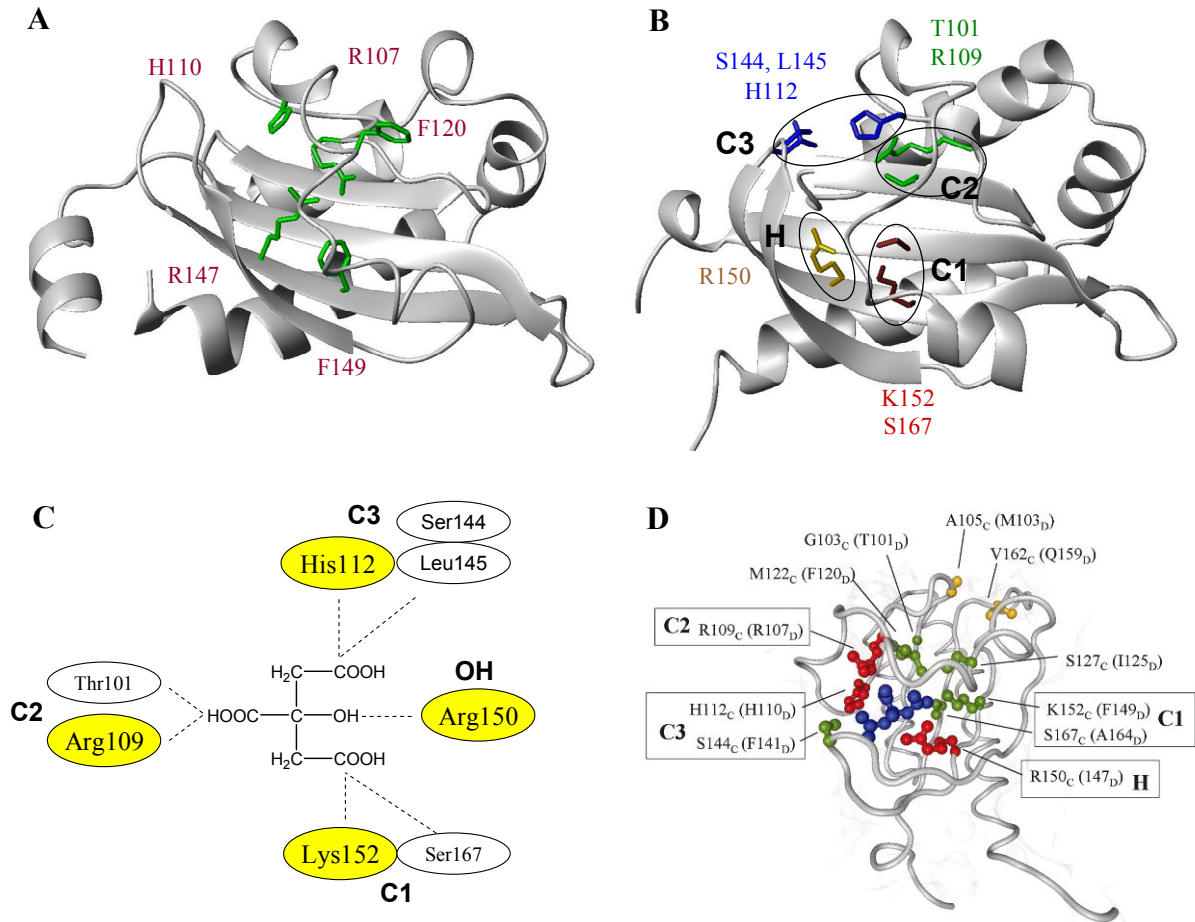


Abb. 11: Effektorbindung von DcuS und CitA. Essentielle Aminosäuren der periplasmatischen Domänen zur Bindung von Fumarat in DcuS (**A**) und Citrat in CitA (**B**). Die beteiligten Reste sind in den Sekundärstrukturen der periplasmatischen Domänen von DcuS und CitA (ohne Effektor) hervorgehoben. (**C**) Citrat wird durch Wasserstoffbrücken über die Stellen C1 bis C3 und H in CitA koordiniert (abgeändert nach Reinelt *et al.*, 2003). Essentielle Reste aus CitA mit homologen Effektor koordinierenden Resten in DcuS sind gelb unterlegt. (**D**) Kombinierte Abbildung mit Positionen konservierter und Subtyp-spezifischer DcuS-Reste im Vergleich zu CitA. Die Reste sind mit den Indices C für CitA und mit D für DcuS in Klammern vermerkt. Essentielle Reste (rot), Subtyp-spezifische in der Bindetasche (grün) und außerhalb der Bindetasche (orange).

Die Reste R109_C, H112_C, R150_C und K152_C der Bindestellen C1 – C3 und H (Abb. 11C) sind für die Bindung von Citrat in CitA essentiell (Reinelt *et al.*, 2003; Gerharz *et al.*, 2003). Die homologen Reste R107_D, H110_D, R147_D und F149_D aus DcuS sind für die C₄-Dicarboxylat-Erkennung essentiell (Abb. 11C, D). Dies ließ vermuten, dass die Bindestellen für das Erkennen von C₄-Dicarboxylaten wie Fumarat, dieselben Bindestellen benötigt wie die Citraterkennung in CitA.

Ein Sequenzalignment der periplasmatischen Domäne von DcuS und CitA zeigte, dass die essentiellen Reste für die Effektorbindung mit R109_C/R107_D, H112_C/H110_D und R150_C/R147_D (rot in Abb. 11D, Abb. 12) universell konserviert sind. Hingegen ist der Rest

K152_C/F149_D Subtyp-spezifisch für DcuS. Über bioinformatische Methoden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lupas (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) wurden die Aminosäuren T101_D, M103_D, F120_D, I125_D, F141_D, Q159_D, A164_D als Subtyp-spezifisch für DcuS identifiziert (Abb. 11D und 12). Diese Reste als auch die essentiellen Reste R107_D, H110_D, R147_D und F149_D wurden einzeln und in diversen Kombinationen in DcuS mutiert, um so die Citratbindung von DcuS und die Unterschiede zur C₄-Dicarboxylatbindung aufzuklären.

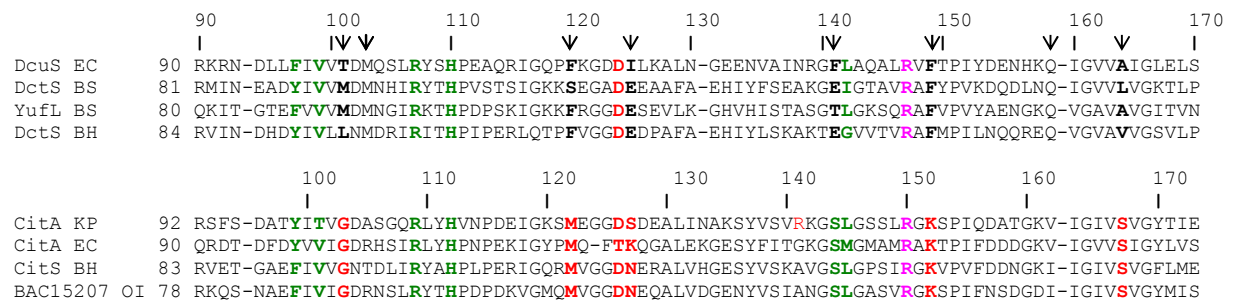


Abb. 12: Alignment der Aminosäuresequenzen der C₄-Dicarboxylat- bzw. C₆-Tricarboxylat-Bindestellen der Sensoren DcuS und CitA. Die Sequenzen sind auf die Reste 90 bis 170 von DcuS limitiert (*E. coli*) und zeigen den Großteil der periplasmatischen Domänen von DcuS (AAs 42 bis 181) und CitA (AAs 145 bis 180). Die Reste in Nähe des Ausgangs der Bindetasche in DcuS und CitA sind in grün, Reste des verborgenen Bereich der Bindestelle in rot und die dazwischen in magenta. Konservierte und essentielle Reste von DcuS und CitA und die Liganden der Citratbindung von CitA sind hervorgehoben. Die Subtyp-spezifischen Reste sind durch Pfeile markiert. Abkürzungen: *Escherichia coli* (EC), *Bacillus subtilis* (BS), *Bacillus halodurans* (BH), *Klebsiella pneumoniae* (KP), OI, *Oceanobacillus ihejensis* (OI)

Gerichtete Mutagenese der essentiellen und der Subtyp-spezifischen Reste von DcuS und Expression von *dcuB*'-*lacZ*

Die Rolle diverser Aminosäuren in der periplasmatischen Domäne von DcuS (DcuS-PD) auf die Substraterkennung sollte untersucht werden. Dazu wurden Punktmutationen gezielt in DcuS-PD eingeführt und ihr Einfluss auf die Funktion von DcuS mittels *dcuB*'-*lacZ* Reportergenfusion *in vivo* untersucht. Die Expression von *dcuB* wird durch das Zweikomponentensystem DcuSR und Fumarat als Induktor stimuliert (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999). Der Funktionszustand von DcuS und seine Aktivierung durch Fumarat bzw. Citrat können damit anhand der β -Galactosidaseaktivität bestimmt werden, die von *dcuB*'-*lacZ* gebildet wird. Die Expression von *dcuB* hängt unter anaeroben Bedingungen von

DcuS ab und ist demnach ein geeigneter Indikator für den Funktionszustand der DcuS-Mutanten.

Hierzu wurde eine *dcuS*-Insertionsmutante (IMW260) verwendet, die eine *dcuB'*-*lacZ*-Fusion trägt. Das inaktivierte chromosomale *dcuS* Gen wurde mit Plasmid-codiertem *dcuS* (pMW181) und dessen mutierten Derivaten komplementiert und die Expression von *dcuB* in Anwesenheit von Effektoren bestimmt. (Kneuper *et al.*, 2005). Unter induzierenden Bedingungen zeigte der *dcuS*-negative Ausgangsstamm (IMW260) keine Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Nach Komplementation mit Plasmid-codiertem DcuS war die Expression des Reportergens sowohl mit Fumarat als auch mit Citrat induzierbar (Tab. 6). Ohne Effektor wurden Expressionen gemessen, die der des *dcuS*-Insertionsstammes IMW260 entsprechen (nicht gezeigt).

Mutationen in den essentiellen Resten der Fumaratbindung der Bindungsstellen C1 – C3 und H (R107_D, H110_D, R147_D, F149_D) gegen Alanin führten zu einem Verlust der Stimulation der *dcuB'*-*lacZ*-Induktion durch Effektoren. Deshalb benötigt DcuS zum Erkennen von Citrat die Aminosäuren der Bindestellen C1, C2, C3 und H, welche bereits bei der Bindung von C4-Dicarboxylaten als essentielle Reste charakterisiert wurden (Kneuper *et al.*, 2005).

Die Subtyp-spezifischen Reste von DcuS (T101_D, M103_D, F120_D, I125_D, F141_D, Q159_D, A164_D) wurden per Mutagenese gegen Alanin oder den entsprechenden homologen Resten aus CitA ausgetauscht (Tab. 6). Durch Transformation der *dcuS*-Insertionsmutante (IMW260, *dcuB'*-*lacZ*) mit den mutierten Derivaten von pMW181 wurde deren Funktion getestet und mit der des Wildtyp-Proteins verglichen. Die Mutation der Reste T101_D, I125_D, F141_D und Q159_D gegen die entsprechenden Reste aus CitA resultierte in einem Fumarat-sensitiven Sensor, wohingegen die Aktivität durch Citrat nahezu komplett fehlte, selbst wenn der Rest gegen einen CitA-spezifischen ausgetauscht wurde. Die Mutation von F120_D gegen Alanin oder den CitA-homologen Rest Methionin resultierte in einer DcuS-Mutante, die sowohl Citrat- als auch Fumarat-inaktiv war. Nur die Mutanten M103A und A164S hatten keinen deutlichen Einfluss auf die *dcuB*-Expression. Die Subtyp-spezifischen DcuS-Reste können somit für eine Unterscheidung der Wechselwirkungen von DcuS mit den Effektoren Fumarat und Citrat genutzt werden. Dabei zeigte sich, dass die Citraterkennung deutlich stringendere Voraussetzungen zu erfüllen hat als die Fumaraterkennung.

Tab. 6: Relevanz der essentiellen Reste der Bindestellen C1, C2, C3 und H und der Subtyp-spezifischen Reste (T101, M103, F120, I125, F141, Q159, A164) für die Induktion von *dcuB'*-*'lacZ* durch Fumarat und Citrat. Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit Plasmid-codierten DcuS-Mutanten (low-copy) erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat und Citrat (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*'lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen.

Stamm	DcuS-Form	<i>dcuB'</i> - <i>'lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a	
		+ Fumarat	+ Citrat
IMW260	DcuS-Mutante	7 ± 3	5 ± 1
IMW260 p(<i>dcuS</i> ⁺)	DcuS-Wildtyp	189 ± 25	89 ± 19
<i>Essentielle Reste in Bindestellen C1, C2, C3, H</i>			
IMW260 pMW234	DcuS(R107A)	7 ± 1	5 ± 2
IMW260 pMW236	DcuS(H110A)	6 ± 2	4 ± 1
IMW260 pMW237	DcuS(R147A)	12 ± 1	3 ± 2
IMW260 pMW277	DcuS(F149A)	9 ± 2	3 ± 1
IMW260 pMW345	DcuS(F149K)	110 ± 10	5 ± 1
<i>DcuS Subtyp-spezifische Reste</i>			
IMW260 pMW344	DcuS(T101G)	210 ± 23	13 ± 3
IMW260 pMW296	DcuS(M103A)	177 ± 14	50 ± 12
IMW260 pMW292	DcuS(F120A)	4 ± 1	17 ± 1
IMW260 pMW368	DcuS(F120M)	5 ± 3	5 ± 3
IMW260 pMW373	DcuS(I125S)	212 ± 10	17 ± 4
IMW260 pMW354	DcuS(F141S)	159 ± 2	9 ± 1
IMW260 pMW355	DcuS(Q159V)	212 ± 8	23 ± 1
IMW260 pMW298	DcuS(A164S)	200 ± 7	63 ± 1

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

Optimierung der Carboxylat-bindenden Liganden der Bindungsstellen C1 und C3 führen zur Bildung von C₄-Dicarboxylat-spezifischen Formen von DcuS

Zur genaueren Charakterisierung der Carboxylatbindung wurden die Reste um und in den Bindestellen C1 bis C3 und H gegen CitA-homologe Reste gemäß dem Alignment mutiert (Abb. 12). C1 ist im Vergleich die weniger konservierte Carboxylat-Bindestelle (F149_D und A164_D). Die Mutationen F149K und A164S (Mutanten der Klasse I, Tab. 7) wurden

ausgeführt, um die homologen Reste K152_C und S167_C aus CitA einzuführen. Der DcuS-Ligand an C2 ist der mit CitA-übereinstimmende und essentielle Rest R107_D (R109_C) und wurde deshalb nicht mutiert. Genauso entspricht R147_D dem Argininrest aus CitA (R150_C) und wurde nicht getauscht (Abb. 11A – D und Abb. 12). Zur Optimierung von C3 wurde die *citA*-homologe Mutation F141S in DcuS eingeführt (Klasse II-Mutanten). Die Auswirkungen der Klasse I- und II-Mutanten auf die *dcuB*-Induktion wurde nach Transformation der Plasmid-generierten DcuS-Mutanten in einer chromosomalen *E. coli dcuS*-Nullmutante (IMW260) gemessen.

Im Plasmid-codierten Wildtyp (IMW260 p(*dcuS*)) wird die Aktivität der Reportergenfusion durch Fumarat um Faktor 11 und mit Citrat um Faktor 5 stimuliert (Tab. 7). Die Faktoren berechnen sich aus dem Quotienten der Aktivität der Reportergenfusion mit und ohne Fumaratinduktion.

Die Mutanten der Klasse I mit DcuS(F149K) und DcuS(F149K A164S) waren noch immer durch Fumarat stimulierbar. Die Stimulierung der Induktion durch Fumarat war vergleichbar oder gar höher als im Wildtyp. Eine Induktion durch Citrat war nicht mehr messbar. Dies wird besonders durch den Quotienten der Fumarat- und der Citrat-Induktion (Fumarat-induziert / Citrat-induziert) deutlich, welcher von 2,1 im Wildtyp auf bis zu 42 in der Doppelmutante DcuS(F149K A164S) anstieg. Die Mutante DcuS(A164S) war unverändert und zeigte mit Fumarat und Citrat Induktionen auf Wildtyp-Niveau.

Der Effekt der Klasse II-Mutanten DcuS(F141S) auf die *dcuB*-Expression war ähnlich wie bei den Mutanten der Klasse I. Die Induktion durch Fumarat war auf Wildtyp-Niveau und mit Citrat war keine Expression von *dcuB* messbar.

Die Mutationen der Klasse I und II wurden in der Mutante DcuS(F149K A164S F141S) kombiniert. Eine Stimulation von *dcuB* war weder mit Fumarat noch Citrat messbar.

Somit wurden durch die Optimierungen der Bindestellen C1 und C3 C₄-Dicarboxylat-spezifische DcuS-Varianten (DcuS_{DC}) generiert. Eine Kombination der Klasse I und II Mutationen, welche die optimierten Bindungsstellen an C1 und C3 verbindet, führte zu Mutationen, die nicht mehr induzierbar und somit inaktiv waren.

Tab. 7: Effekt der Mutanten der **Klasse I** (Carboxylat-Liganden an Stelle C1), **Klasse II** (Carboxylat-Liganden an Stelle C3), **Klasse III** (Zugänglichkeit von C1 und C2) und **Klasse IV** (Zugang zur Bindetasche) in DcuS auf die Fumarat- und Citratsensitivität der DcuS-abhängigen Expression von *dcuB*'-'*lacZ*. Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit Plasmid-codierten DcuS-Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat und Citrat (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen.

DcuS-Mutante	Mutation	Klasse (und Bindestelle)	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a			Fum/ Cit
			Ohne	+ Fum	+ Cit	
IMW260 (<i>dcuS:cam^R</i>)	DcuS-Insertionsmutante	–	10 ± 1	7 ± 3	5 ± 1	–
IMW260(pMW181)	DcuS-Wildtyp	–	17 ± 4	189 ± 25	89 ± 19	2,1
IMW260(pMW345)	DcuS(F149K)	I (C1-Stelle)	3 ± 1	110 ± 11	5 ± 1	22,0
IMW260(pMW298)	DcuS(A164S)	I (C1-Stelle)	4 ± 2	200 ± 8	63 ± 1	3,2
IMW260(pMW352)	DcuS(F149K A164S)	I (C1-Stelle)	4 ± 1	42 ± 14	1 ± 1	42,0
IMW260(pMW354)	DcuS(F141S)	II (C3-Stelle)	7 ± 1	159 ± 2	9 ± 1	17,7
IMW260(pMW353)	DcuS(T101G F120M I125S)	III (Größe C1+ C2)	5 ± 1	1 ± 1	58 ± 2	0,02
IMW260(pMW355)	DcuS(Q159V)	IV (Bindetasche)	8 ± 1	212 ± 8	23 ± 1	9,2
IMW260(pMW296)	DcuS(M103A)	IV (Bindetasche)	1 ± 1	177 ± 14	50 ± 12	3,5
IMW260(pMW356)	DcuS(Q159V M103A)	IV (Bindetasche)	5 ± 1	194 ± 20	17 ± 2	11,4
Kombination der Klassen I – IV						
IMW260(pMW409)	DcuS(F149K A164S F141S)	I und II	2 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	1
IMW260(pMW370)	DcuS(T101G F120M I125S F149K)	I und III	5 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	0,6
IMW260(pMW374)	DcuS(T101G F120M I125S A164S)	I und III	6 ± 2	6 ± 1	12 ± 1	0,5
IMW260(pMW372)	DcuS(T101G F120M I125S F149K A164S)	I und III	2 ± 1	2 ± 1	27 ± 5	0,07
IMW260(pMW410)	DcuS(T101G F120M I125S F141S)	II und III	3 ± 2	3 ± 1	4 ± 1	0,75
IMW260(pMW371)	DcuS(T101G F120M I125S Q159V)	III und IV	5 ± 2	5 ± 2	45 ± 10	0,1
Variation der Klasse III-Mutanten						
IMW260(pMW344)	DcuS(T101G)		3 ± 1	210 ± 23	13 ± 3	16
IMW260(pMW368)	DcuS(F120M)		5 ± 1	5 ± 3	5 ± 3	1
IMW260(pMW373)	DcuS(I125S)		6 ± 2	212 ± 10	17 ± 4	12
IMW260(pMW351)	DcuS(T101G F120M)		3 ± 1	2 ± 1	3 ± 3	0,7
IMW260(pMW369)	DcuS(T101G I125S)		7 ± 1	12 ± 3	6 ± 3	2
IMW260(pMW390)	DcuS(F120M I125S)		2 ± 1	4 ± 1	2 ± 1	2

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

Optimierung der Zugänglichkeit der Carboxyl-Bindestellen C1 und C2 führt zu Citrat-spezifischen DcuS-Mutanten (DcuS_{Cit})

Um die Citratbindung in DcuS zu optimieren, wurden Mutationen durchgeführt, welche die Größe und die sterischen Eigenschaften der Bindetasche verbessern sollten (Tab. 7 und Abb. 13). Im Vergleich der Strukturmodelle von DcuS und CitA wurde klar, dass die Reste T101_D, F120_D und I125_D von DcuS ein Interaktionsnetzwerk am unteren Teil der Effektor-Bindetasche bilden (Kooperation Prof. Lupas, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen). Die Seitengruppen sind größer und hydrophober als die entsprechenden Reste in CitA (G103_C, M122_C und S127_C). In der Dreifachmutante DcuS(T101G F120M I125S) sollte demnach eine optimierte Citratbindung an der Stelle C1 und auch in geringerem Ausmaße an C2 möglich sein.

Die Expression der *dcuB*-Reporterfusion zeigte, dass die Dreifachmutante Citrat-sensitiv ist (Tab. 7 und Abb. 13). Verdeutlicht wird dies durch den Quotienten der Aktivität Fumarat-induziert und Citrat-induzierter Aktivität des Reportergens mit 0,02 in der Dreifachmutante und 2,1 im Wildtyp. Der niedrige Quotient zeigt eine hohe Citrat-Sensitivität an.

Zur genaueren Charakterisierung und zum besseren Verständnis der Citratbindung in der Dreifachmutante DcuS(T101G F120M I125S) wurde jede Mutation in Einzel- und in Doppel-Mutanten auf ihre Aktivität nach Fumarat- und Citratzugabe getestet (Tab. 7 und Abb. 13). Die beiden Einzelmутanten DcuS(T101G) und DcuS(I125S) waren ungewöhnlicherweise C₄-spezifisch und die Einzelmутante DcuS(F120M) war generell inaktiv. Genauso konnten die drei Doppelmutanten DcuS(T101G F120M), DcuS(T101G I125S) und DcuS(F120M I125S) die Stimulation von *dcuB* nicht induzieren. Somit basiert die Citratbindung der Dreifachmutante nicht auf einer zunehmenden Sensitivität der Einzelmутationen, sondern auf einer Kombination aller drei Reste und bestätigt ihre Interaktion im Bindemodell.

Die Mutationen der Klasse III, welche die Carboxylat-Bindestellen C1 und C2 in ihrer Zugänglichkeit für Citrat optimierten, wurden mit den DcuS-Mutanten mit optimierten Carboxylat-Liganden in C1 (Klasse I; Reste F149K und A164S) oder C3 (Klasse II; Rest F141S) kombiniert (Tab. 7).

Die Kombination der Citrat-spezifischen Dreifachmutante DcuS(T101G F120M I125S) mit der Fumarat-spezifischen Klasse I-Mutante DcuS(F149K A164S) resultierte in einer Citrat-spezifischen Mutante, jedoch mit geringerer *dcuB*'-*lacZ*-Expression im Vergleich zur Dreifachmutante. Die Kombinationen der Dreifachmutante mit den Klasse I-Einzelmутanten (F149K und A164S) führte zu inaktiven DcuS-Mutanten ohne Sensitivität zu Fumarat oder Citrat. Ähnlich ist die Situation in der Kombination der Citrat-sensitiven Dreifachmutante mit

der Klasse II-Mutation DcuS(F141S), in der die Liganden der C3-Carboxylatstelle optimiert wurde. In der Kombination DcuS(F141S F149K A164S) ist der mutierte Sensor weder für Fumarat noch Citrat sensitiv.

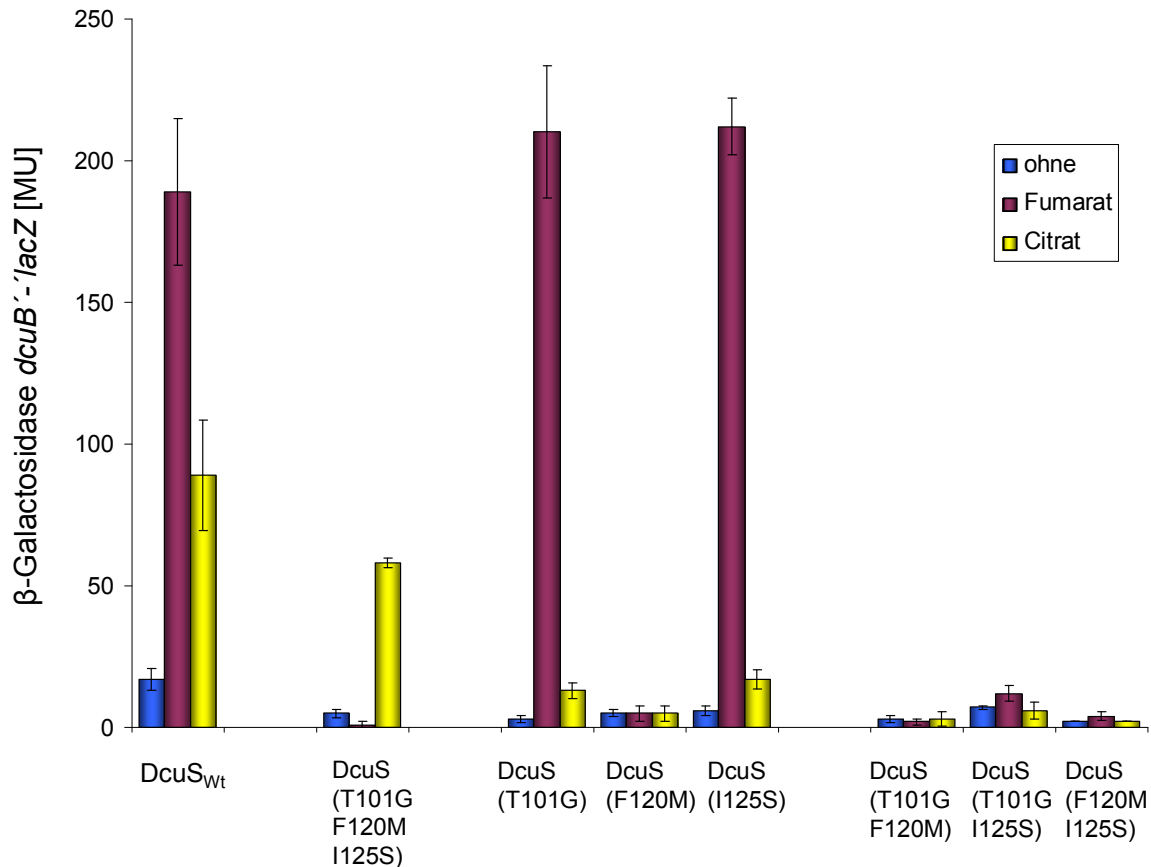


Abb. 13: Effekt der Klasse III-Mutanten DcuS(T101G F120M I125S) auf die Fumarat- und Citrat-induzierte Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit Plasmid-codierten DcuS und DcuS-Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat und Citrat (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Die Standardabweichung berechnet sich aus drei unabhängigen Zuchten in vier Parallelen und in doppelter Ausführung.

Konstruktion Fumarat-spezifischer DcuS-Mutanten durch Mutationen außerhalb der Substratbindetasche

Zwei Subtyp-spezifische Aminosäuren von DcuS liegen außerhalb der Substratbindetasche für Fumarat (Abb. 11 und Abb. 12). Durch Strukturuntersuchungen (Arbeitsgruppe Lupas, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) wurde der Subtyp-spezifische DcuS-Rest Q159_D identifiziert, der durch eine Wechselwirkung mit der Seitenkette und dem Proteinerückgrat eine Art „Klappe“ bildet, welche die Ligandenbindetasche absperrt und somit unzugänglich für Citrat machen könnte. Der homologe Rest V162_C von CitA bildet diese Interaktion nicht aus. Aus diesem Grund waren der Rest Q159_D und der benachbarte und ebenfalls Subtyp-

spezifische Rest M103_D attraktive Kandidaten für den Austausch gegen die entsprechenden Reste aus CitA. Sie bilden die Mutanten der Klasse IV (Q159V und M103A). Die Einzelmutante DcuS(Q159V) und die Doppelmutante DcuS(M103A Q159V) sind Fumarat-spezifisch (Abb. 14), verdeutlicht durch den Quotient der Fumarat- und Citrat-induzierten *dcuB*'-'*lacZ*-Aktivität von jeweils circa 10. Die Einzelmutante DcuS(M103A) ist durch Fumarat, vergleichbar mit der Expression im Wildtyp, stimulierbar. Eine Citratinduktion ist ebenfalls nachweisbar, diese ist aber um etwa Faktor 2 geringer als im DcuS Wildtyp. Die Klasse IV-Mutante DcuS(Q159V) wurde mit der Mutante der Klasse III DcuS(T101G F120M I125S) mit optimierten Carboxylat-Bindestellen C1 und C2 kombiniert. Die kombinierte Mutante DcuS(T101G F120M I125S Q159V) war nicht mehr sensitiv für Fumarat, und mit Citrat war die Expression von *dcuB* vergleichbar mit der Citrat-spezifischen Dreifachmutante der Klasse III.

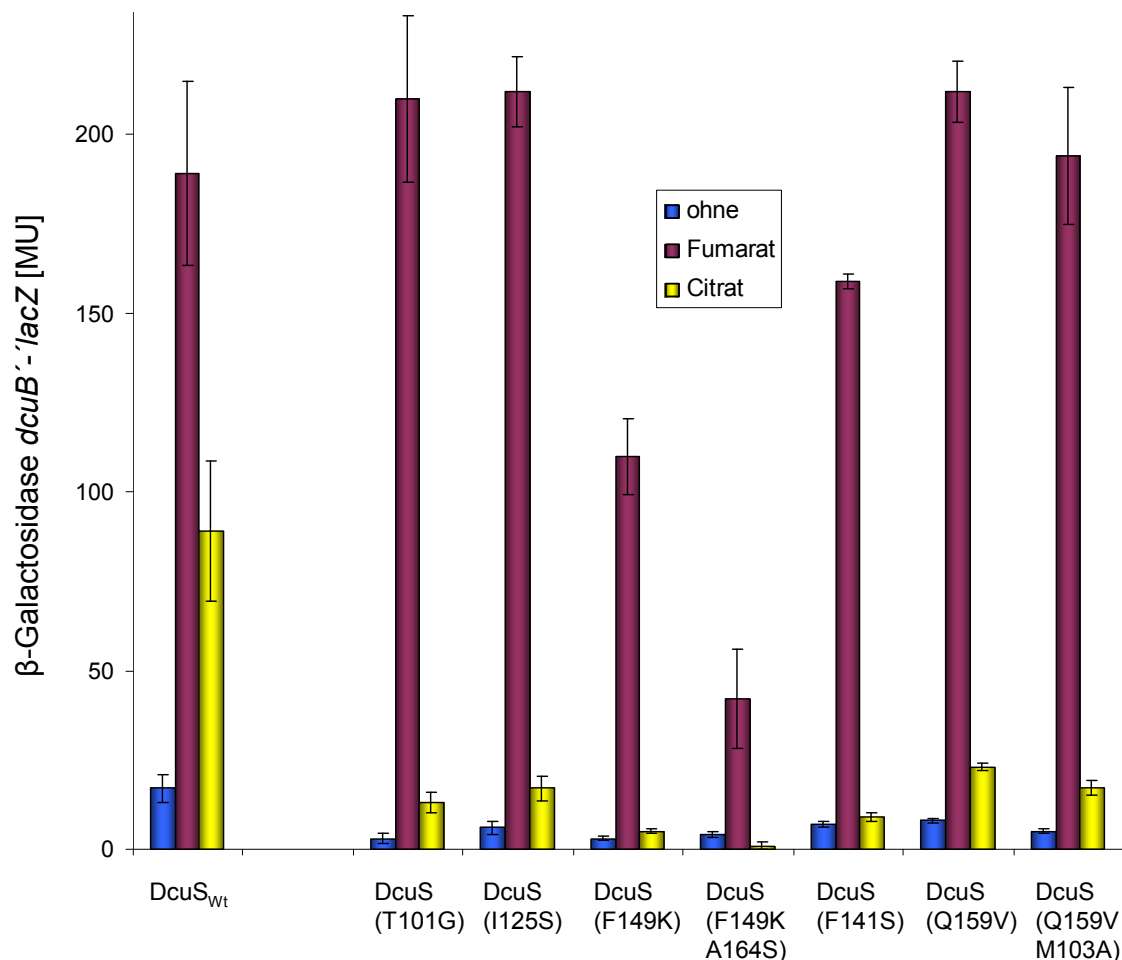


Abb. 14: Effekt der Mutationen der Klassen I bis IV auf die Fumarat- und Citrat-spezifische Induktion von *dcuB*'-'*lacZ*. Gezeigt sind die C₄-Dicarboxylat-spezifischen Einzel- und Doppelmutanten mit fehlender Citratsensitivität. Daten siehe Tab. 7. Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit Plasmid-codierten DcuS und -Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat und Citrat (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen.

Effektorspezifität von DcuS (Wildtyp, DcuS_{DC} und DcuS_{Cit})

Die Sensitivität von DcuS im Wildtyp und den spezifischen Formen DcuS_{DC} und DcuS_{Cit} für C₆-Tricarboxylate (Citrat, Tricarallylat, Isocitrat) und C₄-Dicarboxylate wurde mittels der Reportergenfusion *dcuB'*-*lacZ* getestet (Abb. 15). Im DcuS Wildtyp war von den C₆-Tricarbonsäuren Citrat der stärkste Induktor. Die Induktion von Isocitrat entspricht ca. 50 % der von Citrat, Tricarallylat hatte keinen Effekt, ebenso wie Glutarat (Abb. 16). Glutarat ist ein C₅-Dicarboxylat, bei dem die beiden Carboxylgruppen durch drei Methylengruppen (–CH₂) getrennt sind und eine dritte Carboxylgruppe und die Hydroxylgruppe (–OH) fehlen. Somit scheinen die zentrale Carboxylgruppe und die Hydroxylgruppe eine entscheidende Rolle bei der Effektorbindung der C₆-Tricarbonsäuren zu spielen.

Die Induktion von *dcuB* durch die C₄-Dicarboxylate Fumarat, Aspartat und D-Tartrat war im Wildtyp vergleichbar mit der durch das strukturell verwandte Nitropropionat, bei dem eine Carboxylgruppe des Succinats durch eine Nitrogruppe (–NO₂) ersetzt ist. Die Induktionen sind deutlich höher als mit Citrat, bis auf Mesaconat (2-Methylfumarat), welches eine schwächere Reaktion auslöst. Es war bekannt, dass im Wildtyp kleine und polare Substituenten (Hydroxyl-, Thiol-, Aminoreste) am C2 und C3 der C₄-Dicarboxylate toleriert werden. Größere und hydrophobe Substituenten, wie Methyl- und Methylengruppen, verschlechtern die Bindung (Kneuper *et al.*, 2005).

Die C₄-Dicarboxylat-spezifische Mutante DcuS(F141S) zeigte mit Fumarat die stärkste Reaktion (Abb. 15 und Tab. 22). Mit den anderen C₄-Dicarboxylaten (Aspartat, D-Tartrat und Nitropropionat) betrug die Induktion nur 50 – 25 % der Fumaratinduktion und fehlte bei Mesaconat, den C₆-Tricarboxylaten und dem C₅-Dicarboxylat Glutarat. Die Citrat-spezifische Mutante DcuS(T101G F120M I125S) zeigte mit den C₄-Dicarboxylaten (Fumarat, Aspartat, D-Tartrat und Nitropropionat) keine Reaktion. Die Mutante wurde durch Citrat ähnlich dem Wildtyp induziert, jedoch ergab die Zugabe von Isocitrat keinerlei Stimulation mehr. Mesaconat verursachte in der Dreifachmutante sogar eine stärkere Induktion als Citrat.

Aus diesem Grund repräsentieren DcuS(F141S) und DcuS(T101G F120M I125S) C₄-Dicarboxylat- bzw. C₆-Tricarboxylat-spezifische Varianten von DcuS mit komplementärem Effektorenspektrum. Mesaconat ist ein C₄-Dicarboxylat mit einem großen und hydrophoben Methylrest an C2. Es ist der stärkste Induktor der Citrat-spezifischen DcuS-Mutante DcuS(T101G F120M I125S).

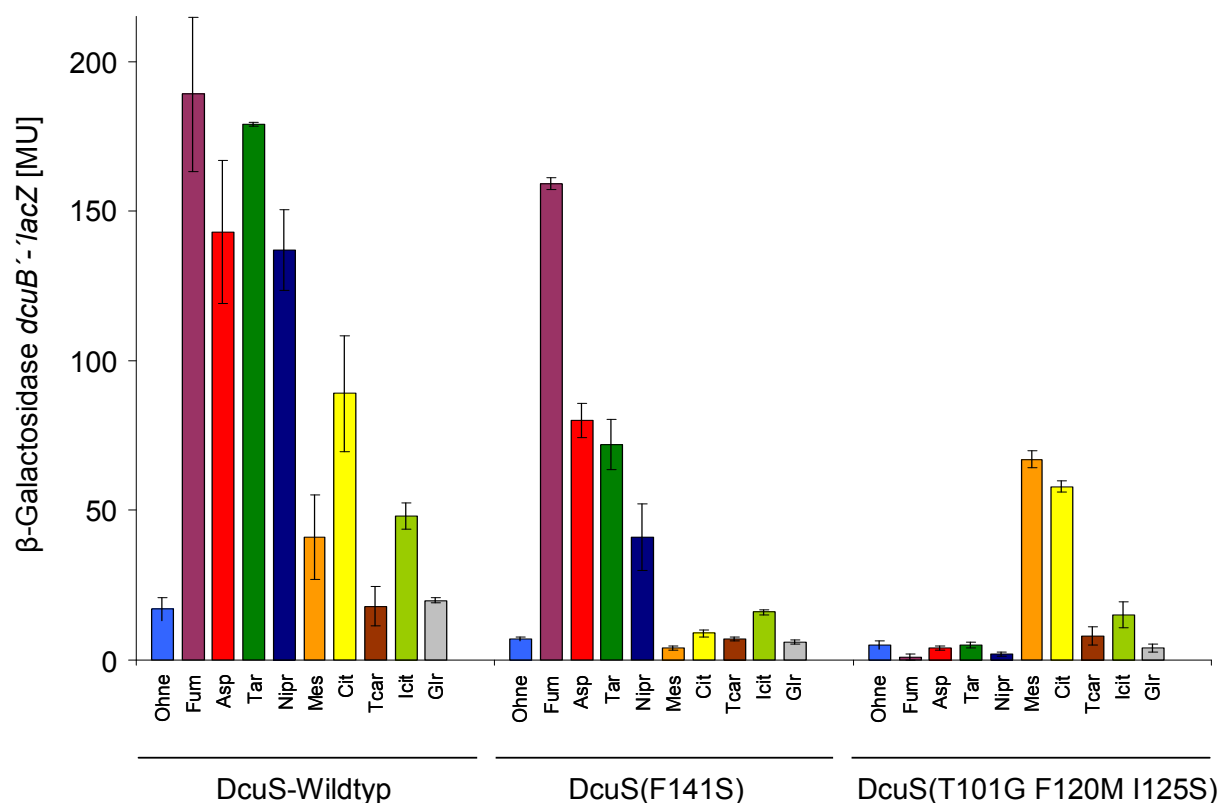


Abb. 15: Effekt der C₄-Dicarboxylate, der C₆-Tricarboxylate und ähnlicher Verbindungen auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ* in Stämmen mit Wildtyp-DcuS, C₄-Dicarboxylat-spezifischem DcuS_{DC} (F141S) und Citrat-spezifischem DcuS_{Cit} (T101G F120M I125S). Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit low-copy Plasmid-codierten DcuS und DcuS-Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren (20 mM [5 mM Nitropropionat]). Die β-Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Fum (Fumarat), Asp (Aspartat), Tar (D-Tartrat), Nipr (Nitropropionat), Mes (Mesaconat = 2-Methylfumarat), Cit (Citrat), Tcar (Tricarballoylat), Icit (Isocitrat), Glr (Glutarat). Die Standardabweichung berechnet sich aus sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen. Weitere Effektoren und die Werte der Reporter-Gen-Aktivitäten sind in Tabelle 22 (Anhang) aufgeführt.

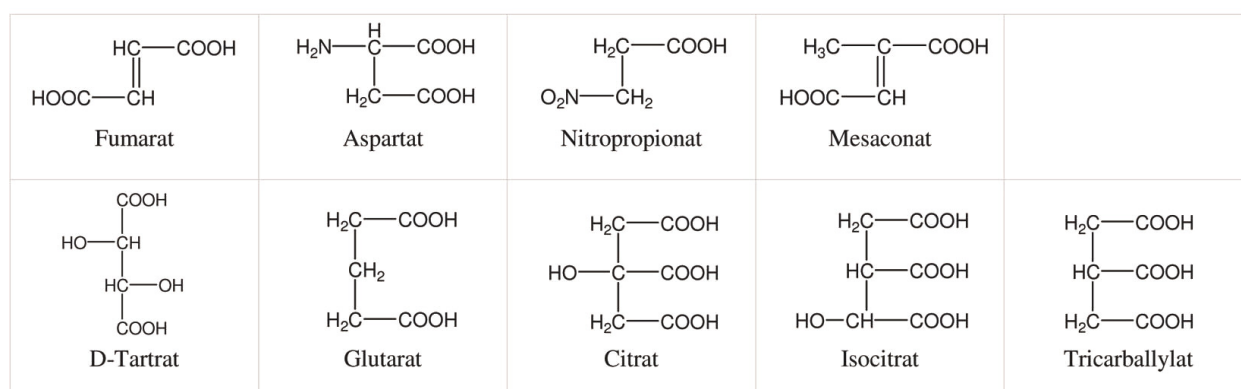


Abb. 16: Strukturen der C₄-Dicarboxylate, C₆-Tricarboxylate und verwandter Verbindungen. Die Bezeichnungen entsprechen den Salzen. Weitere Strukturen befinden sich im Anhang in Abb. 43. Mesaconat = 2-Methylfumarat.

Ergänzende Charakterisierung von C₄-Dicarboxylat- und Citrat-spezifischem DcuS

E. coli kann in der Fumaratatmung auf diverse C₄-Dicarboxylate zurückgreifen, die im Cytoplasma nach Umwandlung in Fumarat als Elektronenakzeptor dienen. Neben DcuB transportieren DcuA und DcuC die C₄-Dicarboxylate Aspartat und Malat im Antiport mit Succinat. Malat wird über die anaerobe Fumarase B (*fumB*) zu Fumarat dehydratisiert und Aspartat über die Aspartat:Ammonium-Lyase (Aspartase, *aspA*) zu Ammonium und Fumarat umgesetzt.

In Wildtyp-DcuS wurde die Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* durch Malat stark stimuliert und übertraf die Werte der Fumarat- und Citratinduktionen (Tab. 8). In den C₄-spezifischen Mutanten der Klasse I (DcuS(F149K)) und Klasse II (DcuS(F141S)) war Malat ebenfalls ein guter Induktor. Die Induktion war mit Malat um den Faktor 2 höher als mit Fumarat. Die Fumarat-spezifischen Einzelmутanten DcuS(T101G) und DcuS(I125S) der Klasse III-Mutationen reagierten mit Malat auf ähnlichem Niveau wie mit Fumarat. Die Tricarboxylat-spezifische Dreifachmutante DcuS(T101G F120M I125S) war ebenfalls Malat-sensitiv. Die Induktion von *dcuB* mit Malat übertraf sogar die von Citrat. Offensichtlich bringt Malat, anders als Fumarat und andere C₄-Dicarboxylate, noch alle strukturellen Voraussetzungen zur Erkennung durch diese Mutante mit.

Tab. 8: Effekt von DcuS-Mutationen der Klassen I – III auf die Fumarat-, Citrat- und die Malat-induzierte Expression von *dcuB*'-'*lacZ*. Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit Plasmid-codierten DcuS und DcuS-Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen.

Stämme (relevanter Genotyp)	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a			
	Klasse	+ Fumarat	+ Citrat	+ Malat
IMW260 pMW181 (<i>pdcuS</i>)	–	189 ± 25	89 ± 19	238 ± 18
DcuS_{DC} (C₄-spezifisch)				
IMW260 pMW345 (<i>pdcuS</i> F149K)	I	110 ± 11	5 ± 1	235 ± 8
IMW260 pMW354 (<i>pdcuS</i> F141S)	II	159 ± 2	9 ± 1	295 ± 9
IMW260 pMW344 (<i>pdcuS</i> T101G)	III	210 ± 23	13 ± 3	258 ± 7
IMW260 pMW373 (<i>pdcuS</i> I125S)	III	212 ± 10	17 ± 4	278 ± 15
DcuS_{Cit} (Citrat-spezifisch)				
IMW260 pMW374 (<i>pdcuS</i> T101G F120M I125S)	III	1 ± 1	58 ± 2	105 ± 3

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

Affinität von DcuS für Thiomalat

Der apparente K_D -Wert entspricht der Konzentration des Induktors im Medium, die eine halbmaximale Induktion von *dcuB* ergibt. Die apparenten K_D -Werte für die Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* durch Maleinat (2 mM), Succinat (3 mM) und Citrat (7 mM) für DcuS sind bekannt (Kneuper *et al.*, 2005). Für die Citrat-spezifische Mutante DcuS(T101G F120M I125S) mit Citrat ergab sich ein app. K_D von 14 mM (Krämer, 2004). Die C₄-Dicarboxylat-spezifischen Varianten DcuS(F149K) und DcuS(T101G) zeigten mit Succinat und Maleinat ähnliche Werte wie im Wildtyp (Krämer, 2004). Somit sind die Affinitäten in den Mutanten mit dem Wildtyp vergleichbar.

Mit den physiologischen Substraten Fumarat und Malat ist die Bestimmung des apparenten K_D -Wertes nicht möglich, da die Verbindungen in niedrigen Konzentrationen schnell verstoffwechselt werden. Thiomalat (= Mercaptosuccinat, Mercaptobernsteinsäure) ähnelt strukturell Malat und ist vermutlich ein unphysiologischer Effektor, da es bei Wachstum mit Glycerin ohne DMSO nicht als Elektronenakzeptor dienen kann (Bock, 2004). Thiomalat entspricht Malat bis auf die Mercaptogruppe an C2 und Thiomalat ist ein starker Effektor für die Stimulation von *dcuB*'-'*lacZ*.

Mit chromosomal codiertem DcuS in *E. coli* IMW237 sollte der apparente K_D für Thiomalat bestimmt werden. Thiomalat ist beim Autoklavieren instabil (Bock, 2004) und sollte hier durch Filtration sterilisiert werden. In dem Diagramm ist die Aktivität der *dcuB*'-'*lacZ* Reportergenfusion gegen die Konzentration des Effektors im Medium aufgetragen (Abb. 17). Mit steigender Effektorkonzentration steigt die Expression von *dcuB* bis eine maximale Aktivität (V_{max}) erreicht ist. Bei 5 mM Thiomalat war eine halbmaximale Aktivität der *dcuB*'-'*lacZ*-Expression erreicht. Somit ist die Affinität zu Thiomalat im Wildtyp mit den bisher bestimmten Effektoren vergleichbar (Kneuper *et al.*, 2005).

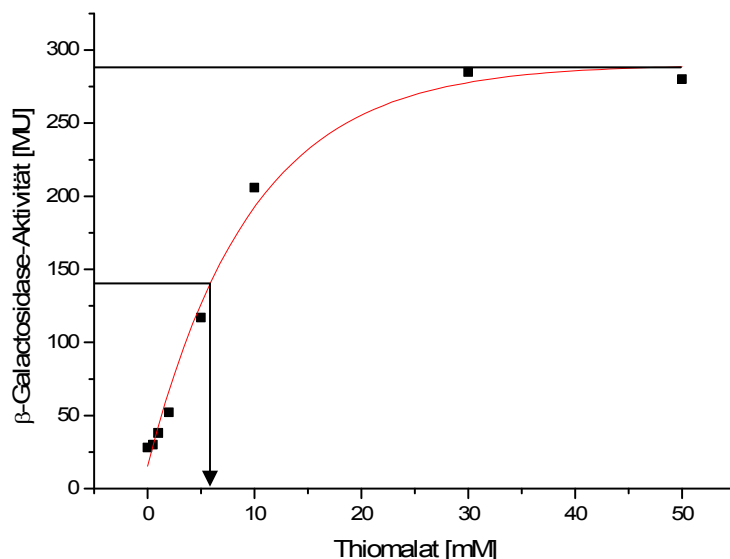


Abb. 17: Bestimmung des apparenten K_D -Wertes von DcuS für die Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* durch Thiomalat. Die Affinität von DcuS für Thiomalat wurde *in vivo* durch die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* bestimmt. Die Zucht von *E. coli* IMW237 mit chromosomalem DcuS erfolgte in eM9-Medium plus Glycerin, DMSO und Thiomalat in variablen Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen.

Strukturuntersuchungen von Citrat-spezifischem DcuS

Um die Bindung von Citrat in der Citrat-spezifischen Mutante DcuS(T101G F120M I125S) besser verstehen zu können, sollte die periplasmatische Domäne mittels Liquid-state-NMR untersucht werden und mit den NMR-Messungen des Wildtypes und den DcuS-Mutanten (H110A / F120M / R147A) verglichen werden (Pappalardo *et al.*, 2003; Kneuper *et al.*, 2005). Dazu wurde die periplasmatische Domäne DcuS-PD(T101G F120M I125S) der Citrat-spezifischen Dreifachmutante mit ^{15}N -NH₄Cl markiert, als lösliche Domäne überproduziert und über Affinitätschromatographie isoliert. Der Bereich von DcuS, der für die mutierte periplasmatische Domäne (T101G F120M I125S) mit den Aminosäuren 45 – 180 codiert, wurde in das Überexpressionsplasmid pET28a hinter einen induzierbaren T7lac-Promoter kloniert. Das resultierende Plasmid pMW423 wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und die Überproduktion mit IPTG induziert. Nach Induktion der Genexpression und Coomassiefärbung der Proteine war eine Bande mit der erwarteten molaren Masse mit 17 kDa zu erkennen (Abb. 18).

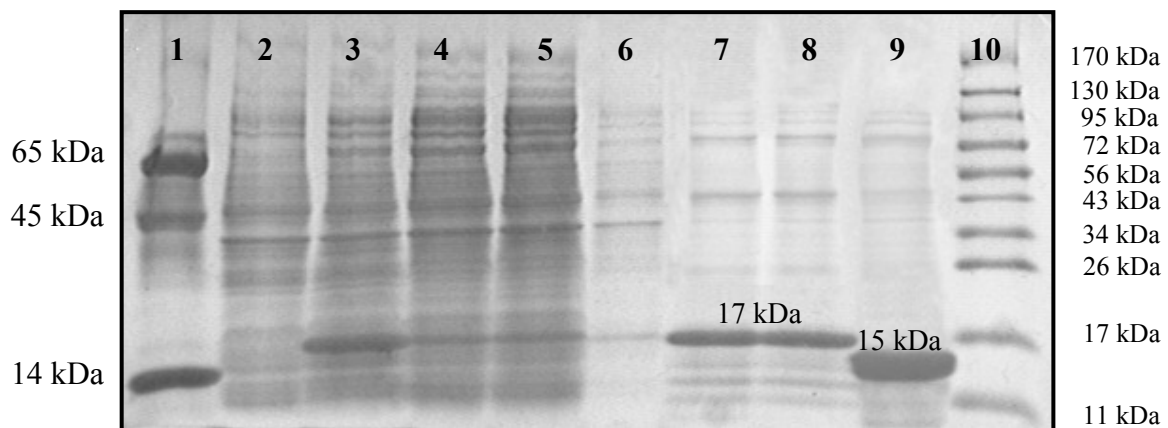


Abb. 18: Überexpression und Reinigung von His₆-DcuS-PD(T101G F120M I125S) aus *E. coli* BL21(DE3) (pMW423). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

- | | |
|---|-------|
| 1: Proteinstandard: BSA (M _r 65 kDa), Ovalbumin (M _r 45 kDa), Lysozym (M _r 14 kDa) | |
| 2: Zellhomogenat vor der Induktion | 35 µg |
| 3: Zellhomogenat nach 4 – 5 h Induktion | 40 µg |
| 4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss | 40 µg |
| 5: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose-Säule | 40 µg |
| 6: Waschfraktion der Ni-NTA-Agarose-Säule | 1 µg |
| 7: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 1 | 15 µg |
| 8: Vereinte Elutions-Fraktionen | 12 µg |
| 9: Elutions-Fraktionen nach Dialyse und His-tag-Abspaltung | 19 µg |
| 10: PageRuler prestained Protein Ladder (Fermentas) | |

Nach Induktion der Proteinexpression, Zellaufschluss und Zentrifugation des Zellhomogenats befand sich die periplasmatische Domäne DcuS in der löslichen Proteinfraction im Überstand. Die Reinigung des isolierten Proteins wurde mit Hilfe des N-terminalen His₆-Anhangs durch Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Chelat-Säule erzielt. Der His₆-Anhang bindet an die Nickelionen des Ni²⁺-NTA-Komplexes, während die meisten anderen Proteine durch das Säulenmaterial fließen. Die Ausbeute betrug ungefähr 8 % des Gesamtproteins (Tab. 9). Nach Waschen der Säule wurde das Fusionsprotein mit 500 mM Imidazol eluiert. Anschließend wurde Imidazol durch Dialyse weitgehend entfernt und der His₆-Anhang durch Thrombinprotease abgespalten. Der His₆-Anhang wurde durch Chromatographie an einer Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule abgetrennt und die mutierte periplasmatische Domäne DcuS-PD(T101G F120M I125S) ohne His₆-Anhang isoliert und auf 25 – 30 mg/ml Protein konzentriert. Die konzentrierte Probe zeigt im SDS-Polyacrylamidgel nur geringe Verunreinigungen durch andere Proteine. Die Probe wurde auf die Pufferbedingungen für die NMR-Messung eingestellt und bei -80 °C gelagert.

Tab. 9: Ausbeute der Reinigung von DcuS-PD(T101G F120M I125S)-His₆

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ^a
Gesamtprotein	100	440
Gereinigtes Protein (DcuS-PD)	8	35

^a aus 6,4 l Kulturvolumen, Zucht mit BL21(DE3) (pMW423) in M9 mit ¹⁵N-NH₄Cl

NMR-Spektroskopie der mutierten periplasmatischen Domäne von DcuS

Die periplasmatische Domäne von DcuS wurde durch Nuklearmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie weitergehend analysiert. Die NMR-Spektroskopie kann die atomare Struktur und Dynamik von Makromolekülen in Lösung ermitteln. Hierbei macht man sich zunutze, dass einige Atomkerne, wie z.B. der des normalen Wasserstoffs ¹H oder die stabilen Isotope ¹³C oder ¹⁵N, magnetisch sind. Dadurch treten diese in Wechselwirkung mit einem angelegten Magnetfeld (Radiofrequenzeinstrahlung). Die Kerne können dabei als elektrisch geladene Kreisel betrachtet werden, die sich an einem äußeren Magnetfeld ausrichten. Dabei absorbieren die Atomkerne elektromagnetische Strahlung bestimmter Energie, sofern ein externes magnetisches Feld angelegt ist. In einem Molekül mit unterschiedlicher chemischer Umgebung wird eine entsprechende Zahl unterschiedlicher Energieportionen benötigt. Die chemische Umgebung bestimmt, welche Frequenz absorbiert wird. Die Magnetisierung ist vorübergehend und relaxiert zum Gleichgewichtszustand. Die Relaxierung liefert Information

zu Struktur und Dynamik des Moleküls. So ergibt sich aus HSQC-Spektren (Heteronuclear Single Quantum Coherence) ein NMR-Spektrum, das detaillierte Informationen über die Anordnung der einzelnen Atomkerne und damit der Atome im Raum enthält – vergleichbar mit einem Fingerabdruck. Das ^{15}N -HSQC ist ein 2D-Experiment mit einer ^{15}N - und einer ^1H -Frequenz. Alle Aminosäuren, bis auf Prolin, liefern aufgrund der Amidgruppe -NH eine Amid-NMR-Frequenz. Somit eignet sich das ^{15}N -HSQC um die Wechselwirkung mit Liganden zu detektieren und die beteiligten Aminosäuren zu ermitteln.

Bei der NMR-Spektroskopie werden die Makromoleküle vollständig mit dem stabilen Isotop ^{13}C und/oder ^{15}N angereichert. Da diese Isotope natürlicherweise nur in sehr geringen Mengen vorkommen (^{15}N mit 3,7 % aller Stickstoff- bzw. ^{13}C mit 1,1 % aller Kohlenstoffatome), müssen diese während der Protein-Expression über die Nährmedien zugeführt werden. Die Zuordnung der Messungen der NMR-Parametern und der Resonanzen ist die Grundlage der Berechnung von Proteinstrukturen. Die NMR-bestimmten Proteinstrukturen sind in einer Proteindatenbank (pdb) abgelegt. Weiterhin ist die NMR-Methode für die nähere Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkung und/oder mit niedermolekularen Liganden geeignet.

Die isolierte periplasmatische Domäne DcuS-PD(T101G F120M I125S) wurde mittels ^{15}N - ^1H heteronukleärer Single-Quantum Korrelationsspektrum analysiert (Kooperation Arbeitsgruppe Griesinger, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen). Das HSQC-Spektrum zeigte eine geringe chemische Shift-Streuung, welche charakteristisch für entfaltete Proteine ist (Abb. 19A). Da DcuS(T101G F120M I125S) *in vivo* funktionell ist, basiert die Entfaltung vermutlich auf einer erhöhten Labilität der isolierten und mutierten Domäne. So zeigten auch die ^{15}N - ^1H -Spektren der isolierten periplasmatischen Domänen DcuS-PD(H110A) und DcuS-PD(F120M) ebenfalls eine typische Shift-Streuung für entfaltetes Protein (Krämer, 2004). Für die Mutante DcuS-PD(R147A) hingegen war eine breite NH-Resonanz gemessen worden. Diese deutete einen höheren Oligomerisierungszustand an, der mit der hohen Präzipitationsrate der Mutante übereinstimmte (Kneuper *et al.*, 2005). Die periplasmatischen Domänen von Wildtyp DcuS und von CitA (Sevvana *et al.*, 2008) sind gefaltet, aber instabil, und zeigen ausgeprägte Bereiche mit langsamen chemischen Austauschen. Aus diesem Grund ist es nicht ungewöhnlich, dass isolierte periplasmatische Domänen instabil sind, während sie im Vollprotein durch die Membranverankerung der Transmembranhelices stabilisiert werden.

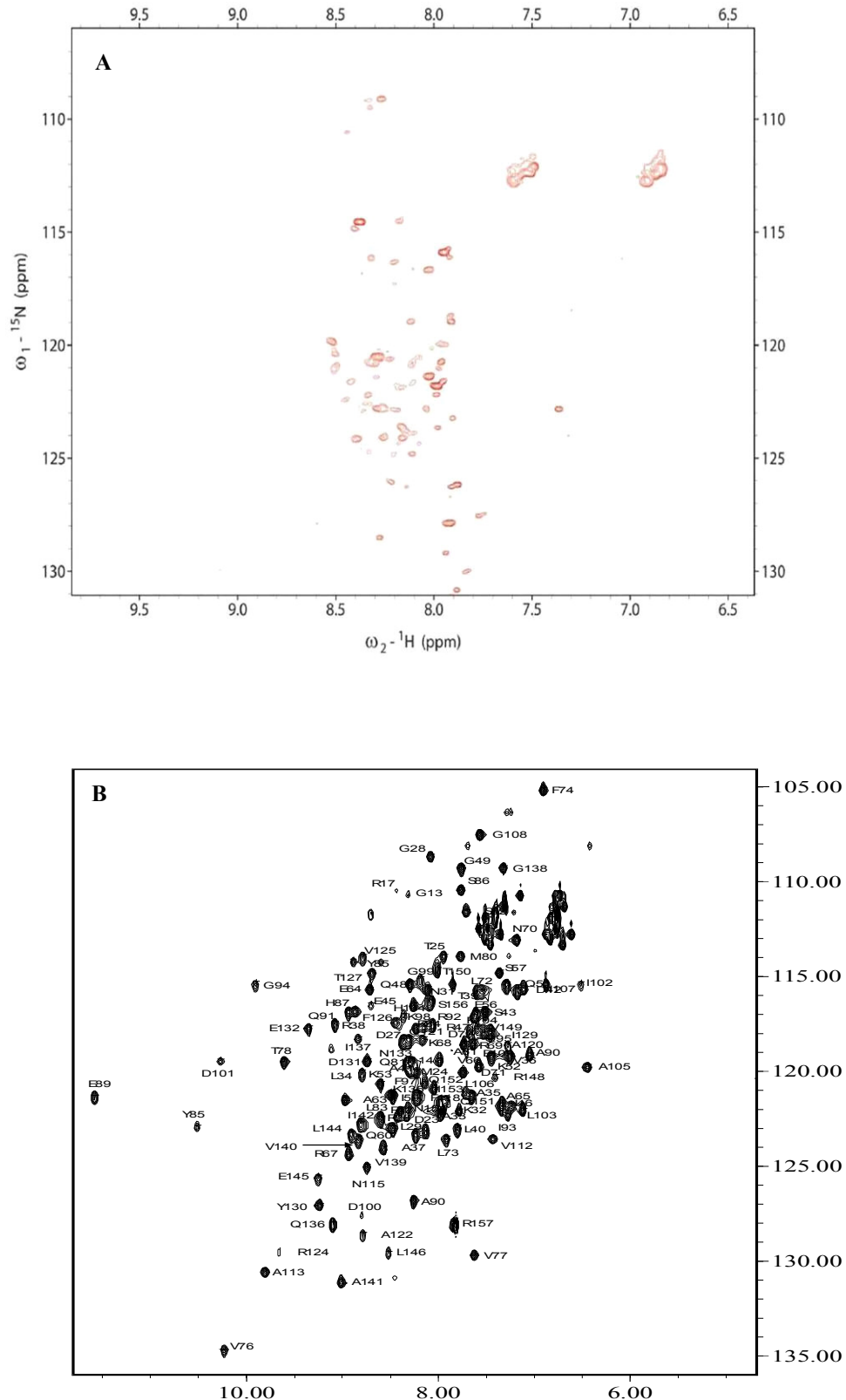


Abb. 19: ${}^{15}\text{N}$ - ${}^1\text{H}$ HSQC-Spektrum der periplasmatischen Domäne von Citrat-spezifischem DcuS-PD(T101G F120M I125S) (A) und von Wildtyp-DcuS (B). Die Aminosäuren sind den Gipfeln zugeordnet. Auf der x-Achse ist die ${}^1\text{H}$ Frequenz aufgetragen, auf der y-Achse die ${}^{15}\text{N}$ -Frequenz. Die Mutante zeigt im Vergleich eine Ansammlung breiter, unscharfer und überlappender Gipfel.

4.2 Konstruktion von Hybridproteinen aus DcuS und CitA

DcuS ist eine typische membrangebundene Histidin-Sensorkinase mit einer N-terminalen Inputdomäne und einer C-terminalen Transmitterdomäne. Die Signalerkennung und -weitergabe erfolgt über die periplasmatische Domäne, welche die beiden Transmembranhelices verbindet und wird über die PAS-Domäne an die Kinasedomäne geleitet.

Um die Signaltransduktion über die Membran besser verstehen zu können, sollte eine spezifische und affine Sensorkinase konstruiert werden, die in Phospholipiden rekonstituiert werden kann. Somit könnten Konformationsänderungen des Proteins (z.B. der Transmembranhelices) nach Effektorbindung durch die periplasmatische Domäne in weiterführenden Studien untersucht werden. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades (Tab. 10) und der ausführlichen Strukturdaten sollten sich DcuS (*E. coli*) und CitA (*Klebsiella pneumoniae*) für die Konstruktion von chimären Proteinen (DcuS-CitA-Hybridkonstrukte) eignen. DcuS ist als komplettes Protein isolierbar und kann in Phospholipiden rekonstituiert werden (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005). Aufgrund der mangelnden Überproduzierbarkeit von CitA ist eine Rekonstitution bisher nicht möglich, jedoch stellt CitA einen affinen und spezifischen Sensor dar. Somit wäre eine Kombination dieser Eigenschaften ein ideales Chimärenprotein für weitere Untersuchungen.

Tab. 10: Vergleich der Sensorkinasen DcuS (*E. coli*) und CitA aus (*Klebsiella pneumoniae* und *E. coli*). Die Aminosäuresequenzen von den angegebenen Sensoren wurden auf identische und ähnliche Aminosäuren per ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) auf ihre Verwandtschaft hin untersucht.

	Amino- säuren	Molare Masse (Dalton)	Identität zu DcuS	Ähnlichkeit zu DcuS
DcuS (<i>E.c.</i>)	543	60.551	100 %	100 %
CitA (<i>K.p.</i>)	547	61.780	28,1 %	48,7 %
CitA (<i>E.c.</i>)	552	61.684	26,6 %	45,5 %

Abkürzungen: *Escherichia coli* (*E.c.*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.p.*)

Hierfür wurden in dem DcuS-Plasmid pMW181 verschiedene Genbereiche nach gerichteter Mutagenese per Restriktion entfernt und durch die homologen Bereiche aus CitA substituiert (Abb. 20). So wurden die DcuS-CitA-Hybride KI – III konstruiert (Abb. 21). Bei Konstrukt I ersetzten 130 Aminosäuren der periplasmatischen Domäne von CitA (Position E48 – N177)

die homologe Region der periplasmatischen Domäne von DcuS (Position S45 bis Q174) mit je 130 Aminosäuren. Dieser Bereich liegt bei beiden Sensoren zwischen den Transmembranhelices I und II (Tab. 11). In Konstrukt II entspricht der N-Terminus bis kurz vor der zweiten Transmembranhelix der Sequenz von CitA (M1 – N177) und substituiert den DcuS-Bereich M1 – Q174. In Konstrukt III wurde der gesamte N-Terminus von DcuS bis unmittelbar hinter der zweiten Transmembranhelix (M1 – K206) durch CitA mit M1 – K209 ersetzt. Somit sind die Konstrukte II und III um drei Aminosäuren des homologen CitA-Bereiches im Vergleich zu DcuS erweitert. In den drei Hybrid-Konstrukten ändern sich somit die ursprünglichen CitA-Aminosäurepositionen um die angegebenen Reste gemäß DcuS-Numerierung.

Tab. 11. Vergleich der Proteindomänen der Sensorkinasen DcuS und CitA (*E. coli* und *Klebsiella pneumoniae*). Die Aminosäurepositionen sind in Ziffern angegeben.

	Aminosäureposition				
	TMI	PD	TMII	PAS	Kinase
DcuS (<i>E.c.</i>)	21 – 41	42 – 181	182 – 202	220 – 291	346 – 538
CitA (<i>K.p.</i>)	24 – 44	45 – 180	181 – 201	225 – 264	347 – 542
CitA (<i>E.c.</i>)	22 – 42	43 – 182	183 – 203	222 – 292	344 – 541

^a Die Angaben zu den Proteinbereichen stammen von der Proteindatenbank Swissprot und basieren zumeist auf Sequenzanalysen. Abkürzungen: *Escherichia coli* (*E.c.*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.p.*), Transmembranhelix I, II (TMI, II), Periplasmatische Domäne (PD)

	10	20	30	40	50	60	
DCUS_EC	---	MRHSLPYRMLRKRP	MKLSTTVILMVS	AVLFSVLLV	VHLYFSQIS	DMTRDGLANK	ALAVARTLADSP 67
CITA_KP	MSIYP	MYTRKITHWF	FARRSFQNRIF	LLILFTSTIV	MLAMSWY	LTDTITEERL	HYQVGQRALIQAMQISAMP 70
	70	80	90	100	110	120	130
DCUS_EC	..						
CITA_KP	EIRQGLQKKPQES	GIQAIAEAVR	KRNDLLFIV	VTDMQSLRY	SHPEAQRI	GQPFKGDD	ILKALN-GEENVA 136
	140	150	160	170	180	190	200
DCUS_EC	..						
CITA_KP	INRGFLAQALRV	FTPIYDENH	KQIGVVAIG	LELSRV	TQQINDSR	WSIIWSV	LFGLVGLIGTCILVKVLK 206
	210	220	230	240	250	260	270
DCUS_EC	..						
CITA_KP	KILFGLPEY	EISTLFEQR	QAMLQSIKE	GVVAVDDR	GEVTLIND	AAQELLN	YRKSQDDEKLSTLSHSWSQV 276
	270	280	290	300	310	320	330
DCUS_EC	..						
CITA_KP	KQMLNMEP	QQLSQLLI	QSVLFESV	FEGLIAID	SDYKITAIN	QTARRLLN	LSQPEPTLIGKRISVISQE 279

Abb. 20: Alignment der Aminosäuresequenzen der Sensorkinasen DcuS (*E. coli*) und CitA (*Klebsiella pneumoniae*). Die Sequenzen sind auf Aminosäuren 1 bis 276 (DcuS) und 1 bis 279 (CitA) limitiert. Sie umfassen die periplasmatischen Domänen und die beiden Transmembranhelices.

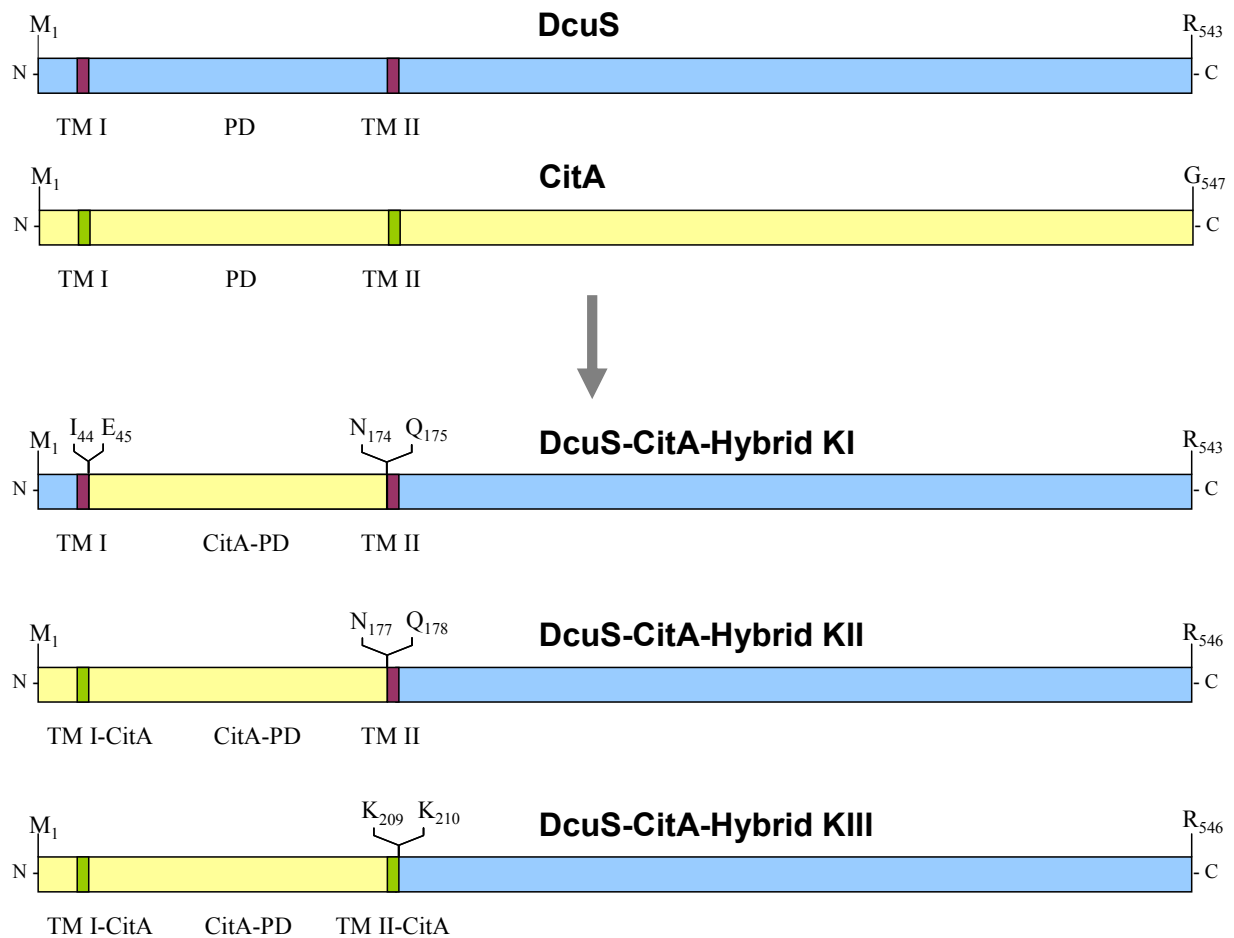


Abb. 21: Konstruktion der chimären Proteine aus den Sensorkinasen DcuS und CitA (*Klebsiella pneumoniae*). In drei verschiedenen Konstrukten (DcuS-CitA-KI bis KIII) wurden Proteindomänen von DcuS durch homologe Domänen aus CitA substituiert. In Konstrukt I stammte nur die periplasmatische Domäne aus CitA (CitA-PD). In Konstrukt II resultiert der N-terminale Bereich inklusive der periplasmatischen Domäne aus CitA. In Konstrukt III entsprechen der komplette N-terminale Bereich inklusive beider Transmembranhelices und der periplasmatischen Domäne der CitA-Sequenz. Durch das Einfügen der CitA-Sequenz sind die Hybridkonstrukte DcuS-CitA-KII und -KIII um drei Aminosäuren ergänzt. Die Aminosäurepositionen sind im Einbuchstabencode mit der jeweiligen Position (Index) angegeben. Abkürzungen: Periplasmatische Domäne von DcuS (PD); periplasmatische Domäne aus CitA (CitA-PD); Transmembranhelices I und II (TM I, TM II).

Die Funktionalität der Hybrid-Konstrukte wurde nach Transformation der Plasmide in *E. coli* IMW260 mittels einer chromosomalen *dcuB'*-*'lacZ* Reporterergenfusion *in vivo* untersucht. Die Expression von *dcuB* hängt unter anaeroben Bedingungen von DcuS ab und ist demnach ein geeigneter Indikator für den Funktionszustand der DcuS-CitA-Chimären.

Die in Abbildung 22 aufgeführten Aktivitäten zeigen die Expression der Reporterergenfusion *dcuB'*-*'lacZ* nach anaerober Zucht in An- und Abwesenheit der Induktoren Fumarat, Citrat und D-Tartrat in Wildtyp-DcuS und den DcuS-CitA-Hybriden (KI – KIII). Die Bakterien wurden in eM9 mit Glycerin als C-Quelle und Elektronendonator plus Dimethylsulfoxid als

Elektronenakzeptor gezüchtet. Die Zellen wachsen hierbei unter DMSO-Respiration, welche keine DcuSR-regulierten Gene reprimiert.

In Abwesenheit von Effektor war die Expression von *dcuB'*-*lacZ* im Wildtyp gering. Sie wurde durch Fumarat um den Faktor 9, durch Citrat um den Faktor 4 und mit D-Tartrat um Faktor 12, erhöht. Im DcuS-CitA-Hybrid KI war die Aktivität der Reporterfusion bereits ohne Effektor maximal und konnte weder durch die Zugabe von Fumarat noch Citrat oder D-Tartrat weiter stimuliert werden.

Die chimären Konstrukte KII und KIII zeigten weder mit noch ohne Effektor eine Induktion der *dcuB*-Expression und sind somit inaktive Konstrukte.

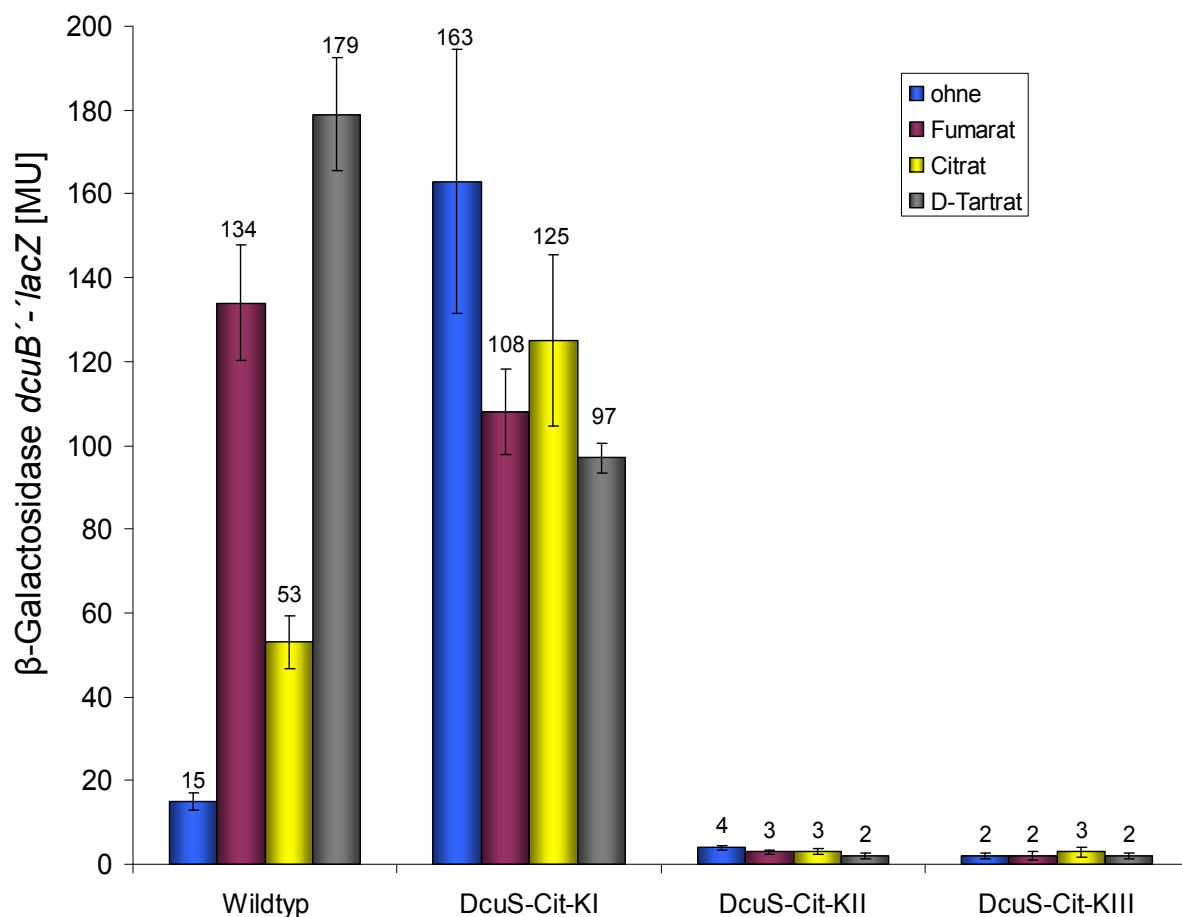


Abb. 22: Expression von *dcuB'*-*lacZ* in den DcuS/CitA-Hybriden K1, K2 und K3. *E. coli* IMW260 (*dcuS*-Insertionsmutante) wurde mit low-copy Plasmiden transformiert, welche DcuS bzw. die verschiedenen DcuS-CitA-Hybride enthielten. Die Bakterien wurden anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) in Anwesenheit von 20 mM Effektoren gezüchtet. Die β -Galactosidase-Aktivität wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Die Standardabweichung berechnet sich aus sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

4.3 Der Antiporter DcuB als zusätzliche Signaleingangsstelle des DcuSR-Systems

Unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten wie Fumarat, Malat und Aspartat reguliert das Zweikomponentensystem DcuSR die Gene der Fumaratatmung. DcuS ist eine typische Sensorhistidinkinase und erkennt die Dicarboxylate über die periplasmatische Domäne (Mascher *et al.*, 2006; Pappalardo *et al.*, 2003; Kneuper *et al.*, 2005; Krämer *et al.*, 2007). Der phosphorylierte Responseregulator DcuR bindet an die Promoter der Zielgene von *dcuB* (Antiporter DcuB, Operon mit der anaeroben Fumarase B, *fumB*), *frdABCD* (Fumaratreduktase) und *dctA* (aerober C₄-Dicarboxylat-Carrier DctA).

Der Antiport der C₄-Dicarboxylate gegen Succinat erfolgt über die drei anaeroben C₄-Dicarboxylat-Carrier DcuA, DcuC und DcuB, dem Haupttransporter unter diesen Bedingungen. DcuA ist ein konstitutiv exprimierter Carrier und wird als „back-up“-System von DcuB betrachtet (Six *et al.*, 1994; Golby *et al.*, 1998; Janausch *et al.*, 2002). DcuC ist während der gemischten Säuregärung aktiv und dient dem Succinatefflux (Zientz *et al.*, 1996, 1999). Die Expression von DcuC ist vom DcuSR-System und C₄-Dicarboxylaten unabhängig. DcuS ist eine membrangebundene Sensorhistidinkinase mit einer großen periplasmatischen Domäne zwischen den Transmembranhelices. Die Effektorbindung erfolgt über die periplasmatische Domäne von DcuS, wobei hauptsächlich positiv geladene Reste (R107, H110, R147, F149) in der Bindestelle essentiell sind (Kneuper *et al.*, 2005). Die Struktur wurde per Flüssig-NMR gelöst und die Substratbindestelle bildet einen „core“ aus 4 β -Faltblättern in antiparalleler Anordnung (Pappalardo *et al.*, 2003). Die Struktur der periplasmatischen Domäne repräsentiert somit eine PAS-Domäne (Taylor *et al.*, 1999).

DcuS kann isoliert und in Liposomen rekonstituiert werden. Die Autophosphorylierung von DcuS wird dabei um das 2- bis 5-fache durch C₄-Dicarboxylate stimuliert (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005). Die Phosphatgruppe wird anschließend schnell an den Responseregulator DcuR übertragen, welcher mit hoher Affinität und Spezifität an die Zielpromoter bindet (Janausch *et al.*, 2004; Abo-Amer *et al.*, 2004). Insgesamt repräsentieren der Sensor DcuS und der Regulator DcuR ein komplettes System zur Erkennung von C₄-Dicarboxylaten über die periplasmatische Domäne und der Regulation der Zielgene über phosphoryliertes DcuR.

Mit den folgenden Versuchen wird die Rolle des Antiporters DcuB bei der Signalerkennung und -weiterleitung genauer untersucht. In einer früheren Studie wurden alle drei anaeroben C₄-Dicarboxylat-Carrier einzeln inaktiviert und deren Effekt auf die translationelle Reportergenfusion *dcuB*'-'*lacZ* untersucht (Kleefeld, 2006). Tab. 12 zeigt die Expression von

dcuB'-'*lacZ* nach anaerober Zucht in *dcu*-Mutanten. Die Bakterien wurden für dieses Experiment in eM9 mit Glycerin plus Dimethylsulfoxid (DMSO) als Energiequelle gezüchtet, um einerseits ein Wachstum der *dcu*-Mutanten zu ermöglichen und andererseits eine Repression von *dcuB* durch Glucose zu vermeiden. Die *dcuB*-Expression wurde im Wildtyp durch Fumarat induziert. In der DcuB-Mutante wurden in Abwesenheit von DcuB die Zielgene maximal exprimiert, sie waren somit nicht mehr von Fumarat abhängig (Kleefeld, 2006). Die Expression konnte durch die Zugabe von Fumarat nicht weiter stimuliert werden und die Expression ohne Fumarat war sogar höher. Dieser Effekt war spezifisch für DcuB (DcuB-Effekt), da die DcuA- und DcuC-Mutanten das gleiche Expressionsmuster wie der Wildtyp zeigten. Der DcuB-Effekt fehlte, wenn zusätzlich der Sensor DcuS inaktiviert wurde. Insgesamt zeigte sich, dass die Inaktivierung von *dcuB*, nicht aber die von *dcuA* oder *dcuC*, die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* bereits in Abwesenheit von Fumarat stark induziert und über das DcuSR-System vermittelt wird.

Tab. 12: Einfluss der Inaktivierung der drei anaeroben C₄-Dicarboxylat-Carrier DcuA, DcuB und DcuC auf die Expression der *dcuB*'-'*lacZ* Reporterengenfusion. Die Zucht erfolgte anaerob in angereichertem M9-Medium mit Glycerin plus DMSO, mit und ohne Zusatz von Fumarat (20 mM). (Dissertation Alexandra Kleefeld, 2006)

Stämme (relevanter Genotyp)	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β-Galactosidase-Aktivität (Miller-Units)		^[14C] - Succinat Aufnahme (% wt)
	- Fumarat	+ Fumarat	
IMW237 (<i>wt</i>)	28 ± 8	431 ± 37	100
IMW369 (<i>dcuA</i> ⁻)	14 ± 1	460 ± 50	87
IMW370 (<i>dcuB</i> ⁻)	610 ± 127	435 ± 34	74
IMW371 (<i>dcuC</i> ⁻)	31 ± 13	472 ± 38	118
IMW372 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁻)	335 ± 41	504 ± 61	51
IMW373 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	14 ± 2	449 ± 103	103
IMW374 (<i>dcuB</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	569 ± 15	493 ± 69	66
IMW329 (<i>dcuA</i> ⁻ <i>dcuB</i> ⁻ <i>dcuC</i> ⁻)	332 ± 24	578 ± 57	11
IMW536 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i>)	4 ± 0	3 ± 0	—

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

Die Dcu-Carrier transportieren C₄-Dicarboxylate unter anaeroben Bedingungen, wobei die Carrier DcuA, DcuB und DcuC allesamt die Aufnahme, den Antiport und den Efflux katalysieren können (Six *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996). Die Aufnahme-Aktivität der Carrier wurde bestimmt, um die Transportfähigkeit der Dcu-Mutanten zu analysieren. Keine der Einzel- oder Doppel-Dcu-Mutanten war im Wachstum eingeschränkt. Erst die Dreifachmutante (*dcuA*, *dcuB*, *dcuC*) konnte nicht mehr anaerob auf Fumarat wachsen. Aus diesem Grund ist die Fumarat-unabhängige Expression von *dcuB'*-*'lacZ* auf das Fehlen von DcuB zurückzuführen, ist aber unabhängig vom C₄-Dicarboxylat-Transport.

Die bisherigen Experimente enthielten geringe Mengen von säurehydrolysiertem Casein (AHC), um das anaerobe Wachstum zu unterstützen. Um einen Effekt der Aminosäuren im Medium, z.B. von Aspartat, auszuschließen, wurden die gleichen Experimente in M9-Medium ohne Casein, dafür aber mit Glucose als C-Quelle durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist die *dcuB'*-*'lacZ*-Expression niedriger aufgrund der Glucoserepression (Zientz *et al.*, 1998), aber die Deletion von *dcuB* hatte den gleichen stimulierenden Effekt auf die *dcuB'*-*'lacZ*-Expression (Tab. 13).

Das *fumB* Gen für die anaerobe Fumarase B wird von einem Promoter upstream von *dcuB* exprimiert, aber auch von einem Promoter vor *fumB* (Golby *et al.*, 1998). Um einen polaren Effekt der *dcuB*-Inaktivierung auf die Expression von *fumB* auszuschließen, wurde *fumB* in Plasmid pET28a kloniert (resultierend in pET28a-*fumB*) und in einem *dcuB* deletierten Stamm exprimiert. Die konstitutive Expression von *dcuB'*-*'lacZ* blieb auch in diesem Hintergrund erhalten (Tab. 13). Wachstumsexperimente zeigten zusätzlich, dass Plasmid-codiertes *fumB* den *fumB* deletierten Stamm JW4083 komplementieren kann. Aus diesem Grund ist nur die Deletion von *dcuB* verantwortlich für die konstitutive Expression von *dcuB'*-*'lacZ*, das Gen *fumB* oder die zugehörige Fumarase B haben keine Bedeutung. Zusammenfassend ist nur das Fehlen von DcuB für die Fumarat-unabhängige Expression von *dcuB'*-*'lacZ* zuständig.

Tab. 13: Einfluss von säurehydrolysiertem Casein (AHC) und der anaeroben Fumarase B auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ*. Die Zucht erfolgte anaerob in M9 mit Zusätzen allerdings ohne AHC, ohne Glycerin und ohne DMSO. Als C-Quelle wurde 10 mM Glucose verwendet. Die Konzentration der Effektoren Fumarat und L-Malat betrug 20 mM. Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*lacZ*-Fusion (IMW237, IMW503) bzw. der Plasmid-codierten *dcuB'*-*lacZ*-Fusion (pMW99) wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen.

Stämme (relevanter Genotyp)	<i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a		
	ohne	+ Fumarat	+ Malat
IMW237 (<i>wt</i>)	8 ± 3	45 ± 16	46 ± 1
IMW503 (Δ <i>dcuB</i>)	39 ± 3	49 ± 2	46 ± 1
IMW503 pMW228 (Δ <i>dcuB</i> p(<i>dcuB</i>))	13 ± 1	28 ± 1	30 ± 3
IMW503 pET28a-fumB (Δ <i>dcuB</i> p(<i>fumB</i>))	50 ± 3	46 ± 5	50 ± 5
JW4083 (Δ <i>fumB</i>)	9 ± 1	6 ± 1	5 ± 1
JW4083 (Δ <i>fumB</i>) pMW99 (<i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i>)	452 ± 50	1668 ± 60	1644 ± 34

^a Standardabweichung von drei unabhängigen Zuchten in vier Parallelen in doppelter Ausführung

Die Fumarat-unabhängige Induktion in der DcuB-Mutante benötigt DcuS mit intakter periplasmatischer Domäne

Wenn zusätzlich zu DcuB der Sensor DcuS inaktiviert wurde, war die Expression von *dcuB* nicht mehr stimulierbar. Demnach wird der DcuB-Effekt über das DcuSR-System vermittelt (Tab. 14). DcuS erkennt über die periplasmatische Domäne (DcuS-PD) den Effektor. Die Sensordomäne kann durch Mutation der essentiellen Reste der Bindestelle ausgeschaltet werden (Kneuper *et al.*, 2005; Krämer *et al.*, 2007). Die DcuS-Reste F120M (Bindestellen C2) und R147A (Bindestelle H) wurden in Plasmid-codiertem DcuS mutiert und in *dcuB*-negativem Hintergrund die Expression von *dcuB'*-*lacZ* unter anaeroben Bedingungen gemessen (Kleefeld, 2006). Es ist bekannt, dass Plasmid-codiertes *dcuS* chromosomal inaktiviertes *dcuS* komplementieren kann (Kneuper *et al.*, 2005). In der *dcuB*-Mutante mit DcuS(F120M) und DcuS(R147A) war die Expression von *dcuB* nicht mehr stimulierbar, ähnlich wie im *dcuB* enthaltenden Wildtyp-Stamm mit den DcuS-Mutanten F120M und R147A (Tab. 14 und Tab. 6) (Kleefeld, 2006; Kneuper *et al.*, 2005).

Zusätzlich wurden die essentiellen Reste R107 der Bindestelle C2 und H110 der Bindestelle C3 gegen Alanin ausgetauscht und die Stimulation der Reportergenfusion in *dcuB*-negativem Hintergrund gemessen. Die Expression von *dcuB'*-*lacZ* war auch in diesen Stämmen nicht

mehr stimulierbar. Aus diesem Grund ist für die Fumarat-unabhängige Stimulation von *dcuB*'-'*lacZ* in einer *dcuB*-Mutante eine intakte Substratbindestelle der periplasmatischen Domäne von DcuS erforderlich.

Tab. 14: Rolle von DcuS und der Effektorbindestelle von DcuS für die Fumarat-unabhängige Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* im *dcuB*-negativen Hintergrund. Die Zellen wurden anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) und DMSO (20 mM) und Effektor Fumarat (20 mM) gezüchtet. Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Ergänzte Tabelle, Dissertation A. Kleefeld, 2006.

Stamm (relevanter Genotyp)	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a		Wachstum Glycerin + DMSO
	ohne	+ Fumarat	
IMW237 (<i>wt</i>)	28 ± 8	431 ± 37	+
IMW260 (<i>dcuS</i>)	10 ± 1	7 ± 3	–
IMW536 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i>)	4 ± 0	3 ± 0	–
IMW536 pMW181 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i> <i>pdcuS</i>)	86 ± 7	46 ± 13	+
IMW536 pMW237 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i> <i>pdcuS</i> (R147A))	3 ± 1	3 ± 0	±
IMW536 pMW368 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i> <i>pdcuS</i> (F120M))	3 ± 0	4 ± 1	±
IMW536 pMW398 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i> <i>pdcuS</i> (R107A))	2 ± 1	2 ± 1	±
IMW536 pMW236 (Δ <i>dcuB</i> <i>dcuS</i> <i>pdcuS</i> (H110A))	1 ± 2	1 ± 0	±

^a Standardabweichung von drei unabhängigen Zuchten in vier Parallelen in doppelter Ausführung

Effekt von DcuB auf die Erkennung von C₄-Dicarboxylaten in C₄-Dicarboxylat-spezifischen DcuS-Mutanten

DcuS erkennt neben C₄-Dicarboxylaten auch Citrat über die periplasmatische Domäne von DcuS (Kneuper *et al.*, 2005). Für die Erkennung von Citrat sind die gleichen essentiellen Reste wie für Fumarat erforderlich. Die Mutante DcuS(T101G) trägt die Mutation nahe der Substratbindestelle und vermittelt eine Spezifität für C₄-Dicarboxylate, wobei die Citrat-Antwort fehlt. In diesem Versuch soll der Effekt von Fumarat-spezifischem DcuS(T101G) auf das Fehlen des Carriers DcuB untersucht werden (Abb. 23). Im DcuS-Wildtyp verursacht das Fehlen von DcuB eine konstitutive Expression der *dcuB*-Reporterfusion. In einem Stamm mit DcuS(T101G) und Wildtyp-DcuB wurde die *dcuB*-Fusion durch Fumarat induziert und die Antwort auf Citrat fehlte (Abb. 23B). Im DcuS-Wildtyp war die Antwort auf C₄-

Dicarboxylate ähnlich stark (Abb. 23A). Im *dcuB*-negativen Hintergrund hingegen wurde die Reportergenfusion durch DcuS(T101G) nur noch in Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten wie Fumarat oder Malat induziert (Abb. 23B). Dies war ganz im Gegensatz zum DcuS-Wildtyp, wo die Genfusion in Abwesenheit vom Transporter DcuB ohne Effektoren voll induziert war (Abb. 23A). Weitere C₄-Dicarboxylat-spezifische DcuS-Mutanten, DcuS(I125S), DcuS(F141S) und DcuS(F149K) zeigten ebenfalls keine konstitutive Expression von *dcuB'*-*lacZ*, wenn DcuB deletiert war und benötigten zur Expression C₄-Dicarboxylate (Tab. 15). Die C₄-Dicarboxylat-spezifischen Mutanten erlangten auch in Abwesenheit von DcuB keinerlei Citrat-Sensitivität zurück.

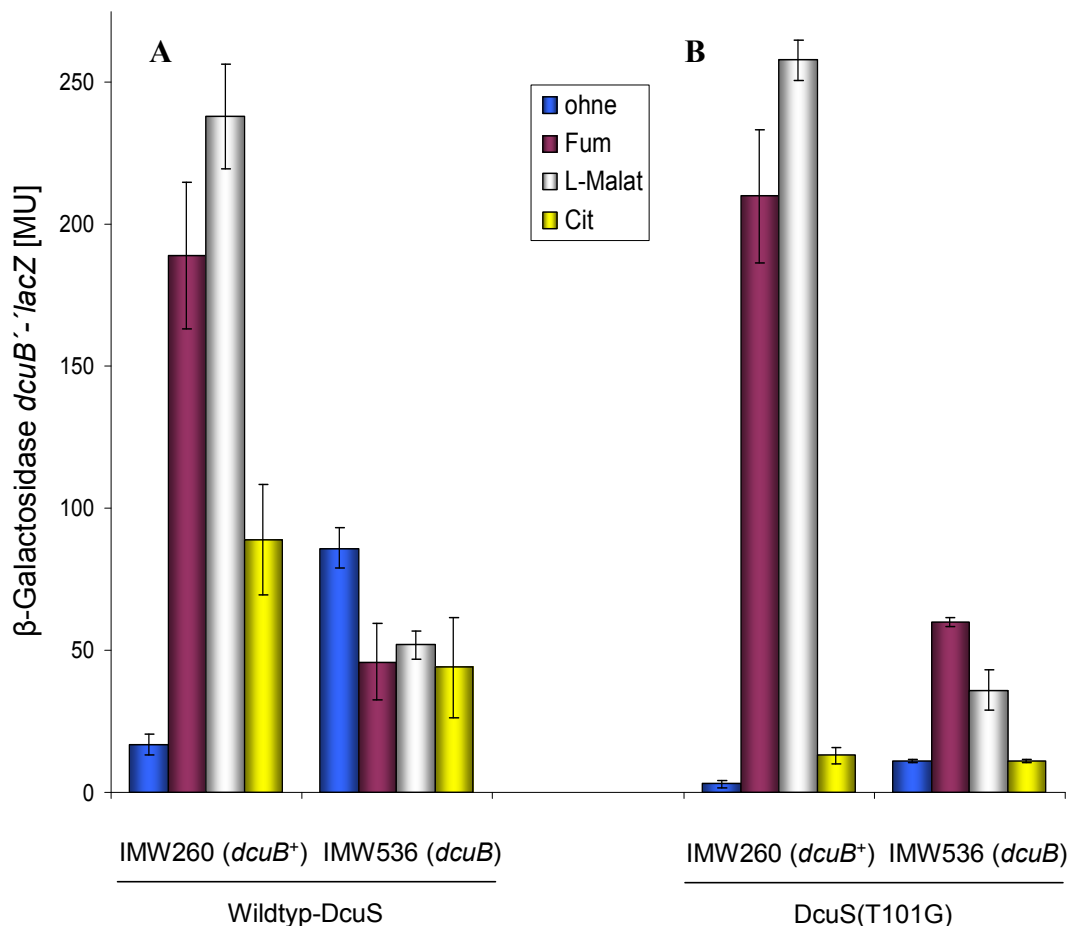


Abb. 23: Effekt von *dcuB*-negativen Mutanten auf die Funktion der C₄-Dicarboxylat-spezifischen Form DcuS(T101G). Der Effekt von Wildtyp-DcuS (A) und C₄-Dicarboxylat-spezifischen DcuS(T101G) (B) auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ* wurde in *E. coli* Stämmen mit DcuB (IMW260) und *dcuB*-negativem Hintergrund (IMW536) gemessen. In beiden Stämmen ist chromosomales DcuS inaktiviert. Plasmid-codiertes Wildtyp-DcuS stammt von pMW181 und DcuS(T101G) von pMW344. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat, Malat und Citrat (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Die Standardabweichung berechnet sich aus sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

Effekt von DcuB auf die Citraterkennung von Citrat-spezifischem DcuS_{Cit}

Der Effekt von DcuB auf die Citraterkennung durch Wildtyp-DcuS und die Citrat-spezifische Form DcuS(T101G F120M I125S) wurde in Plasmid-codierten DcuS-Varianten untersucht (Abb. 24 und Tab. 15). Mit Wildtyp-DcuS wird die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* durch Citrat um Faktor 5,2 stimuliert. In einem DcuB-inaktivierten Stamm zeigt sich wieder der DcuB-Effekt und die Expression von *dcuB* ist bereits in Abwesenheit von Citrat maximal stimuliert (Abb. 24A). Somit hat die Inaktivierung von DcuB einen ähnlichen Effekt auf die Citrat- und C₄-Dicarboxylat-abhängige Regulation durch DcuS. Die Citrat-spezifische Mutante DcuS(T101G F120M I125S) spricht auf Citrat mit einer ähnlichen Expression wie mit Wildtyp DcuS an (Abb. 24B). Im *dcuB*-negativen Hintergrund ging bei dieser DcuS-Variante die Fähigkeit die *dcuB*'-'*lacZ*-Expression zu stimulieren, sowohl mit als auch ohne Citrat verloren. Eine Aktivität mit C₄-Dicarboxylaten ist ebenfalls nicht messbar. Daher scheint DcuS(T101G F120M I125S) nur im DcuB-Wildtyp funktionell zu sein und benötigt DcuB für die Citraterkennung. Insgesamt zeigen die C₄-Dicarboxylat-spezifischen und die Citrat-spezifische DcuS Mutanten eine veränderte Antwort auf das Fehlen von DcuB im Vergleich zum Wildtypzustand.

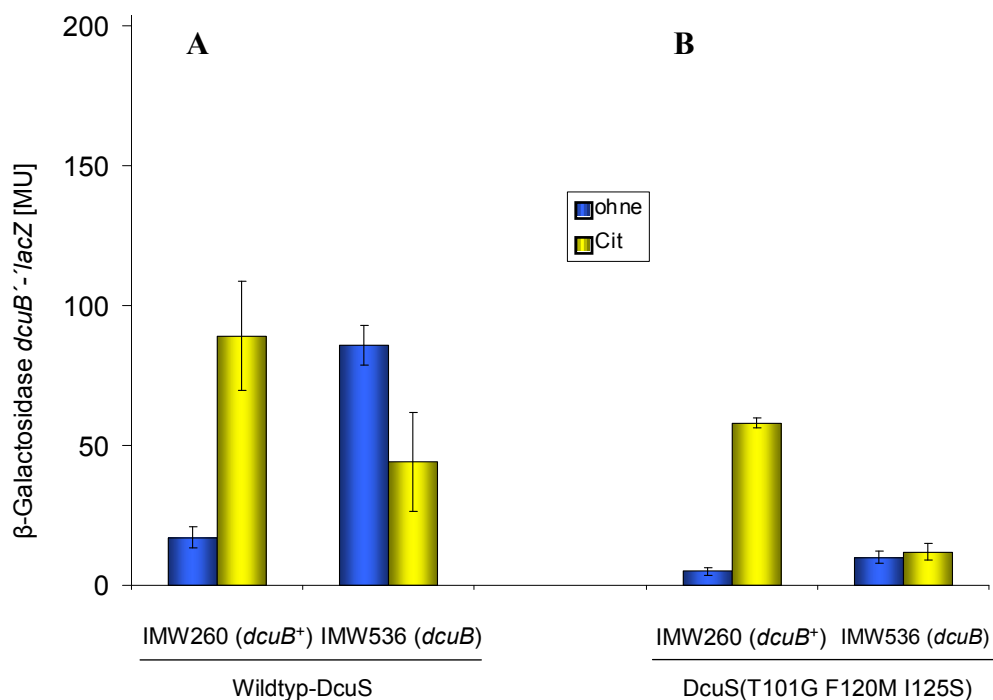


Abb. 24: Effekt von *dcuB*-negativen Mutanten auf die Funktion des DcuS_{Cit}. Der Effekt von Wildtyp-DcuS (A) und Citrat-spezifischem DcuS(T101G F120M I125S) (B) auf die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* wurde in *E. coli* Stämmen mit DcuB (IMW260) und *dcuB*-negativem Hintergrund (IMW536) gemessen. In beiden Stämmen ist chromosomales DcuS inaktiviert. Plasmid-codiertes Wildtyp-DcuS stammt von pMW181 und DcuS(T101G F120M I125S) von pMW353. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und Effektor Citrat (20 mM). Die β-Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Die Standardabweichung berechnet sich aus sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

Tab. 15: Effekt von *dcuB*-negativen Stämmen auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ* mit C₄-Dicarboxylat- bzw. Citrat-spezifischen DcuS-Mutanten. Die Zucht von IMW260 (*dcuS*) und IMW536 (Δ *dcuS dcuB*) mit Plasmid-codiertem DcuS und -Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat, Citrat und Malat (20 mM). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. n.b. = nicht bestimmt.

Stamm (relevanter Genotyp)	<i>dcuB'</i> - <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a			
	ohne	+ Fumarat	+ L-Malat	+ Citrat
DcuB Wildtyp-Hintergrund				
IMW260 (<i>dcuS</i>)	10 ± 1	7 ± 3	5 ± 3	5 ± 1
IMW260 pMW181 (<i>dcuS pdcuS</i>)	17 ± 4	189 ± 26	238 ± 18	89 ± 19
C₄-Dicarboxylat-spezifische DcuS-Mutanten				
IMW260 pMW344 (<i>dcuS pdcuS</i> (T101G))	3 ± 1	210 ± 23	258 ± 7	13 ± 3
IMW260 pMW373 (<i>dcuS pdcuS</i> (I125S))	6 ± 2	212 ± 10	278 ± 15	17 ± 4
IMW260 pMW354 (<i>dcuS pdcuS</i> (F141S))	7 ± 1	159 ± 2	295 ± 9	9 ± 1
IMW260 pMW345 (<i>dcuS pdcuS</i> (F149K))	3 ± 1	110 ± 11	235 ± 8	5 ± 1
Citrat-spezifische DcuS-Mutante				
IMW260 pMW353 (<i>dcuS pdcuS</i> (T101G F120M I125S))	5 ± 1	1 ± 1	105 ± 3	58 ± 2
DcuB Deletions-Hintergrund				
IMW536 (Δ <i>dcuB dcuS</i>)	7 ± 1	6 ± 1	5 ± 3	6 ± 1
IMW536 pMW181 (Δ <i>dcuB dcuS pdcuS</i>)	86 ± 7	46 ± 13	52 ± 5	44 ± 18
C₄-Dicarboxylat-spezifische DcuS-Mutanten				
IMW536 pMW344 (Δ <i>dcuB dcuS pdcuS</i> (T101G))	11 ± 1	60 ± 1	36 ± 7	11 ± 1
IMW536 pMW373 (Δ <i>dcuB dcuS pdcuS</i> (I125S))	13 ± 4	49 ± 1	n.b.	9 ± 1
IMW536 pMW354 (Δ <i>dcuB dcuS pdcuS</i> (F141S))	7 ± 1	41 ± 2	53 ± 12	6 ± 1
IMW536 pMW345 (Δ <i>dcuB dcuS pdcuS</i> (F149K))	11 ± 1	31 ± 1	n.b.	7 ± 1
Citrat-spezifische DcuS-Mutante				
IMW536 pMW353 (Δ <i>dcuB dcuS pdcuS</i> (T101G F120M I125S))	10 ± 2	10 ± 4	10 ± 1	12 ± 3

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

4.4 Analyse der Osmostress-Antwort von DcuS

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives und unbewegliches Boden-Bakterium und muss sich deshalb schnell an ändernde Umweltbedingungen wie Osmolarität und Temperatur anpassen können. Das Zweikomponentensystem MtrBA scheint an der Regulation von Osmo- und Kältesstress-Genen als Antwort auf steigende Osmolarität und sinkende Temperatur beteiligt zu sein (Möker *et al.*, 2004, 2007). In RNA-Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass drei Carrier (*betP*, *proP* und *IcoP*) für kompatible Solute durch das MtrBA-System reguliert werden. Dies lässt vermuten, dass MtrBA für die Osmostress-Antwort unter hyperosmotischen Bedingungen von *C. glutamicum* wichtig ist und der Sensor MtrB vermutlich als Osmosensor das Ausmaß von osmotischem Stress detektiert.

Der Sensor MtrB kann nach Überproduktion und Isolation in *E. coli* Liposomen rekonstituiert werden (Möker *et al.*, 2007). Bei der Untersuchung des physikochemischen Effektors stimulierten KCl, NH₄Cl und RbCl die Autophosphorylierung von MtrB signifikant, Na⁺ und Li⁺ hingegen kaum. Chloridionen werden als Stimulus aufgrund der fehlenden Stimulation von LiCl ausgeschlossen. Die Stimulation der Kinaseaktivität durch monovalente Kationen bekräftigte die Vermutung, dass MtrB als Osmosensor aktiv ist. Dieser Effekt wurde auch für den Sensor des Zweikomponentensystems EnvZ/OmpR aus *E. coli* gezeigt, da dieser in Anwesenheit von K⁺ und Na⁺ mit hoher Aktivität stimuliert wurde (Pratt and Silhavy, 1995). Es sollte untersucht werden, ob die beobachteten Aktivitätsprofile spezifisch für Osmoregulations-Sensoren sind. Um weiterhin zu unterscheiden, ob MtrB speziell durch Kationen aktiviert wird oder ob Kationen die Autophosphorylierung von rekonstituiertem Sensorkinasen generell beeinflussen, wurde die Osmostress-unabhängige Sensorkinase DcuS rekonstituiert und mit Osmolyten die Autophosphorylierung *in vitro* (KCl, NaCl u.a.) getestet (Abb. 25). Ähnlich wie mit MtrB wurde die Autokinaseaktivität von DcuS *in vitro* besonders durch die monovalenten Kationen K⁺, Rb⁺ und NH₄⁺ (jeweils als Chloride) stark stimuliert (Möker *et al.*, 2007). Weiterhin wurde für DcuS eine bestimmte Konzentration an K⁺-Ionen (~20 mM) als Grundvoraussetzung für die Stimulation der Kinaseaktivität durch Fumarat bestimmt.

Diese Ergebnisse deuten auf eine weitere Sensorfunktion von DcuS zusätzlich zur Fumaraterkennung hin. Eine alternative Erklärung wäre, dass die Kationen nicht spezifisch auf MtrB wirken, sondern *in vitro* einen generellen stimulierenden Effekt auf Histidinkinasen haben.

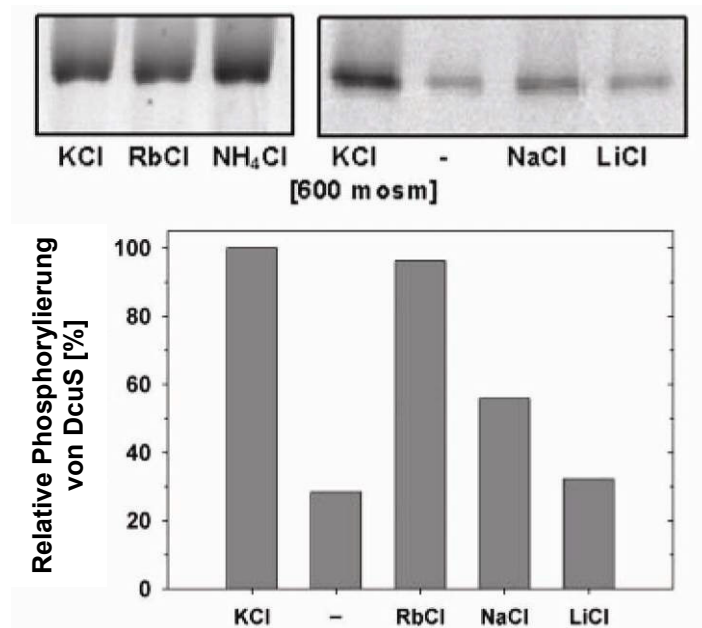


Abb. 25: Einfluss von monovalenten Kationen auf die Phosphorylierungsaktivität von DcuS in Liposomen. Die Reaktion wurde für 10 min nach der Zugabe von $[\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ ausgeführt. Oben sind die Autoradiogramme und unten die Quantifizierung der Phosphorylierungsaktivität aufgeführt. -, keine Kationen; mosm, milliosmole (Abbildung aus Möker *et al.*, 2007).

Um die Stimulation der DcuSR-Zielgene zu untersuchen, wurde die Expression von *dcuB'*-*'lacZ* unter hyperosmotischen Bedingungen *in vivo* getestet. Dazu wurde der *E. coli* Stamm IMW237, mit einer chromosomalen *dcuB'*-*'lacZ* Reportergenfusion, anaerob in eM9 mit Glycerin und DMSO in Ab- und Anwesenheit von hochmolaren Effektoren ($\text{Na}_2\text{-Fumarat}$, Tris-Fumarsäure pH 7, Sorbitol, NaCl, KCl) gezüchtet.

Die Expression von *dcuB* wurde durch Natrium-Fumarat bzw. Tris-Fumarat um Faktor 7,2 bzw. 8,8 stimuliert (Abb. 26). Die Zugaben von hochmolaren Soluten (Sorbitol, NaCl, KCl oder Sorbitol/Fumarat) führte zu keiner Stimulation von *dcuB*. Offensichtlich führen hyperosmotische Bedingungen zu keiner DcuSR-abhängigen Expression von *dcuB'*-*'lacZ* *in vivo*. Somit ist das DcuSR-System in die Antwort auf hyperosmotischen Schock nicht involviert. Dies wurde durch eine Transkriptom-Analyse bestätigt, indem ein hyperosmotischer Schock die DcuSR-regulierten Gene in *E. coli* nicht beeinflusste (Weber *et al.*, 2002). Deshalb scheint die Stimulation von DcuS *in vitro* kein physiologisch relevantes Ereignis zu sein sondern eher ein genereller Effekt von Kationen auf die Kinaseaktivität von DcuS in Liposomen. Vermutlich hat K^+ einen stimulierenden Effekt auf rekonstituierte Histidinkinasen, auch wenn dieser Effekt *in vivo* wahrscheinlich nicht entscheidend ist. So werden auch KdpD und EnvZ in Proteoliposomen in einer „inside-out“-Orientierung durch K^+ aktiviert (Nakashima *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 2001). Die Stimulation durch K^+ fehlt in KdpD

wenn dieses, wie in der natürlichen Membran, in einer „right-side-out“-Orientierung vorliegt (Jung *et al.*, 2000). Scheinbar benötigen Histidinkinasen, sofern diese solubilisiert, gereinigt und in Liposomen rekonstituiert wurden, erhöhte Konzentrationen monovalenter Kationen um eine aktive Konformation zu stabilisieren.

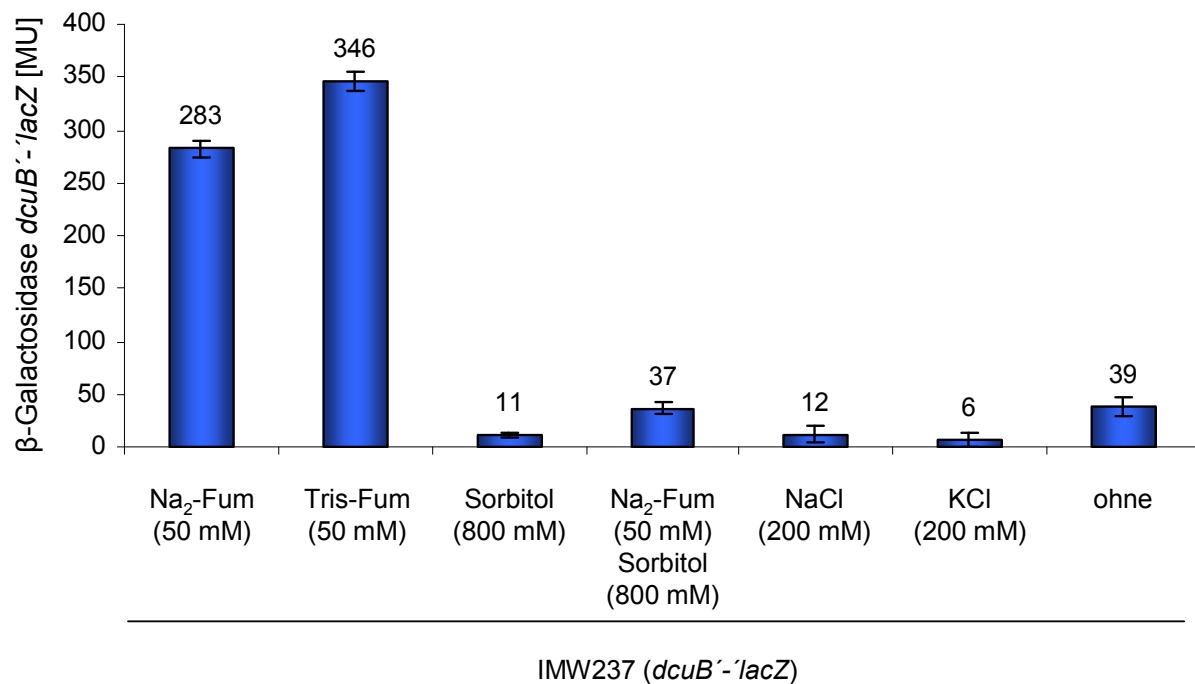


Abb. 26: Einfluss von osmotisch aktiven Substanzen auf die Expression von *dcuB'*-*lacZ* unter hyperosmotischen Bedingungen. Die Zucht von *E. coli* IMW237(*dcuB'*-*lacZ*) erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und dem Effektoren in den angegebenen Konzentrationen. Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB'*-*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen. Tris-Fum (Tris-Fumarsäure pH 7). Die Standardabweichung berechnet sich aus sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

4.5 Strukturuntersuchungen von verkürztem DcuS

Für Strukturuntersuchungen mittels Festkörper-NMR (Solid-state NMR) an verkürztem DcuS wurde das Konstrukt DcuS-PD/PAS generiert (Kneuper, 2005). Im Gegensatz zur herkömmlichen NMR können mit der Festkörper-NMR Proteine in der Membran untersucht werden. Die Festkörper-NMR ist noch nicht effektiv für Proteine wie DcuS mit einer Größe von 63 kDa, weshalb eine verkürzte Variante eingesetzt wurde. Das Konstrukt umfasst den N-terminalen Bereich mit den beiden Transmembranhelices, die periplasmatische Domäne und die cytoplasmatische PAS-Domäne (Abb. 27). Die PAS-Domäne ist in der Swissprot-Datenbank vermutlich mit Aminosäurepositionen 220 – 291 nicht korrekt wiedergegeben und wurde nach Vergleich der Sequenz mit homologen PAS-Domänen auf Aminosäureposition 212 – 332 erweitert (Kneuper, 2005). Die codierende Sequenz für Aminosäuren 1 – 332 wurde in pET28a kloniert und im Stamm C43(DE3) nach Induktion überproduziert. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Matrix.



Abb. 27: Schematische Darstellung des C-terminal um die Kinase verkürzten Konstrukts DcuS-PD/PAS.

Nach Induktion der Überexpression erschien eine Bande mit der erwarteten Masse von ca. 40 kDa (Abb. 28). Die Proteinausbeute machte ungefähr 1 % des Gesamtproteins aus (Tab. 16).

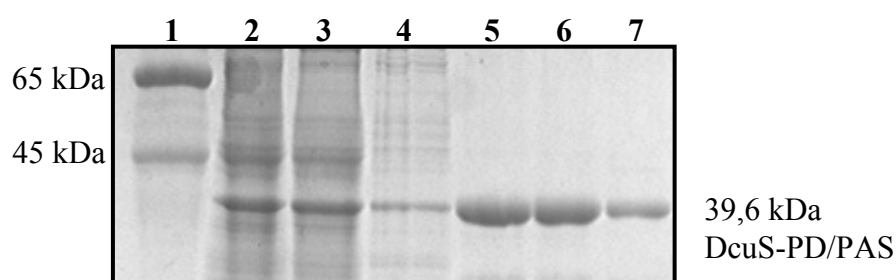


Abb. 28: Überexpression und Reinigung von verkürztem Konstrukt DcuS-PD/PAS-His₆ aus *E. coli* C43 (pMW309). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

- | | |
|--|-------|
| 1: Proteinstandard: BSA (Mr 65 kDa), Ovalbumin (Mr 45 kDa) | |
| 2: Zellhomogenat vor der Induktion | 40 µg |
| 3: Zellhomogenat nach 4 – 5 h Induktion | 40 µg |
| 4: Durchlauf der Ni-NTA-Agarosesäule | 10 µg |
| 5: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 4 | 20 µg |
| 6: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 5 | 20 µg |
| 7: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 6 | 15 µg |

Tab. 16: Ausbeute der Reinigung von DcuS-PD/PAS-His₆

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ^a
Gesamtprotein ^b	100	280
Lösliches Protein ^c	56	156
Membranprotein ^d	42	115
Gereinigtes Protein ^e	1,1	3

^a aus 0,8 l Kulturvolumen, Zucht mit *E. coli* C43 (pMW309) in LB + Glucose

^b Überstand nach Zellaufschluss und Abtrennung der nicht-aufgeschlossenen Zellen

^c Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteinsuspension

^d Überstand nach Ultrazentrifugation der nicht-solubilisierten Membranproteine

^e Gesammelte Fraktionen nach Ni-NTA-Elution

Für Untersuchungen durch Festkörper-NMR wurde das Protein in Liposomen rekonstituiert. Die Liposomen wurden dafür mit Triton X-100 in einem effektiven Detergenz:Lipid-Quotient (R_{eff}) von 2,5 destabilisiert. Unter diesen Bedingungen liegen die Liposomen vollständig solubilisiert in Form von gemischten Detergenz-Lipid-Mizellen vor. Die Rekonstitution erfolgte im Protein:Lipid-Verhältnis von 10:1 und 7,5:1. Das rekonstituierte Protein wurde in einem Saccharose-Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation getrennt und so die Effizienz des Einbaus von verkürztem DcuS in die Liposomen untersucht. Der Gradient wurde nach der Zentrifugation in Fraktionen aufgenommen und durch SDS-PAGE getrennt (Abb. 29). Das Protein befand sich im Übergang von 20 % auf 45 % Saccharose wieder. Dies sprach für eine weitgehende Rekonstitution des Proteins in Liposomen. Die Rekonstitution erfolgte dabei fast verlustfrei (Kneuper, 2005).

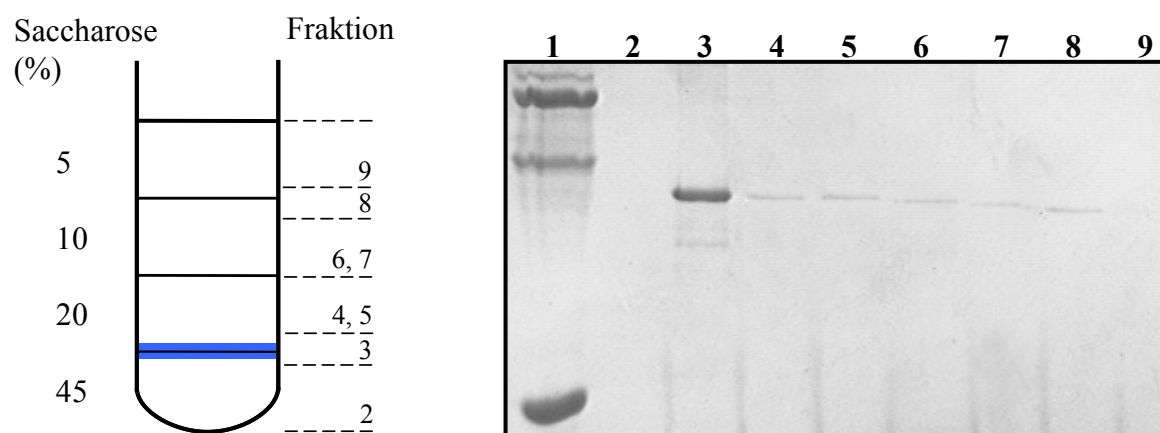


Abb. 29: Überprüfung der Rekonstitution von DcuS-PD/PAS mittels Saccharose-Dichtegradient. Der Gradient bestand aus Schichten mit einer Saccharosekonzentration von 5 – 45 %. Die Schicht mit 5 % wurde mit einem Aliquot der Probe überschichtet. Der Gradient wurde nach Zentrifugation in Fraktionen (2 – 9) aufgeteilt und mittels SDS-PAGE getrennt. Die blaue Bande gibt die Lage von rekonstituiertem DcuS wieder, die durch eine Trübung zu beobachten war.

Die rekonstituierten Proben wurden durch Festkörper-NMR-Spektroskopie (AG Dr. Marc Baldus, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) untersucht (Etzkorn *et al.*, 2008, eingereicht).

Aufgrund mehrerer funktioneller Domänen wird DcuS als Multidomänen-Protein bezeichnet. Dazu gehören die periplasmatische PAS-Domäne (PAS_P), die Transmembranhelices, die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS_C) und die Kinase-Domäne. Sensorkinasen mit Multidomänen-Struktur und der Erkennung von periplasmatischen Signalen waren bisher für Strukturuntersuchungen über die vollständige Proteinsequenz nicht zugänglich. Strukturinformation wurden bisher nur von isolierten Domänen ohne transmembrane Segmente erhalten (Bader *et al.*, 2005; Neiditch *et al.*, 2006; Szurmant *et al.*, 2007).

Die Strukturuntersuchungen des membranständigen DcuS-Konstruktes zeigten Spektren, die charakteristisch für ein deutlich gefaltetes Protein sind und PAS_P und PAS_C bestätigen (Abb. 30). Die Daten zu PAS_P sind mit den Ergebnissen zur isolierten PAS_P (Pappalardo *et al.*, 2003) konsistent. Unterschiede in der Struktur fanden sich in den flankierenden Bereichen von PAS_P, die auf die Verbindung zu den Transmembranhelices basierten. In PAS_C wurde eine ungeordnete N-terminale Helix identifiziert, welche durch die Verbindung zu den Transmembranhelices nicht stabilisiert wurde.

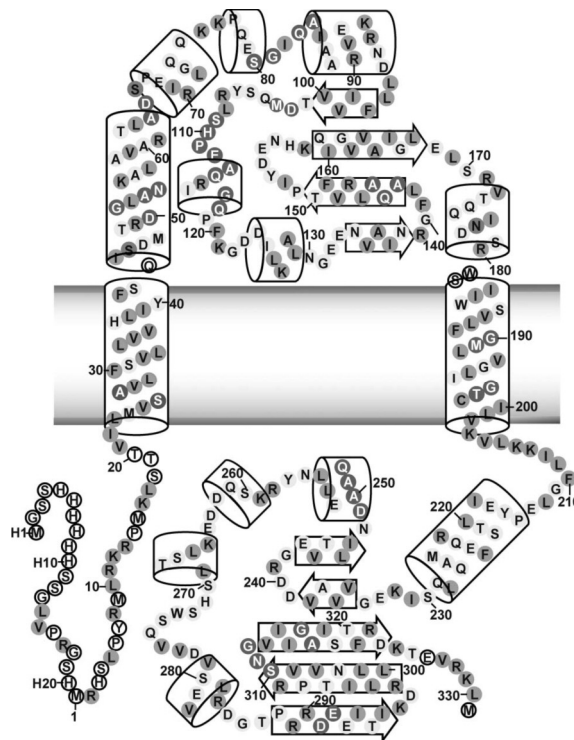


Abb. 30: Graphische Darstellung der Solid-state NMR-Experimente mit DcuS-PD/PAS. Abgebildet sind die schematischen Sekundärstrukturen des Multidomänen-Sensors in der Membran (351 Aminosäuren, DcuS-Konstrukt inklusive His-tag).

4.6 Untersuchung der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR

Überexpression und Isolierung von DcuS-His₆

Die Aktivität der Autophosphorylierung der Sensorkinase DcuS wird durch C₄-Dicarboxylate stimuliert und erfolgt an dem konservierten Histidinrest (His349). Der Phosphatrest wird im Anschluss auf den konservierten Aspartatrest (Asp56) des Responseregulators DcuR übertragen (Janausch *et al.*, 2002).

Für die Überproduktion von DcuS wurde *E. coli* C43(DE3) mit Plasmid-codiertem DcuS (pMW151) transformiert. Die Expression von DcuS steht unter der Kontrolle des induzierbaren T7lac-Promoters. Nach Induktion und Überproduktion wurde das membranständige DcuS mit dem Detergenz Empigen BB aus der Membranfraktion solubilisiert und über eine Ni-NTA Säule gereinigt. Auf der Säule wurde das Detergenz gegen 0,04% LDAO, welches Aggregaten vorbeugt, ausgetauscht (modifiziert nach Janausch *et al.*, 2002). Die Fraktionen mit DcuS waren von hoher Reinheit (Abb. 31). Die Proteinausbeute an DcuS machte ca. 2,3% des gesamten Zellproteins aus (Tab. 17).

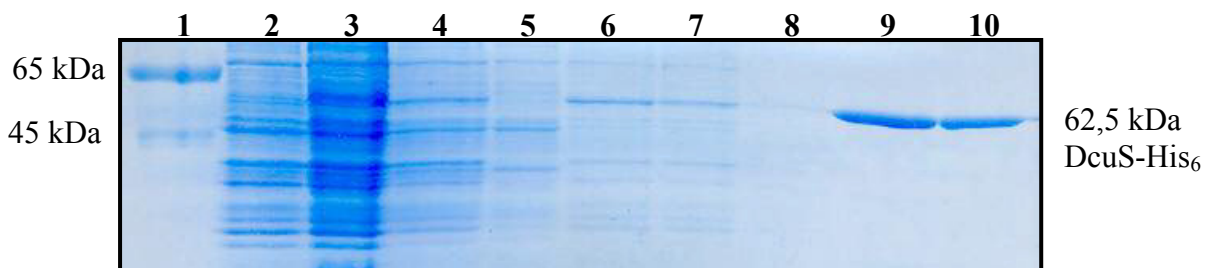


Abb. 31: Überexpression und Reinigung von DcuS-His₆ aus *E. coli* C43 (pMW151). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

- | | |
|--|-------|
| 1: Proteinstandard: BSA (Mr 65 kDa), Ovalbumin (Mr 45 kDa) | |
| 2: Zellhomogenat vor der Induktion | 25 µg |
| 3: Zellhomogenat nach 4 – 5 h Induktion | 40 µg |
| 4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss | 15 µg |
| 5: Lösliche Fraktion | 7 µg |
| 6: Membranfraktion | 8 µg |
| 7: Durchlauf der Ni-NTA-Agarosesäule | 6 µg |
| 8: Waschfraktion der Ni-NTA-Agarosesäule | 1 µg |
| 9: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 3 | 7 µg |
| 10: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 4 | 5 µg |

Tab. 17: Ausbeute der Reinigung von DcuS-His₆

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ^a
Gesamtprotein ^b	100	605
Lösliches Protein ^c	58	350
Membranprotein ^d	38	229
Gereinigtes Protein ^e	2,3	14

^a aus 0,8 l Kulturvolumen, Zucht mit *E. coli* C43 (pMW151) in LB + Glucose

^b Überstand nach Zellaufschluss und Abtrennung der nicht-aufgeschlossenen Zellen

^c Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteinsuspension

^d Überstand nach Ultrazentrifugation der nicht-solubilisierten Membranproteine

^e Gesammelte Fraktionen nach Ni-NTA-Elution

Überexpression und Isolierung von DcuR-His₆

Zur Isolation des Responseregulators DcuR wurde *E. coli* BL21(DE3) mit DcuR codierendem Plasmid (pMW266) transformiert und die Überexpression induziert. Die Isolation des cytoplasmatischen Proteins erfolgte durch Affinitätschromatographie über einen N-terminalen His-tag (Abb. 32). Ein beträchtlicher Teil an DcuR geht in „inclusion bodies“ während der Reinigung als unlösliches Protein verloren (Janausch *et al.*, 2002). Die Ausbeute an gereinigtem DcuR-His₆ mit ca. 30 kDa betrug ungefähr 15 – 20 % (Tab. 18). Isoliertes DcuR wurde in Fraktionen (50 µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -80 °C gelagert und unmittelbar vor der Verwendung aufgetaut.

Isoliertes DcuR-His₆ neigt zur Aggregation, weshalb den Puffern 40 % Glycerin zur Stabilisierung zugesetzt wurde (Janausch *et al.*, 2002). Hohe Glycerinkonzentrationen scheinen jedoch die Aktivität von DcuR in der Phosphatübertragung zu hemmen (Tab. 19). In einem abgeänderten Verfahren mit modifizierten Puffern mit weniger Glycerin (max. 10%) und 1 mM DTT war DcuR-His₆ stabil und konnte mit hoher Aktivität phosphoryliert werden und ist somit für Phosphorylierungsversuche geeignet. In dem neuen Puffer zeigte DcuR auch nach Wochen bei Raumtemperatur keine Bildung von aggregiertem Protein (Tab. 19). In dem neuen Puffer war DcuR wesentlich stabiler als in früher verwendeten Puffern.

Der pH-Wert spielt bei der Phosphorylierung und dadurch bei der Stabilität von phosphorylierten Proteinen eine entscheidende Rolle. Acyl-Phosphate, wie Aspartylphosphat, sind nur im neutralen pH-Bereich bis zu Stunden stabil. Alkalische und saure Bedingungen hydrolysieren die Phosphatbindung und sind nicht geeignet (Li *et al.*, 1996, Goudreau *et al.*, 1998; Stock *et al.*, 2000). N-phosphorylierte Aminosäuren, wie z.B. Histidinphosphate, sind unter sauren Bedingungen Hydrolyse-sensitiv und nur bei neutralen und alkalischen pH stabil

(Goudreau *et al.*, 1998; Wiley *et al.*, 1988; Stock *et al.*, 2000). Deshalb wurde ein neutral bis schwach alkalischer pH-Wert für die Puffer gewählt.

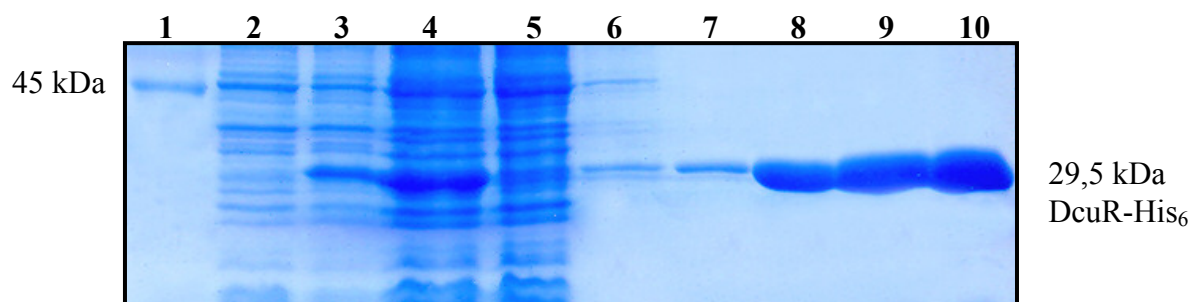


Abb. 32: Überexpression und Reinigung von DcuR-His₆ aus *E. coli* BL21(DE3) (pMW266). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

1: Proteinstandard: Ovalbumin (Mr 45 kDa)	
2: Zellhomogenat vor der Induktion	20 µg
3: Zellhomogenat nach 4 – 5 h Induktion	25 µg
4: Gesamtprotein nach Zellaufschluss	70 µg
5: Durchlauf der Ni-NTA-Agarosesäule	65 µg
6: Waschfraktion der Ni-NTA-Agarosesäule	2 µg
7: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 1	3 µg
8: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 2	20 µg
9: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 3	30 µg
10: Elution der Ni-NTA-Agarosesäule, Fraktion 4	25 µg

Tab. 18: Ausbeute der Reinigung von DcuR-His₆ (pMW266)

	Ausbeute (%)	Protein [mg] ^a
Gesamtprotein	100	155
Gereinigtes Protein	12,9	20

^a aus 0,8 l Kulturvolumen, Zucht mit BL21(DE3) (pMW266) in LB + Glucose

Tab. 19: Stabilität und Phosphorylierbarkeit von isoliertem DcuR in Abhängigkeit vom Puffer. DcuR-His₆ (10 mg/ml) in Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert und die Bildung von Aggregaten kontrolliert. Die Phosphorylierung von DcuR wurde in radioaktiven Tests untersucht.

	Elutionspuffer		
	50 mM TrisHCl pH 7,0 0,5 M NaCl 10 % Glycerin 0,5 M Imidazol pH 7,0 1 mM DTT	50 mM TrisHCl pH 7,7 0,5 M NaCl 10 % Glycerin 0,5 M Imidazol pH 7,7	50 mM TrisHCl pH 7,7 0,5 M NaCl 20 – 40 % Glycerin 0,5 M Imidazol pH 7,7
Löslichkeit von DcuR	++	--	n.b.
Phosphorylierbarkeit von DcuR ^a	ja	nein	kaum

^a Phosphorylierbarkeit von DcuR (Aspartylphosphat) durch phosphoryliertes DcuS (³³γP)
 -- : Aggregation in Minuten (5 – 10); ++ : mehrere Wochen stabil; n.b.: nicht bestimmt

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS *in vitro*

DcuS ist nur in der Membran als Autokinase aktiv (Janausch *et al.*, 2002). Deshalb wurde das solubilisierete DcuS in Liposomen aus *E. coli* rekonstituiert, um ähnliche Bedingungen wie in der Zellmembran zu schaffen. Bevor aus einem Gemisch von *E. coli* Phospholipiden Liposomen hergestellt werden konnten, wurden diese mit dem Detergenz Octylglycosid gelöst. Das Detergenz wurde anschließend durch Dialyse entfernt. Die Liposomen wurden mit Triton X-100 destabilisiert und mit der Proteinfraction vereint. Das solubilisierete DcuS-His₆ wurde mit den destabilisierten Liposomen im Lipid:Protein-Verhältnis 20:1 (w/w) inkubiert, entsprechend einem Proteinmolekül pro ca. 1400 Lipidmolekülen. Die Detergenzien wurden durch Bio-Beads entfernt und DcuS inserierte dabei in die neu gebildeten Liposomen. Die DcuS-haltigen Proteoliposomen wurden unmittelbar vor der Verwendung mehrmals in Phosphorylierungspuffer eingefroren und aufgetaut.

Bei der Rekonstitution von Membranproteinen in Liposomen werden diese bevorzugt in „inside-out“-Orientierung eingebaut, das heißt DcuS war mit der cytoplasmatischen Domäne zur Außenseite der Liposomen gerichtet, wie z.B. bei KdpD, PhoQ und MtrB (Jung *et al.*, 1997, 2001; Janausch *et al.*, 2002; Sanowar und Le Moual, 2005; Möker *et al.*, 2007). Als weitere Möglichkeiten gibt es die „random“ oder Zufallsanordnung und die seltenere „right-side-out“-Orientierung des Betain-Transporters BetP (Schiller *et al.*, 2004).

DcuS verfügt über eine große cytoplasmatische Domäne, welche nach Rekonstitution vermutlich nach außen gerichtet ist, während die periplasmatische Domäne nach innen zeigt (Janausch *et al.*, 2002). Dafür spricht, dass die Kinasedomäne für radioaktives ATP ohne Vorbehandlung zugänglich war, da Phospholipidmembranen für ionische und polare Substanzen undurchlässig sind. Damit der Effektor Fumarat an die Bindedomäne von DcuS im Lumen der Liposomen gelangen konnte, wurden die Proteoliposomen mehrfach eingefroren und aufgetaut. Dadurch wird die geschlossene Lipidmembran vorübergehend aufgebrochen, wodurch eine homogene Verteilung des Phosphorylierungspuffers (Fumarat, MgCl₂, DTT) im Inneren und Äußeren der Liposomen ermöglicht wird (Janausch *et al.*, 2002).

Die Autophosphorylierung von dimeren Histidinkinasen ist üblicherweise eine Trans-Phosphorylierung zwischen den monomeren Untereinheiten (Dutta *et al.*, 1999). In Liposomen liegt DcuS vermutlich bereits als aktives Dimer vor (Kneuper 2005, Scheu und Unden, unveröffentlicht), in dem C₄-Dicarboxylate die Kinaseaktivität zusätzlich stimulieren.

Kinetik der Autophosphorylierung von rekonstituiertem DcuS

Bakterielle Histidinkinasen katalysieren die ATP-abhängige Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes, resultierend in einem Phosphoimidazol. Voraussetzung für die Phosphorylierung der Histidinkinase ist ein Komplex aus ATP und Mg^{2+} . Die Phosphorylierung von rekonstituiertem DcuS ist nach ca. 30 min maximal. Aus energetischen Gründen reagiert nur ein kleiner Teil des Sensors (7 %) zu Histidinphosphat. Der K_M von DcuS für ATP ist 0,16 mM (Janausch *et al.*, 2002).

Die Autophosphorylierung von rekonstituiertem DcuS wurde durch Einsatz von radioaktivem $[\gamma^{33}P]$ -ATP bestimmt. Rekonstituiertes DcuS (6,6 μ M) lag im Ansatz im deutlichen Überschuss zum Substrat $[\gamma^{33}P]$ -ATP (140 nM) vor. Das meiste ATP wurde in der Kinasereaktion von DcuS nicht hydrolysiert. Das ließ vermuten, dass die Konzentration an ATP für die optimale Kinaseaktivität nicht ausreichte. Es sollte untersucht werden, ob bei höheren ATP-Konzentrationen die Kinaseaktivität und der Anteil von phosphoryliertem DcuS zunimmt. Dazu wurde DcuS immer mit der gleichen Konzentration an radioaktivem $[\gamma^{33}P]$ -ATP, ergänzt um variierende Konzentrationen an unmarkiertem ATP, inkubiert. Nach Stopp der Reaktion durch Zugabe von SDS-haltigem Puffer wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktive Markierung von DcuS wurde durch einen Phosphoimager detektiert und die Intensität des radioaktiven Signals auf dem Autoradiogramm mittels Analyse-Software quantifiziert.

Die intensivste Schwärzung wurde für die Probe mit unverdünntem $[\gamma^{33}P]$ -ATP erhalten (Abb. 33A). Die Verdünnung von radioaktivem ATP mit kaltem ATP reduzierte die Intensität. Aus der spezifischen Radioaktivität und der Signalstärke wurde die relative Menge an gebundenem Phosphat berechnet. Die Zunahme der Phosphorylierung bzw. der Kinaseaktivität zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 33B). Ab einer Konzentration von 100 μ M ATP war wegen der starken Verdünnung der Radioaktivität kein radioaktives Signal im Phosphoimager detektierbar.

In weiteren Versuchen wurde radioaktives ATP unverdünnt eingesetzt, um ein starkes radioaktives Signal für eine vorläufige Untersuchung der Phosphorylierung und Dephosphorylierung zu erhalten.

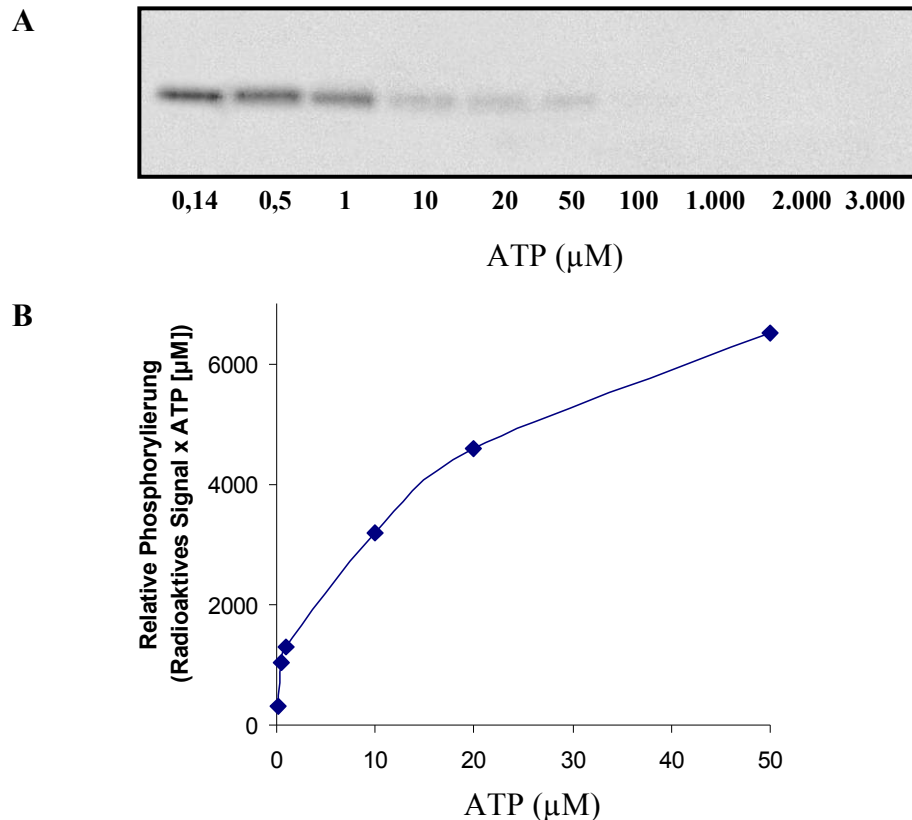


Abb. 33: Phosphorylierung von rekonstituiertem DcuS als Funktion der ATP-Konzentration. Die Phosphorylierung von DcuS wurde in Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,0, 1 mM DTT, 20 mM Fumarat, 5 mM MgCl_2) und $0,14 \mu\text{M}$ $[\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ bestimmt. Die Konzentration an Gesamt-ATP wurde mit unmarkierten ATP ergänzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben ($2 \mu\text{g}$ DcuS) entnommen und per SDS-PAGE getrennt. Die radioaktiven Gele wurden auf Phosphoimager-Platten für 16 – 48 h inkubiert und das Autoradiogramm anschließend per Phosphoimager ausgewertet (**A**). Phosphorylierungsrate von DcuS als Funktion der ATP-Konzentration. Nach Quantifizierung des radioaktiven Signals in DcuS wurde dieses mit der ATP-Konzentration multipliziert und gegen die ATP-Konzentration geplottet (**B**).

Phosphattransfer von DcuS auf DcuR

Phosphorylierte Sensorkinasen katalysieren den Transfer des Phosphatrestes (Histidinphosphat) von dem konservierten Histidinrest auf den Aspartatrest des Responseregulators.

Der Phosphatgruppentransfer wurde mit DcuS-haltigen Proteoliposomen und gereinigtem DcuR durchgeführt. DcuS lag in Liposomen vermutlich in der „inside-out“-Orientierung vor, da die Kinasedomäne mit der Phosphatgruppe zugänglich war. DcuS wurde zunächst für 30 min mit radioaktivem ATP inkubiert, bevor lösliches DcuR im 8 molaren Überschuss zugegeben wurde ($4 \mu\text{g}$ DcuR / μg DcuS). Die Phosphorylierung von DcuR wurde über 30 min verfolgt. Der radioaktive Phosphatrest wurde schnell von DcuS-P auf DcuR übertragen (Abb. 34A, C). Nach Inkubation von phosphoryliertem DcuS (DcuS-P) mit DcuR für 1 min,

hatte DcuS ungefähr 90 % des radioaktiven Phosphates verloren. Etwa 50 % des radioaktiven Signals befanden sich in der Bande von DcuR. Die in DcuS verbleibende Radioaktivität vermindert sich bei weiterer Inkubation bis auf 3 % nach 20 min. Die Radioaktivität in phosphoryliertem DcuR (DcuR-P) nahm mit fortschreitender Zeit ebenfalls ab, weshalb DcuR-P nicht stabil zu sein scheint.

Der Phosphattransfer von DcuS auf DcuR startet unmittelbar nach Zusatz von DcuR. Ein Großteil der Radioaktivität ist bereits nach kurzer Zeit von DcuR abgespalten. Deshalb kann man annehmen, dass DcuS oder DcuR die Phosphataseaktivität des DcuSR-Systems stellen.

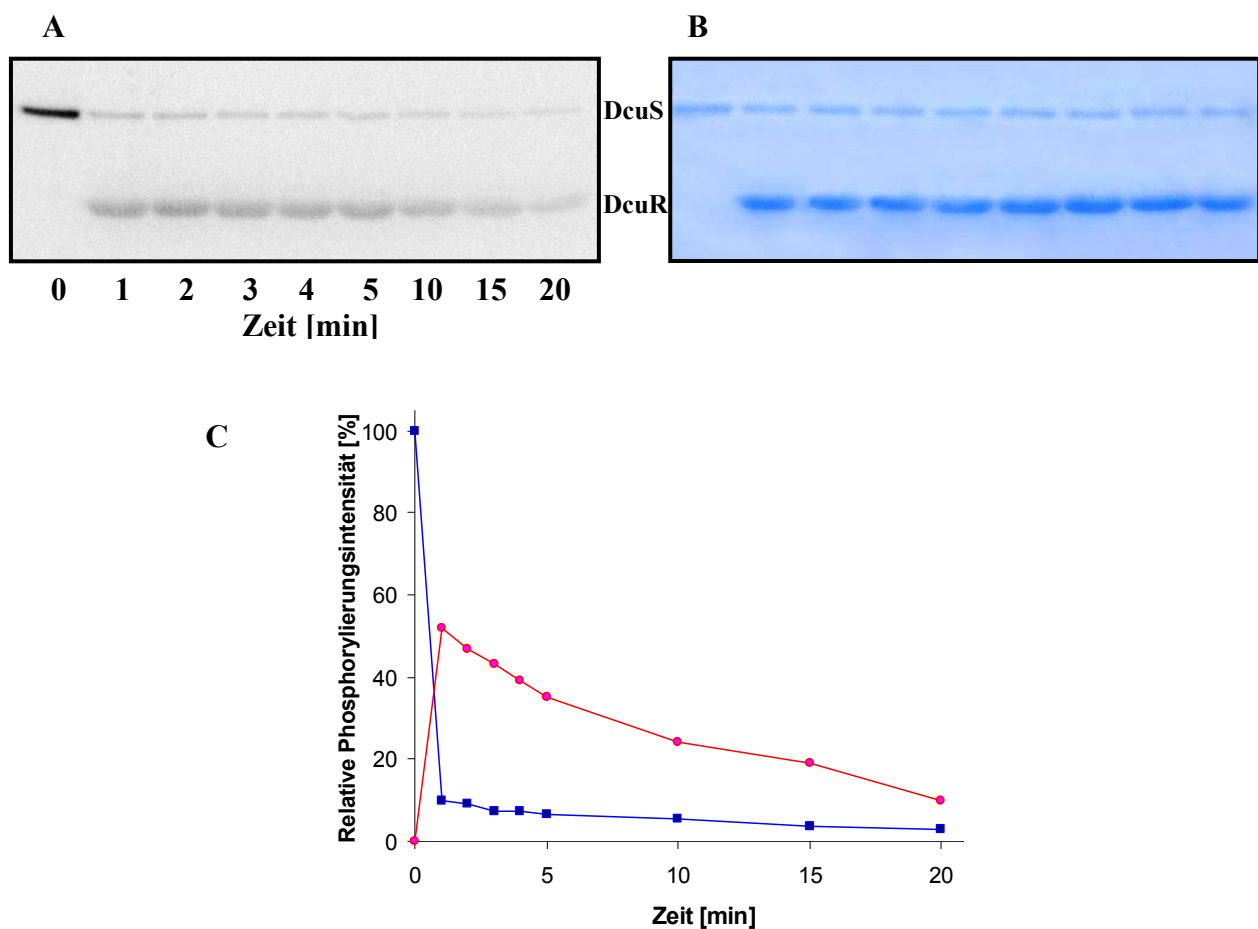


Abb. 34: Phosphattransfer von rekonstituiertem DcuS auf isoliertes DcuR. Rekonstituiertes DcuS in Phosphorylierungspuffer (50 mM TrisHCl pH 7,0, 1 mM DTT, 20 mM Fumarat, 5 mM MgCl₂) wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen vorbereitet. Die Autophosphorylierung wurde mit 0,14 µM [γ^{33} P]-ATP (110 TBq / mmol) gestartet und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor isoliertes DcuR im 4 : 1 Verhältnis (w/w) zum Zeitpunkt 0 min zugegeben wurde. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und in 2x SDS-Puffer verdünnt. (A) Phosphorimage der Phosphattransferreaktion. Die DcuS-Autophosphorylierung nach 30 min wurde zur Quantifizierung als 100 % und Zeitpunkt 0 gesetzt. (B) SDS-Gel nach Färbung durch Coomassie (C) DcuS (■) und DcuR (●) Phosphorylierungssignale wurden in Relation zur Reaktionszeit geplottet.

Dephosphorylierung von DcuR-P

Um das Zweikomponentensystem in den Grundzustand zurückzusetzen, muss der aktivierte Responseregulator dephosphoryliert werden. Es gibt dafür mehrere Möglichkeiten. So kann die intrinsische Phosphataseaktivität des Responseregulators (z.B. bei CheB und CheY) die Phosphatgruppe hydrolysieren (Hess *et al.*, 1988). Eine Dephosphorylierung ist auch über eine Phosphataseaktivität der Sensorkinasen, wie bei ArcB, KdpD und EnvZ aus *E. coli*, möglich (Igo *et al.*, 1989; Aiba *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1997; Georgellis *et al.*, 1998). Eine Phosphataseaktivität von Histidinkinasen wurde auch für FixL aus *Rhizobium meliloti*, NtrB aus Enterobakterien und MtrB aus *Corynebacterium glutamicum* beschrieben (Keener *et al.*, 1988; Lois *et al.*, 1993; Möker *et al.*, 2007). Weiterhin können, wie bei der Chemotaxis mit CheZ oder bei der Sporulation in *Bacillus subtilis*, weitere Proteine als Phosphatase wirken (Blat *et al.*, 1994; Perego *et al.*, 1998; Silversmith *et al.*, 2008). Ein Rücktransfer der Phosphatgruppe vom Responseregulator OmpR zur mutierten Histidinkinase EnvZ(N347D) ist ebenfalls beschrieben (Dutta *et al.*, 1996). Für die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung von aktivierten Responseregulatoren ist Mg^{2+} eine Voraussetzung (Weiss und Magasanik, 1988; 1990; Cho *et al.*, 2001).

Um zu untersuchen, ob DcuS oder DcuR die Phosphatase im DcuSR-System stellen, wurde DcuS für 30 min mit $[\gamma^{33}P]$ -ATP autophosphoryliert, bevor DcuR im Überschuss zugefügt wurde. DcuS wurde nach der Inkubation (1 min) von DcuR-P durch Zentrifugation bei 21.000 $\times$ g sedimentiert. DcuR-P wurde dann in dem Puffer mit und ohne DcuS-haltigen Proteoliposomen inkubiert. Wenn DcuR-P ohne Zusatz inkubiert wurde, hatte es nach 10 min über 50 % des radioaktiven Signals verloren (Abb. 35A, E). Dies deutete auf eine starke DcuR-vermittelte Dephosphorylierung hin. Generell kann die Lebensdauer von Aspartylphosphaten zwischen Sekunden und Stunden liegen (Stock *et al.*, 2000). Viele Responseregulatoren haben eine intrinsische Phosphataseaktivität und limitieren somit ihre Phosphorylierungsdauer (Hess *et al.*, 1988). Diese Dephosphorylierungsaktivität könnte für die schnelle Hydrolyse des Aspartylphosphates in DcuR verantwortlich sein.

Bei Zusatz von ADP oder ATP war der Dephosphorylierungsverlauf ähnlich (Abb. 35B, C, E). Wenn DcuS-haltige Liposomen zugegen waren, war nach 10 min nur noch 20 % des radioaktiven Signals an DcuR gebunden (Abb. 35D). Die relative Aktivität der Dephosphorylierung kann durch den Quotienten der relativen Phosphatabspaltung zu Beginn der Reaktion und der Zeit bestimmt werden. Für den Ansatz mit DcuS beträgt der Quotient 20, mit ATP 10, mit ADP 7 und ohne Zusatz 8. Dies bedeutet, dass DcuR durch DcuS mit einer höheren Geschwindigkeit dephosphoryliert wurde. Der Sensor wurde durch das

verbliebene radioaktive [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP über den Zeitverlauf zunehmend autophosphoryliert. Überraschenderweise führte dies jedoch zu keiner erneuten Phosphorylierung von DcuR. Somit zeigt das neu phosphorylierte DcuS ein anderes Verhalten, da scheinbar ein bisher unbekannter Faktor die Phosphatübertragung ändert. Der Sensor scheint trotz langsamer Autophosphorylierung die Dephosphorylierung von DcuR-P zu stimulieren. Dieses Verhalten scheint im Gegensatz zu anderen Sensorkinasen zu stehen, die im unphosphorylierten Zustand die Phosphataseaktivität stimulieren.

Insgesamt spricht die rasche Dephosphorylierung von DcuR-P für eine intrinsische Phosphataseaktivität des Regulators. Zusätzlich beschleunigt DcuS die Dephosphorylierung von DcuR-P, doch lässt sich mit den bisherigen Ansätzen noch nicht definitiv klären, ob es eine eigenständige Phosphataseaktivität des Sensors ist, oder ob die des Regulators stimuliert wurde.

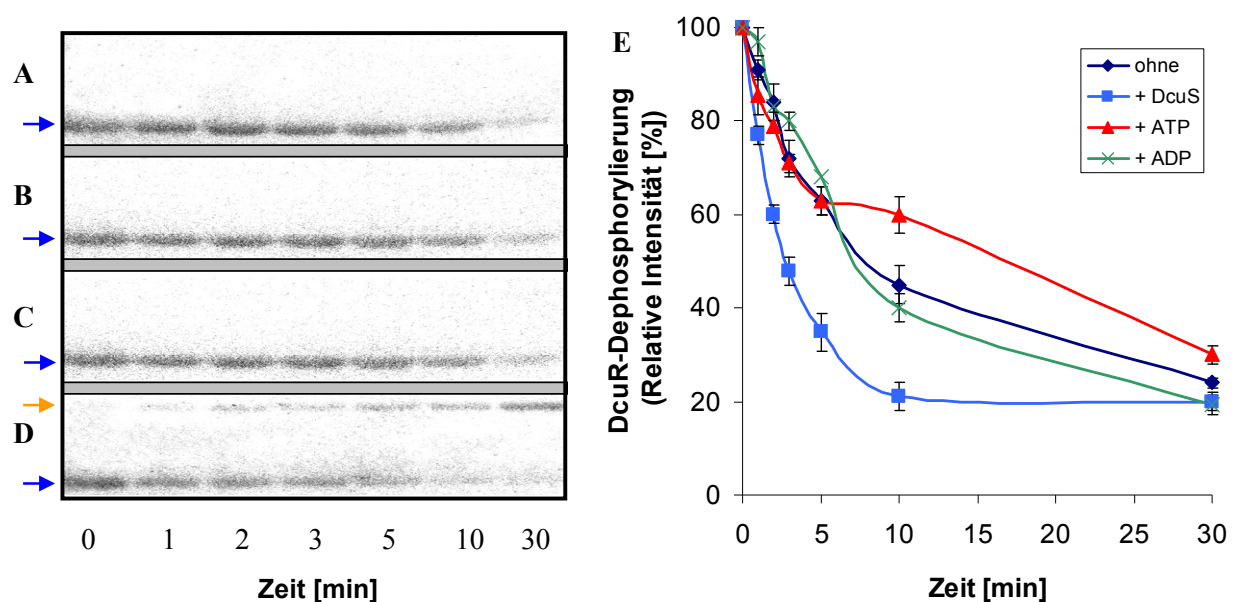


Abb. 35: Dephosphorylierung von DcuR-P. A – D: Autoradiogramme von phosphoryliertem DcuR (DcuR-P) nach Abtrennung von DcuS-Proteoliposomen. DcuR-P wurde für 30 min in Reaktionspuffer (A), unter Zugabe von 0,2 mM ATP (B), 0,2 mM ADP (C) oder 50 μg rekonstituiertem DcuS (D) inkubiert. (E) Quantifizierung des radioaktiven Signals in phosphoryliertem DcuR zu den angegebenen Zeitpunkten (Abbildungen A – D). Blaue Pfeile markieren das Signal von DcuR-P. Orange Pfeile von DcuS-P.

Um die Dephosphorylierung von DcuR-P genauer zu untersuchen, sollte DcuR-P nach der Phosphorylierungsreaktion durch Gelfiltration von verbleibendem [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP und ADP abgetrennt werden. Dazu wurde zunächst wieder radioaktiv markiertes DcuS mit DcuR inkubiert und der Sensor anschließend durch Zentrifugation sedimentiert und von DcuR-P

abgetrennt. Der Überstand mit DcuR-P, ADP und [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP und wurde sofort durch Sephadex Microspin G-25 bzw. oder MiniTrap G-25 Säulen zentrifugiert. Dadurch sollte eine schnelle Trennung der hoch- von den niedermolekularen Substanzen erzielt werden. Anschließend sollte DcuR-P, welches frei von Nukleotiden und Sensor ist, mit neuem DcuS und kaltem ATP und ADP auf veränderte Dephosphatasereaktionen hin getestet werden. Wenn DcuR-P mit dem [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP-, ADP- und Phosphat-haltigem Puffer auf die Zentrifugationssäulen aufgetragen wurden, eluierte DcuR-P weder unter normalen Bedingungen noch bei intensiver Nachelution (Abb. 36A, B, Spur 3 – 6). DcuR-P wurde in der Säule zurückgehalten und konnte nur mit SDS-Puffer aus der Säulenmatrix extrahiert werden (Abb. 36B, Spur 7 – 9). Nicht phosphoryliertes DcuR zeigte dagegen das erwartete Verhalten und eluierte von der Säule (Abb. 36A, B, Spur 2). Dies kann bedeuten, dass DcuR nach Phosphorylierung seinen Aggregationszustand ändert und in der Säule ausfällt.

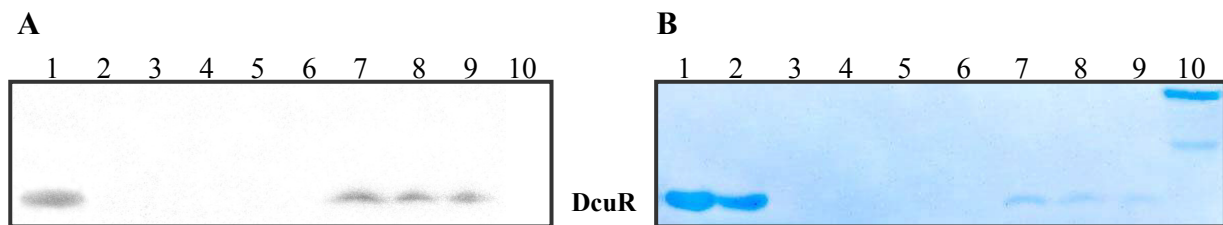


Abb. 36: Abtrennung und Isolation von phosphoryliertem DcuR (DcuR-P). Radioaktiv markiertes DcuR wurde durch Zentrifugation von rekonstituiertem DcuS abgetrennt. Verbleibendes [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP, ADP und radioaktives Phosphat sollten durch Gelfiltration (Sephadex G-25) separiert werden. (A) Autoradiogramm: Isoliertes DcuR-P mit Nukleotiden (Spur 1). Elution der Sephadex-Gelmatrix (Spur 2 – 6), Resuspendierte Sephadex-Matrix (Spur 7 – 9) (B) SDS-Gel nach Färbung durch Coomassie. Spur 10, Standardmarker.

4.7 Einfluss von CitA auf die Induktion DcuSR-regulierter Gene durch Citrat

Die Expression von *dcuB* durch C₄-Dicarboxylate wird unter anaeroben Bedingungen über die Sensorkinase DcuS stimuliert. Neben den C₄-Dicarboxylaten aktiviert auch Citrat die Induktion der Zielgene des DcuSR-Systems. *E. coli* enthält zusätzlich das Citrat-spezifische Zweikomponentensystem CitAB, welches die Gene der Citratfermentation induziert (Kaspar *et al.*, 2002). In Anwesenheit von Citrat stimuliert CitAB die Expression des *citCDEFXGT*-Clusters, codierend für die Synthese der aktiven Holo-Citrat-Lyase (*citCDEFXG*) und den Citrat/Succinat-Antiporter CitT. CitA ist eine hochspezifische und affine Citrat-Sensorkinase, mit einer ausgeprägten Homologie zu CitA aus *Klebsiella pneumoniae* (Kaspar *et al.*, 2002). In bisher unbekannter Form scheint die mit DcuS eng verwandte Sensorkinase CitA bei der Expression der Zielgene des DcuSR-Systems in Anwesenheit von Citrat beteiligt zu sein (Zientz, 2000, Tab 20). Es sollte geklärt werden, ob die Citrat-abhängige Stimulierung von *dcuB* durch DcuSR oder durch eine Interaktion mit CitAB ausgelöst wird.

Die Expression und die Antwort auf Citrat wurden in Mutanten studiert, in denen entweder der Sensor oder der Regulator von einem der beiden Systeme inaktiviert wurde (DcuS, DcuR, CitA, CitB) (Tab. 20, Zientz, 2000). Die Induktion von *dcuB* fehlte in Stämmen mit inaktiviertem DcuS oder DcuR, weshalb beide funktionell wichtig sind. Fehlt der Responseregulator *citB* ist die Aktivität der Fusion mit Fumarat und Citrat ähnlich der stimulierten Expression im Wildtyp. Hingegen führte die Inaktivierung von *citA* zu einer verringerten Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* durch Citrat. Die Induktion durch Fumarat blieb auf Wildtyp-Niveau.

Tab. 20: Effekt von DcuSR und CitAB auf die Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* durch Fumarat und Citrat. Die Effekte wurden in *E. coli* Wildtyp (IMW237) und im *dcuS*- (IMW262), *dcuR*- (IMW238), *citA*- (IMW280) und *citB*- (IMW239)-Hintergrund gemessen. Die Zucht erfolgte anaerob in eM9 mit Glucose (20 mM) und Fumarat bzw. Citrat (20 mM). Die β -Galactosidase Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen (Zientz, 2000).

	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units)				
	Wildtyp	<i>dcuS</i>	<i>dcuR</i>	<i>citA</i>	<i>citB</i>
Glucose	8	2	2	2	n.d.
Glucose + Fumarat	45	1	2	34	43
Glucose + Citrat	30	2	2	9	26

Da im *dcuS*- und im *citA*-Hintergrund die Citratinduktion fehlte, könnten beide Sensorkinasen an der Stimulation von *dcuB*'-'*lacZ* beteiligt sein. Der CitA-Effekt könnte durch DcuS/CitA-Heterodimere oder durch CitA-Homodimere, die Citrat detektieren und die Expression von *dcuB* induzieren, verursacht sein (Zientz, 2000; Krämer 2004). In DcuS/CitA-Heterodimeren könnte die CitA-Untereinheit DcuS phosphorylieren und anschließend den Phosphatrest auf DcuR übertragen. Eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Sensorkinasen und Responseregulatoren, die nicht zusammen gehören, wird als „cross-talk“ bezeichnet. Dies wäre möglich, da DcuS und CitA sehr ähnlich sind und Sensorkinasen als Homodimere vorliegen, wobei ein Monomer das andere phosphoryliert (Stock *et al.*, 1995). Cross-talk scheint allerdings artifiziell zu sein und wurde bisher nur *in vitro* unter unphysiologischen Bedingungen beobachtet (West und Stock, 2001; Bijlsma *et al.*, 2003; Laub und Goulian, 2007). Somit sind für die C₄-Dicarboxylat-abhängige Induktion von *dcuB* DcuS und DcuR erforderlich, wohingegen die Citrat-bedingte Induktion zusätzlich CitA zu benötigen scheint. Ein indirekter Einfluss von CitAB auf die Expression von *dcuSR* kann ausgeschlossen werden, da die Deletion von *citB* keinen Einfluss auf die Citrat- und Fumaratinduktion hatte.

Einfluss von spezifischen DcuS-Mutanten auf die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* mit Citrat

Um den CitA-Effekt auf die Expression von *dcuB* in Anwesenheit von Citrat näher zu charakterisieren, wurden C₄-Dicarboxylat-spezifische und eine Citrat-spezifische DcuS-Mutante getestet (Tab. 21). DcuS ist für die Stimulation durch Fumarat und Citrat essentiell (Zientz, 2000). In der Einfachmutante DcuS(F120M) und in den Doppelmutanten DcuS(T101G F120M), DcuS(T101G I125S) und DcuS(F120M I125S) konnte durch Citrat die Expression des *dcuB*-Gens nicht stimuliert werden. In der Citrat-spezifischen Dreifachmutante ist die Stimulation der Reporterexpression durch Citrat ähnlich dem Wildtyp-Niveau (Krämer *et al.*, 2007).

Im CitAB-Wildtyp hängt die Induktion von *dcuB*'-'*lacZ* durch Citrat von DcuSR ab und spiegelt deshalb veränderte Eigenschaften von DcuS wider (Tab. 20 und 21). Aus diesem Grund ist die veränderte *dcuB*-Expression in den spezifischen DcuS-Mutanten auf die gerichteten Mutagenesen zurückzuführen. Die Citratinduktion von *dcuB* fehlt in der DcuS-Insertionsmutante und den DcuS-Einzel- und Doppelmutanten. Somit kann das Modell, in dem CitA als Homodimer DcuR phosphoryliert, ausgeschlossen werden.

DcuS/CitA-Heterodimere können bisher nicht ausgeschlossen werden. Zwar hätten die DcuS-Einfach- und Doppelmutanten aktiv sein sollen, doch könnte die fehlende Citrat-Aktivierung von *dcuB* an veränderten Interaktionen zwischen DcuS und CitA liegen. Dies würde

allerdings bedeuten, dass Citrat im Heterodimer von beiden Sensoren erkannt werden müsste. Weiterhin konnte in Versuchen mit einer *dcuB*-Deletionsmutante gezeigt werden, dass die *dcuB*-Expression in Abwesenheit von C₄-Dicarboxylaten und Citrat maximal induziert ist (Tab. 15). Dies würde mit den bisherigen Ergebnissen eine Interaktion von DcuB mit DcuS/CitA-Heterodimeren andeuten.

Tab. 21 Effekt von Fumarat- und Citrat-spezifischen DcuS-Mutanten auf die DcuS-abhängige Induktion von *dcuB*'-'*lacZ*. Der Einfluss von Plasmid-codierten und spezifischen DcuS-Mutanten wurde in der *E. coli* *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 (*dcuB*'-'*lacZ*) gemessen. Die Zellen wurden anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat und Citrat (20 mM) gezüchtet und bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 wurde die β-Galactosidase-Aktivität gemessen.

Stamm	Proteinmutation	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β-Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a		
		Ohne	+ Fumarat	+ Citrat
IMW260 (<i>dcuS</i>)	<i>dcuS</i> -Insertionsmutante	10 ± 1	7 ± 3	5 ± 1
IMW260 (p <i>dcuS</i>)	DcuS-Wildtyp	17 ± 4	189 ± 25	89 ± 20
IMW260 (pMW344)	DcuS(T101G)	3 ± 1	210 ± 23	13 ± 3
IMW260 (pMW368)	DcuS(F120M)	5 ± 1	5 ± 3	5 ± 3
IMW260 (pMW351)	DcuS(T101G F120M)	3 ± 1	2 ± 1	3 ± 3
IMW260 (pMW369)	DcuS(T101G I125S)	7 ± 1	12 ± 3	6 ± 3
IMW260 (pMW390)	DcuS(F120M I125S)	2 ± 1	2 ± 1	4 ± 1
IMW260 (pMW353)	DcuS(T101G F120M I125S)	5 ± 1	1 ± 1	58 ± 2

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

Effekt von C₄-Dicarboxylat- und Citrat-spezifischen DcuS-Mutanten auf die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* in *citA*-Insertionsmutanten

Um den Effekt von CitA auf die Expression der DcuSR-regulierten Gene detailliert zu untersuchen, wurde in dem *citA*- und *dcuS*-defizienten Stamm IMW294 eine *dcuB*'-'*lacZ*-Reportergenfusion durch λRZ5 transduziert (Müller, 2007). In dem resultierenden Stamm IMW543 sollten die C₄-Dicarboxylat- und Citrat-spezifische DcuS-Mutanten (Krämer *et al.*, 2007) auf ihren Effekt nach Zucht mit Fumarat und Citrat getestet werden. Aufgrund der Kanamycin-Interferenz der verwendeten *dcuS*-Plasmide (pET28a-Derivate, *kan*^R) und dem Stamm IMW543 (*citA::kan*^R) wurden die spezifischen DcuS-Mutanten in pACYC-Plasmide eingeführt (pMW543 mit DcuS(T101G F120M I125S), pMW545 mit DcuS(I125S) und pMW546 mit DcuS(F120M I125S), Müller, 2007). Somit kann die Aktivität der Reportergenfusion *dcuB*'-'*lacZ* nach Zucht in eM9 mit Glycerin und DMSO in *citA*-freiem

Hintergrund in Kombination mit spezifischen DcuS-Mutanten gemessen werden (Abb. 37).

Im Wildtyp ist die β -Galactosidase-Aktivität durch Zugabe von Fumarat und Citrat deutlich erhöht, wobei Fumarat um Faktor 2 stärker induziert als Citrat. Im *citA*-defizienten Stamm mit Wildtyp-DcuS war die *dcuB*-Aktivität mit beiden Effektoren ähnlich stark stimuliert. In der C₄-Dicarboxylat-spezifischen Mutante DcuS(I125S) ist keine *dcuB*-Aktivität durch Zugabe von Citrat messbar und Fumarat stimuliert vergleichbar mit Wildtyp-CitA. Die Doppelmutante DcuS(F120M I125S) war sowohl nach Zucht mit Fumarat als auch Citrat inaktiv. Die Citrat-spezifische Triplemutante DcuS(T101G F120M I125S) ist mit Fumarat nicht stimulierbar, hingegen war mit Citrat eine starke *dcuB*-Aktivierung nachweisbar. Verdeutlicht wird dies durch den Quotient der Citrat-induzierten und nicht-induzierten *dcuB*'-*lacZ*-Aktivität von 360.

Dieses Ergebnis schließt bisher eine Beteiligung des CitAB-Systems an der Expression DcuSR-regulierter Gene aus, da in der *citA*-Mutante mit Citrat-spezifischem DcuS eine erhöhte Induktion mit Citrat vorliegt. Für genauere Analysen müsste ein System etabliert werden, in dem *citA* über eine andere Resistenz inaktiviert wird. Somit könnten aus Gründen der Vergleichbarkeit und des besseren Wachstums die üblichen pET28a-Derivate mit DcuS und DcuS-Mutanten verwendet werden.

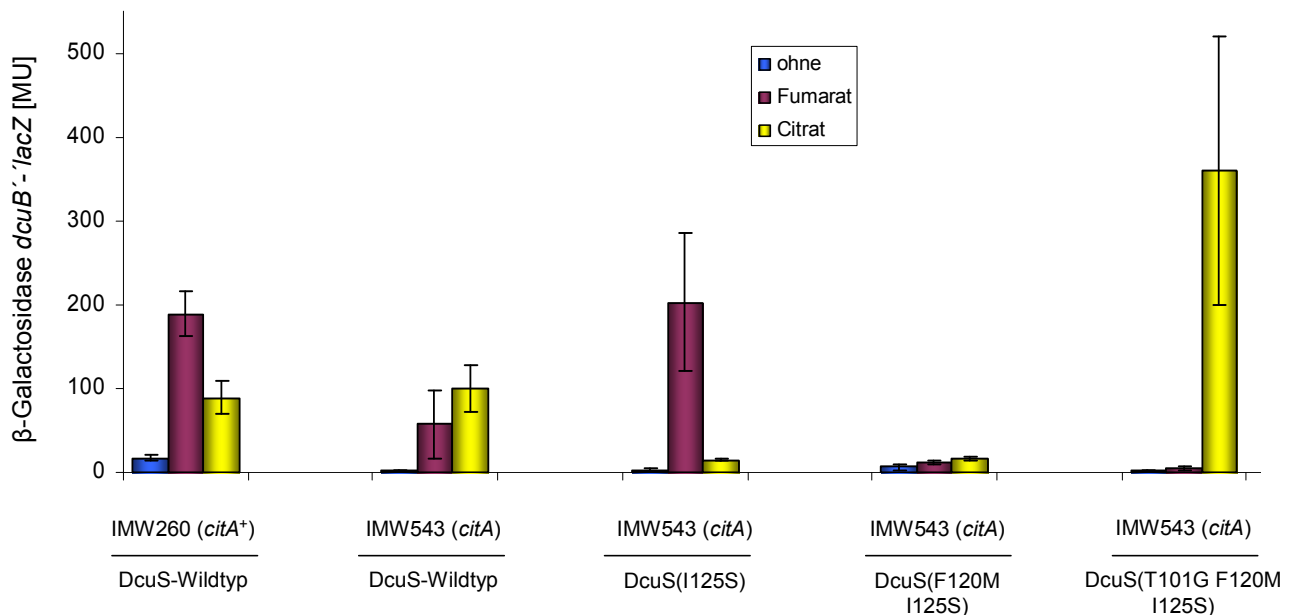


Abb. 37: Einfluss einer *citA*-Mutante in Kombination mit spezifischen DcuS-Varianten auf die *dcuB*-Expression. Der *dcuS*- und *citA*-Insertionsstamm IMW543 (*dcuB*'-*lacZ*) wurde mit C₄-Dicarboxylat- und Citrat-spezifischen Mutanten transformiert und in eM9 mit Glycerin (50 mM), DMSO (20 mM) und den Effektoren Fumarat und Citrat (20 mM) gezüchtet. In der exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 0,5 – 0,8) wurde die β -Galactosidase-Aktivität (*dcuB*'-*lacZ*) gemessen. Die Standardabweichung berechnet sich aus sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen.

5. Diskussion

Erkennung von Citrat durch die C₄-Dicarboxylat-Bindestelle von DcuS

E. coli kann C₄-Dicarboxylate (Fumarat, Succinat und Malat) als Kohlenstoff- und Energiequelle im aeroben und anaeroben Wachstum verwenden. Unter anaeroben Bedingungen werden die Gene der Fumaratatmung in Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten durch das Zweikomponentensystem DcuSR induziert. Die C₄-Dicarboxylate werden über die periplasmatische Domäne von DcuS detektiert. Dafür gibt es inzwischen mehrere unabhängige Hinweise.

Mutationen von essentiellen Resten in der periplasmatischen Domäne von DcuS (z.B. R107A, H110A) führen zu Varianten, in denen die Zielgene (*dcuB'*-*'lacZ*) nicht mehr induziert werden. Außerdem kann DcuS isoliert und in Liposomen rekonstituiert werden. Die Autophosphorylierung von rekonstituiertem DcuS wird um Faktor 2 – 5 durch C₄-Dicarboxylate stimuliert (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005). Des Weiteren ist die DcuS-abhängige Genregulation unabhängig vom Transport (Golby *et al.*, 1999). In Übereinstimmung damit wird auch Maleinat, das ein starker Induktor der Zielgene von DcuS ist, nur mit einer niedrigen Transportrate aufgenommen (Zientz *et al.*, 1998; Lux, 2007). Diese Punkte unterstützten die Auffassung, dass die periplasmatische Domäne von DcuS die Bindestelle der C₄-Dicarboxylate darstellt. Dies stimmt mit Studien zur direkten Wechselwirkung der periplasmatischen Domäne von CitA mit Citrat überein (Gerharz *et al.*, 2003; Reinelt *et al.*, 2003). Mit isolierten Kinase- und PAS-Kinase-Domänen wurde die hohe Aktivität der Autophosphorylierung von DcuS durch C₄-Dicarboxylate nicht gesteigert (Abo-Amer *et al.*, 2004). Aufgrund der hohen Autophosphorylierungsaktivität wurde gefolgert, dass die periplasmatische Domäne die Kinaseaktivität in Abwesenheit von C₄-Dicarboxylaten inhibiert. Außerdem konnte durch Mutagenese die Fumaratbindestelle auf der periplasmatischen Domäne eingegrenzt werden (Janausch *et al.*, 2004; Kneuper *et al.*, 2005). Alle Aspekte zusammen sprechen eindeutig für die Detektion von C₄-Dicarboxylaten durch DcuS im Periplasma.

DcuS fungiert ebenfalls als Sensor für Citrat mit einem app. K_D von 7 mM, der nur geringfügig über dem für C₄-Dicarboxylate liegt (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005). Die Bindung von Citrat benötigt dieselbe Bindestelle und Liganden, die auch für die Bindung von C₄-Dicarboxylaten erforderlich sind. Dies sind die Liganden-Bindestellen C1 (F149), C2 (R107), C3 (H110) und H (R147). Für die Erkennung von Citrat sind die zentrale und eine

distale Carboxylgruppe des Moleküls essentiell. Hingegen reichen die beiden seitlichen Carboxylgruppen, wie bei dem strukturell verwandten Glutarat, für eine Antwort nicht aus. Die Bindestellen C2 (R107) und C3 (H110) in DcuS sind vermutlich aufgrund ihrer konservierten Reste die beiden Bindestellen der zwei essentiellen Carboxylgruppen von Citrat (und der C₄-Dicarboxylate). Die Bindestellen C1 und H haben möglicherweise andere Funktionen (Kneuper *et al.*, 2005). Somit zeigen die Mutagenese-Experimente, dass für die Erkennung von Citrat und C₄-Dicarboxylaten die gleichen Liganden von DcuS erforderlich sind. Entsprechend ist in Citrat der C₄-Dicarboxylat-Anteil entscheidend für die Reaktion mit DcuS. Deshalb werden Citrat und C₄-Dicarboxylate über die gleichen Bindestellen und in gleicher Weise in DcuS detektiert. Die Citratbindung in CitA (*K. pneumoniae*) dagegen benötigt alle drei Carboxyl-Bindestellen (C1, C2, C3) und die Hydroxyl-Bindestelle (H) des Proteins und ist deshalb von der Citraterkennung durch DcuS verschieden.

Die dritte (distale) Carboxylgruppe von Citrat wird scheinbar für die Erkennung durch den Sensor nicht benötigt, wird aber in der Bindetasche toleriert. Dies wird durch die Ähnlichkeit von Citrat mit Mesaconat und durch die Optimierung der Citratspezifität durch Mutationen in den Bindestellen C1 und C2 deutlich. Deshalb könnte die dritte Carboxylgruppe in Nähe zu der weniger konservierten Stelle C1 sein, welche die Bindetasche vergrößert. Die Mutationen und die Effektorstudien zusammen lassen vermuten, dass das DcuS-Protein Citrat als C₄-Dicarboxylat (mit einer Acetylgruppe) detektiert. Mit der Dreifachmutante DcuS(T101G F120M I125S) wurde eine Citrat-spezifische Mutante generiert. Die Citraterkennung dieser Mutante ist von der Citratbindung in CitA zu unterscheiden und erinnert in der Art der Substraterkennung und –spezifität aufgrund der Detektion von Mesaconat (= 2-Methylfumarat), eher an die Spezifität von DcuS. CitA dagegen ist spezifisch für Citrat und benötigt die Stellen C1, C2, C3 und H für die Detektion von Citrat und erkennt keine anderen Substrate (Kaspar *et al.*, 1999). In der Dreifachmutante von DcuS sind die Bindestellen C1 und im geringen Umfang C2 modifiziert und ergeben vermutlich eine optimierte Bindestelle an C1. Dies ermöglicht die Bindung von Citrat als C₄-Dicarbonsäure mit einem großen hydrophoben Rest (-CH₂-COOH) und von Mesaconat (-CH₃), welches ebenfalls eine C₄-Dicarbonsäure mit einer großen Seitengruppe darstellt.

Möglichkeiten der Generierung von C₄-Dicarboxylat- und Citrat-spezifischen DcuS-Formen

C₄-Dicarboxylat-spezifisches DcuS_{DC} kann über verschiedene Wege generiert werden. Der erste und paradoxe Weg ist die Anpassung der Carboxylat-Liganden von DcuS an die von

CitA, der zweite durch die Optimierung des Zugangs zur Bindetasche wie z.B. in der Mutante DcuS(Q159V). Auf diesem Weg wurde DcuS auf Sequenzebene zu einem CitA-adaptierten Protein. Überraschenderweise resultierten die Veränderungen einzelner Reste (T101, I125, F141, F149K, Q159) in C₄-Dicarboxylat-Spezifität bei gleichzeitigem Verlust der Citratsensitivität. Im Unterschied dazu konnte Citrat-spezifisches DcuS nur durch ein Vergrößern der Bindetasche um die Stellen C1 und C2 durch kombinierte Mutation von drei Resten (T101G F120M I125S) erreicht werden. Dies unterstützt die Ansicht, dass Citrat durch DcuS ähnlich wie C₄-Dicarboxylate gebunden wird, wobei der verbleibende Acetylrest durch die optimierte und vergrößerte Bindetasche toleriert wird (Abb. 38). Diese Modifikationen erlauben zusätzlich die Bindung des sperrigen Methylrestes in Mesaconat (= 2-Methylfumarat). Strukturuntersuchungen sind aufgrund der Labilität der isolierten periplasmatischen Domäne von DcuS schwierig. Die Präparationen der mutierten Formen von DcuS resultieren in entfalteten und aggregierten Proteinen, wie hier und in früheren Studien (Kneuper *et al.*, 2005) gezeigt.

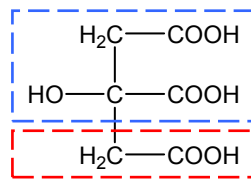


Abb. 38: Citrat wird von DcuS vermutlich als C₄-Dicarbonsäure (blauer Rahmen) erkannt, wobei der Acetylrest (roter Rahmen) toleriert wird.

DcuS als Malatsensor?

DcuS erkennt C₄-Dicarboxylate und Citrat *in vivo* mit relativ hohen app. K_D-Werten von 0,5 – 7 mM (Kneuper *et al.*, 2005). In der Citrat-spezifischen Mutante DcuS_{Cit} ist der app. K_D (14 mM) vergleichbar mit dem Wildtyp (Krämer, 2004). Sowohl in den C₄-Dicarboxylat- als auch in den Citrat-spezifischen DcuS-Mutanten stimuliert Malat als guter Effektor die Expression des Zielgens *dcuB*. Malat ist damit der einzige gemeinsame Effektor der spezifischen DcuS-Mutanten. Möglicherweise verfügt Malat über Eigenschaften, die bei der Erkennung von C₄-Dicarboxylaten und Citrat gemeinsam sind. Damit könnte Malat das bevorzugte Substrat von DcuS sein. Strukturell ist Malat als C₄-Dicarboxylat mit einer Hydroxylgruppe ein Element von Citrat (Abb. 39). Dies würde erklären, warum DcuS neben C₄-Dicarboxylaten auch Citrat erkennt und unterstützt die Vermutung, dass Malat das favorisierte Substrat von DcuS ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass das Operon *dcuSR* in unmittelbarer

Nachbarschaft zu den Genen *dcuB* und *fumB* liegt. DcuB transportiert Malat (und andere C₄-Dicarboxylate) im Antiport gegen Succinat. FumB ist die anaerobe Fumarase des Malatstoffwechsels und generiert über die Abspaltung von Wasser den Elektronenakzeptor Fumarat.

Wenn Malat das eigentliche Substrat von DcuS darstellt, ist der app. K_D-Werte für Malat möglicherweise niedriger als der für andere C₄-Dicarboxylate. Bislang ist eine Bestimmung *in vivo* nicht möglich, da Malat (wie auch Fumarat) in kleinen Mengen schnell verstoffwechselt wird. Andere C₄-Dicarboxylate ohne Hydroxylgruppe wie z.B. Succinat und Aspartat sind schlechte Substrate (app. K_D-Werte 2 – 3 mM). Citrat ist ebenfalls ein schlechter Effektor (app. K_D 7 mM). Zwar ist die Hydroxylgruppe in Citrat wie auch in Malat vorhanden, doch scheint der Acetylrest die Bindung zu stören.

Ein weiterer Aspekt unterstützt die Ansicht, dass Malat das natürliche Substrat von DcuS ist. D-Tartrat ist ein guter Effektor von DcuS (Kneuper *et al.*, 2005). DcuB transportiert D-Tartrat ins Zellinnere, über die Fumarase B wird es zu Oxalacetat dehydratisiert und anschließend über Malat zu Fumarat umgewandelt (Kim *et al.*, 2007). D-Tartrat ist ein Strukturanalogue von Malat, da in beiden der Ligand an C2 in der S-Konfiguration vorliegt. Deshalb kann die Erkennung von D-Tartrat durch DcuB und Fumarase B durch die gleiche Stereochemie von D-Tartrat und dem physiologischen Substrat L-Malat erklärt werden.

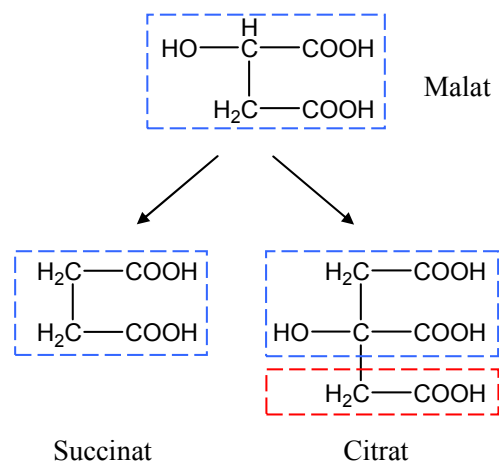


Abb. 39: Malat als Substrat von DcuS. DcuS erkennt C₄-Dicarboxylate (z.B. Succinat) und Citrat. Der Molekülbereich von C₄-Dicarboxylaten ist blau umrahmt, der Acetylrest von Citrat ist rot umrahmt.

Phylogenetische Verwandtschaft zwischen DcuS und CitA

Die Proteinsequenzen der periplasmatischen Domänen von DcuS und CitA wurden mittels dem Datenbank-Suchprogramm PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) verglichen und mit der JAVA-Anwendung CLANS (Frickey *et al.*, 2004) in Clustern erschlossen (Kooperation mit der AG Lupas, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen). Das Clustering mit einem E-value cut-off von 10^{-3} ergab eine zentrale Gruppe mit DcuS, CitA und orthologen Proteinen (Abb. 40). Die nächsten paralogen Gruppen sind die DctB und CreC Histidinkinasen, Diguanylat-Cyclasen und Chemorezeptoren mit periplasmatischen Domänen aus Tandem-PAS-Domänen.

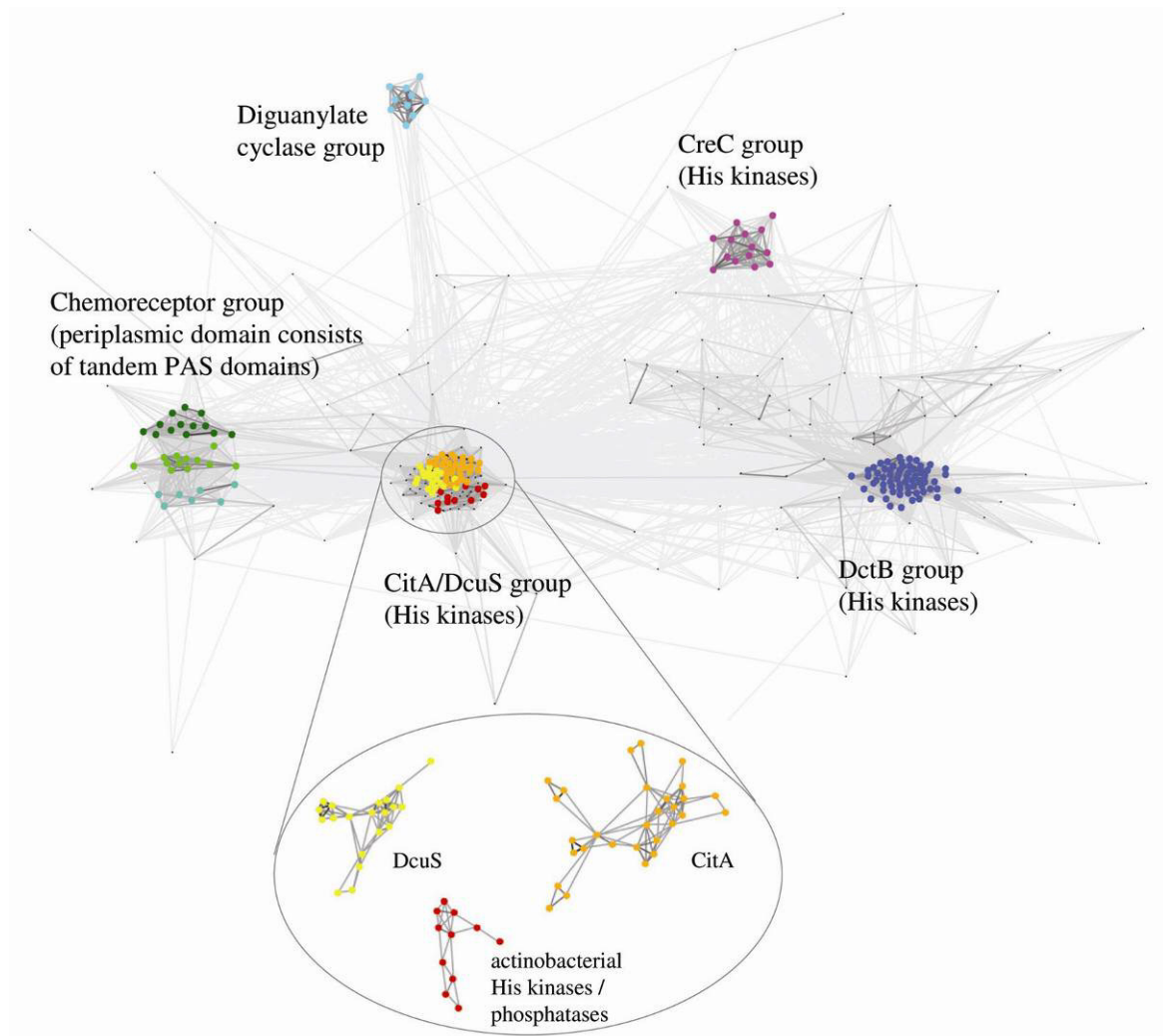


Abb. 40: Cluster-Analyse von DcuS- und CitA-homologen Proteinen. Die Sequenzen wurden durch Ähnlichkeiten der periplasmatischen Domänen von DcuS und CitA identifiziert. Die Cluster sind entsprechend der vermutlichen Hauptaktivität ihrer Mitglieder benannt. Die meisten Cluster bestehen allerdings nicht aus nur einem Typ. Auffällenderweise verfügt die Gruppe der Chemorezeptoren über zwei Subcluster mit Chemorezeptoren und einer Gruppe Histidinkinasen (cyan) und einigen Diguanylat-Cyclasen. Das Cluster mit DcuS und CitA ist durch erneutes Clustern in zwei Subclustern dargestellt.

Eine genaue Untersuchung multipler Alignments der individuellen Gruppen zeigte, dass Proteine im phylogenetisch tiefsten Zweig der DcuS/CitA-Gruppe, eine vermutliche Histidinkinase aus Actinobakterien, keine polaren oder geladenen Reste an Stelle C1 haben und deshalb eher DcuS ähneln. Die nächste paraloge Gruppe zu DcuS und CitA ist die Chemorezeptor-Gruppe. Diese ähnelt wiederum stärker DcuS als CitA. Diese Beobachtungen implizieren, dass die polaren Reste an C1 von CitA einen abgeleiteten Phänotyp darstellen und lassen vermuten, dass die hochaffine und spezifische Bindestelle von CitA von einer unspezifischen und weniger affinen Sensorkinase ähnlich wie in DcuS abstammen.

Der Antiporter DcuB als akzessorischer Sensor in der DcuSR-abhängigen Regulation

Unter anaeroben Bedingungen werden in *E. coli* die Gene der Fumaratatmung durch das Zweikomponentensystem DcuSR in Anwesenheit von Fumarat und anderen C₄-Dicarboxylaten reguliert. Die Erkennung des Reizes erfolgt dabei über die periplasmatische Domäne von DcuS. Die Bindestelle wurde dabei, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, durch Strukturuntersuchungen, Mutationsanalysen und Studien mit DcuS in Liposomen charakterisiert (Janausch *et al.*, 2002; Pappalardo *et al.*, 2003; Kneuper *et al.*, 2005). Die periplasmatische Domäne besteht aus vier β -Faltblättern mit einer antiparallelen Anordnung, in der sich die essentiellen Reste R107, H110, R147 und F149 zur Substraterkennung befinden. Die Autokinaseaktivität von in Liposomen rekonstituiertem DcuS kann durch C₄-Dicarboxylate stimuliert werden und ist somit ein weiteres Argument für die Substraterkennung von DcuS im Periplasma (Janausch *et al.*, 2002; Kneuper *et al.*, 2005). Obwohl DcuS und DcuR ein komplettes System zur Erkennung von C₄-Dicarboxylaten und der Regulation der Genexpression zum anaeroben Wachstum durch Fumaratatmung bilden können, wurde bereits gezeigt, dass der Carrier DcuB als akzessorischer Sensor an der Regulation der DcuSR-abhängigen Gene beteiligt ist (Kleefeld, 2006).

Der sekundäre Carrier DcuB ist in der Fumaratatmung der wichtigste Fumarat/Succinat-Antiporter und hat neben seiner Funktion als Transporter die Funktion eines Co-Sensors für das DcuSR-System. So beeinflusst DcuB die Expression des Zielgens *dcuB* und weiterer DcuSR-regulierter Gene. Dieser Effekt ist spezifisch für DcuB und kann mit den anaeroben Dicarboxylat-Carriern DcuA und DcuC nicht beobachtet werden. Der Wildtyp benötigt für die Stimulation der DcuSR-abhängigen Gene C₄-Dicarboxylate, wohingegen in einer DcuB-

Deletionsmutante die Gene bereits in Abwesenheit von Effektoren induziert sind. Somit ist DcuB an der Sensorfunktion von DcuSR maßgeblich beteiligt.

Es stellte sich die Frage, wie DcuB als zweiter Sensor für Fumarat fungiert. Der Effekt von DcuB ist unabhängig vom Transport, da die alternativen Carrier DcuA und DcuC den anaeroben Antiport von Succinat und Fumarat während der Fumaratatmung übernehmen können. Somit scheint ein veränderter Stoffwechsel nicht der Auslöser des Effektes von DcuB auf das DcuSR-System zu sein. Diese Ansicht wurde durch die Identifikation der regulatorisch wichtigen DcuB-Mutanten T394I und D398N unterstützt, da hier die Transport- von der Regulationsfunktion getrennt vorliegt (Kleefeld, 2006). In beiden Mutanten ist der Transport von C₄-Dicarboxylaten durch DcuB möglich, jedoch ist die *dcuB*-Expression ohne C₄-Dicarboxylate induziert, ähnlich wie in der DcuB-Deletionsmutante.

Es wird vermutet, dass die Wechselwirkung zwischen DcuB und DcuS über eine direkte Interaktion stattfindet, welche aber mit bakteriellen Two-Hybrid-Systemen und FRET-Messungen bisher nicht nachgewiesen wurde. Fusionen zwischen DcuB und den Proteinen bakterieller Two-Hybrid-Systeme und den Derivaten des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) für FRET-Messungen sind, vermutlich wegen der starken Hydrophobizität von DcuB inaktiv (Kleefeld, Scheu, Erker, Basché, Unden, unveröffentlicht). Diese Untersuchungen sind zusätzlich durch die unbekannte Topologie von DcuB in der Membran erschwert.

Dennoch gibt es Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen dem Sensor und dem Transporter. Der durch DcuB bedingte Effekt auf die Expression von *dcuB'*-*'lacZ* ist nur in einem Hintergrund zu sehen, in dem der Sensor DcuS und der Regulator DcuR vorliegen (Kleefeld, 2006). Wurden die essentiellen Reste zur Substraterkennung von DcuS mutiert, findet die konstitutive Expression von *dcuB'*-*'lacZ* auch in der DcuB-Deletionsmutante nicht mehr statt. Dies bestätigt zusätzlich die Abhängigkeit des DcuB-Effektes von DcuS. Der Effekt von *dcuB* ist in spezifischen DcuS-Mutanten (DcuS_{DC}, DcuS_{Cit}) verändert. Bei Abwesenheit von DcuB ist die Citrat-spezifische Mutante DcuS(T101G F120M I125S) nicht mehr sensitiv für Effektoren und in der C₄-Dicarboxylat-spezifischen DcuS-Variante DcuS(T101G) ist die Expression von *dcuB'*-*'lacZ* nicht mehr konstitutiv. Dies sind Hinweise darauf, dass DcuB und DcuS in der Regulation gegenseitig voneinander abhängen. Dies ist am einfachsten durch direkte Interaktion zu erklären.

DcuB stellt somit einen zusätzlichen Sensor zur Erkennung von C₄-Dicarboxylate im DcuSR-System dar. Frühere Studien deuteten bereits an, dass es noch einen weiteren Faktor bei der Signalerkennung durch das DcuSR-System geben muss. So wurde die Kinaseaktivität von DcuS in Liposomen durch Fumarat um den Faktor 3 – 5 stimuliert (Janausch *et al.*, 2002). In

einer detaillierten Studie wurde die Autokinaseaktivität von DcuS durch C₄-Dicarboxylate nur um Faktor 2 *in vitro* stimuliert, wohingegen die *dcuB*'-*lacZ*-Expression *in vivo* um Faktor 10 – 20 stimuliert wurde (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Kneuper *et al.*, 2005). Dies unterstützt die bisherigen Vermutungen, dass DcuB ein akzessorischer Sensor ist, da isoliertes und in Liposomen rekonsituiertes DcuS ohne den Transporter auch in Abwesenheit von Effektoren in einem aktivierten Zustand vorlag. So zeigt DcuS in Liposomen bereits ohne C₄-Dicarboxylate eine vergleichsweise hohe Kinaseaktivität (Möker *et al.*, 2007). Nach diesen Vorstellungen würde das Fehlen von DcuB in Liposomen bereits die aktive Konformation von DcuS hervorrufen, die durch Effektoren nur noch geringfügig stimuliert wird.

Modell zur Interaktion zwischen DcuB und DcuS

DcuS scheint in Abwesenheit des Carriers DcuB bereits in einem aktiven Zustand zu sein. Aus diesen Daten wurde ein Modell konstruiert, in dem DcuB und DcuS durch eine direkte Wechselwirkung interagieren (Kleefeld, 2006, Abb. 41). Die Expression von *dcuB* ist in Abwesenheit von C₄-Dicarboxylaten nicht komplett inhibiert und deshalb wird *dcuB* immer in geringem Umfang exprimiert. Das verbleibende DcuB ist in einem Transport-inaktiven Zustand und interagiert mit DcuS. Diese Interaktion resultiert in der Hemmung von DcuS und somit einer fehlenden Phosphorylierung von DcuR, wodurch die Genexpression nicht stimuliert wird. Wenn C₄-Dicarboxylate vorliegen, werden diese über den Sensor und den Transporter detektiert. Der Transporter wechselt in den Transport-aktiven Zustand, in dem er mit DcuS nicht mehr interagiert. DcuS wird dann nicht mehr inhibiert und kann über die Kinaseaktivität die Expression der Zielgene stimulieren. Fehlt der Transporter DcuB oder sind die regulatorisch inkompetenten Reste T394I und D398N in DcuB mutiert, erfolgt generell keine Hemmung von DcuS, und DcuS ist auch ohne Effektoren in einem aktiven Zustand.

Dieses Modell wird durch spezifische DcuS-Mutanten mit einer geänderten Antwort auf den DcuB-Effekt unterstützt. In den spezifischen DcuS Mutanten (DcuS_{DC} und DcuS_{Cit}) ist die Antwort auf den DcuB-Effekt abgeändert. Die Citrat-spezifische Mutante DcuS(T101G F120M I125S) ist nicht mehr sensorisch aktiv und die Fumarat-spezifische Mutanten DcuS(T101G), DcuS(I125S), DcuS(F141S) und DcuS(F149K) sind durch Fumarat stimulierbar. Zusätzlich sind die letztgenannten Mutanten nicht mehr konstitutiv aktiv, trotz der DcuB-Nullmutante.

Somit verfügt DcuS über zwei unabhängige Signaleingangsstellen, eine für die positive Regulation durch die Bindung von Effektoren (C₄-Dicarboxylate) und eine für die negative Regulation durch DcuB (in Abwesenheit von Effektoren). Der negative Effekt von DcuB

könnte sich hemmend auf die Kinaseaktivität auswirken, oder eine Phosphataseaktivität in DcuS aktivieren. Der regulatorisch wichtige Wechsel von Kinase- zur Phosphataseaktivität ist für einige Histidinkinasen in Abhängigkeit von Stimuli bekannt (Hsing *et al.*, 1998; Jung und Altendorf, 1998; Pioszak und Ninfa, 2003).

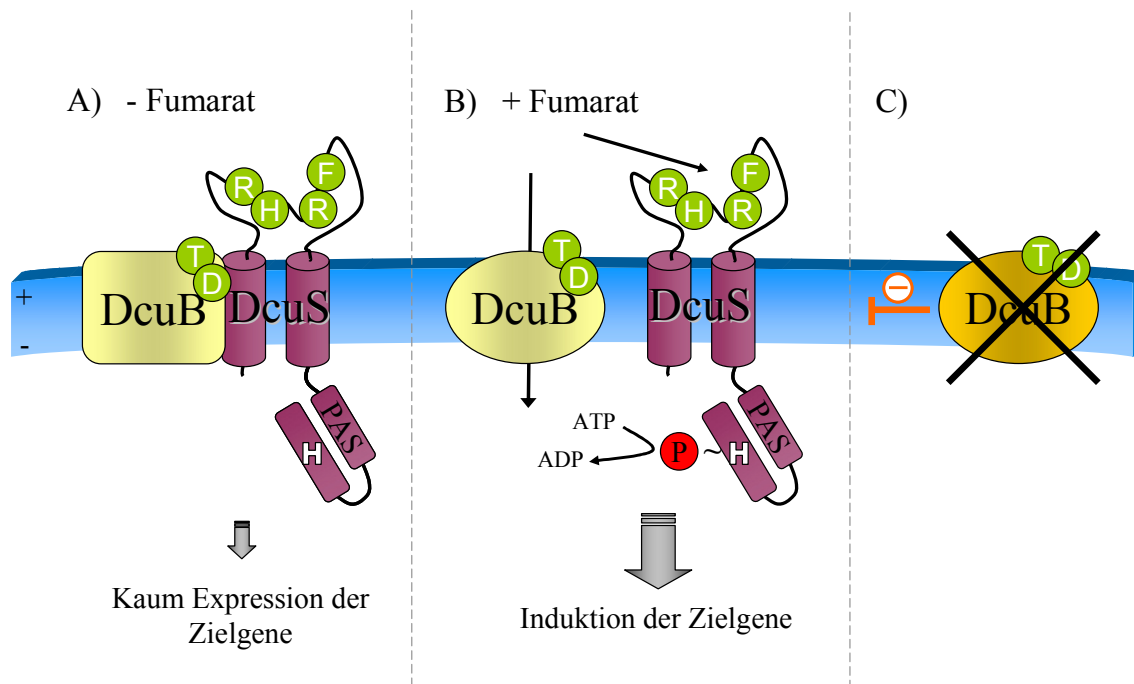


Abb. 41: Modell der Interaktion zwischen DcuB und DcuS (A – C). In Abwesenheit von C₄-Dicarboxylaten interagiert DcuB mit DcuS und inhibiert den Sensor. Die Zielgene werden nur schwach exprimiert (A). Die Anwesenheit von Substrat wird von DcuS und DcuB erkannt und verursacht möglicherweise Konformationsänderungen. In diesem Fall wird die Interaktion aufgehoben und DcuS ist nicht mehr inhibiert. Die Effektorbindung aktiviert die Kinase und dadurch die Expression der Zielgene (B). Wenn DcuB fehlt oder die regulatorischen Reste mutiert sind (DcuB T394I oder D398N) ist DcuS nicht gehemmt und die Zielgene werden ohne Effektor exprimiert (C). Die regulatorischen Reste (T394, D398) von DcuB und ihre ungefähre Lage in der Nähe oder im Periplasma sind eingezeichnet. Die ungefähren Positionen der C₄-Dicarboxylat-Bindestelle von DcuS (Reste R107, H110, R147, F149) sind angegeben. Gezeigt ist nur ein Monomer des vermutlich homodimeren DcuS. (Abbildung abgeändert nach Kleefeld, 2006). PAS = Per-Arnt-Sim-Domäne; H = konservierter Histidinrest von DcuS

Die physiologische Signifikanz einer doppelten Regulation von DcuS durch denselben Effektor (Fumarat) könnte folgendermaßen begründet sein. DcuS detektiert die Konzentration an C₄-Dicarboxylaten im Periplasma in einem statischen Prozess. DcuB hingegen erkennt den Transport und den Stoffwechsel von C₄-Dicarboxylaten und somit einen dynamischen Prozess. Diese Möglichkeit der Kontrolle über den Stoffwechsel scheint direkter und wichtiger zur Kontrolle des Stoffwechsels zu sein als die rein statische Detektion von C₄-Dicarboxylaten. Dies wird über die niedrigere Affinität von DcuS zu C₄-Dicarboxylaten (app.

$K_D = 0,4 - 7 \text{ mM}$) im Vergleich zu DcuB (K_M für Succinat/Fumarat Antiport = $100 \text{ }\mu\text{M}$, Kleefeld, 2006) unterstützt.

Es gibt weitere Beispiele für Systeme, in denen sekundäre Carrier als Co-Sensoren für Sensorkinasen fungieren, so z.B. das DctA/DctBD-System aus *Rhizobium meliloti*. Das Zweikomponentensystem DctBD reguliert die Expression von *dctA* (Reid und Poole, 1998; Yarosh *et al.*, 1989). Der C_4 -Dicarboxylat-Transporter DctA hemmt die Sensorkinase DctB, sofern kein Substrat vorhanden ist. Es wird angenommen, dass in Anwesenheit von C_4 -Dicarboxylaten der Transporter den Sensor DctB freisetzt, der dann die Kinase aktiviert. DctA kontrolliert somit die Substratspezifität und die Kinaseaktivität der Histidinkinase DctB. Das Zweikomponentensystem UhpBA aus *E. coli* kontrolliert die Expression des Glucose-6-phosphat Aufnahmecarriers UhpT unter Mitwirkung des sensorischen Hilfsprotein UhpC. UhpC stimuliert nach Bindung von Glucose-6-phosphat die Kinaseaktivität von UhpB (Kadner *et al.*, 1994; Schwöppe *et al.*, 2002). UhpC scheint aus einem sekundären Carrier abgeleitet zu sein, der nun als Co-Sensor des Zweikomponentensystems wirkt.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DcuS und DcuR

Responseregulatoren verfügen normalerweise über eine intrinsische Autophosphataseaktivität, die den phosphorylierten Status des Regulators limitiert (Parkinson und Kofoid, 1992). Die Halbwertszeit des phosphorylierten Zustands kann im Bereich von Sekunden und Stunden liegen. Die Dephosphorylierung kann durch zusätzliche Phosphataseaktivitäten katalysiert werden (Hess *et al.*, 1988; Blat *et al.*, 1994). Dabei kann es sich um die zugehörige Sensorkinase, den Responseregulator oder ein weiteres Protein handeln. In vielen Fällen übernimmt die Sensorkinase, wenn sie im inaktiven Zustand vorliegt, die Funktion der Dephosphatase des Responseregulators (Stock *et al.*, 2000; Igo *et al.*, 1989; Aiba *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 1997; Georgellis *et al.*, 1998; Möker *et al.*, 2007).

Aufgrund der Instabilität von radioaktiv markiertem DcuR (DcuR-P) wurde vermutet, dass entweder DcuS oder DcuR die Phosphatase darstellen (Janausch *et al.*, 2002). Für Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsstudien des DcuSR-Systems wurden der Sensor DcuS und der Responseregulator DcuR überproduziert und gereinigt. Der Sensor wurde in Liposomen rekonstituiert und mit radioaktivem Phosphat autophosphoryliert. Der Phosphatrest wurde schnell auf den Aspartatrest des Responseregulators DcuR übertragen. Der Phosphatgruppentransfer erfolgt dabei schneller als die Autophosphorylierung des

Sensors, die infolgedessen den limitierenden Schritt darstellt. Dies wurde auch für andere Zweikomponentensysteme beschrieben (Stock *et al.*, 2000).

Um den Grundzustand wiederzuerlangen, muss DcuR-P hydrolysiert werden. Es wurde untersucht, ob die Dephosphorylierung von DcuR durch ATP, ADP oder DcuS beeinflusst wird. DcuR verfügt über eine intrinsische Phosphataseaktivität, da in isoliertem DcuR-P nach wenigen Minuten der Großteil an Phosphat hydrolysiert wurde. DcuS stimulierte die Geschwindigkeit der Dephosphorylierung von DcuR-P und verfügt so auch über eine Phosphataseaktivität. Dabei wurde die Autophosphatase von DcuR entweder von DcuS durch eine zusätzliche Phosphataseaktivität des Sensors oder eher durch Stimulierung der intrinsischen Dephosphatase von DcuR aktiviert. ATP und ADP hatten unter den getesteten Bedingungen keinen nachweisbaren stimulierenden Einfluss auf die Dephosphorylierung von DcuR-P. In den Versuchsansätzen konnten ATP und ADP jedoch nie vollständig abgetrennt werden, sodass diese Frage nicht vollständig geklärt ist. Eine Rückübertragung der Phosphatgruppe von DcuR-P auf DcuS ist aus energetischen und physiologischen Gründen ungünstig und wurde bisher nur in einer Sensormutante des EnvZ/OmpR-Systems beobachtet (Dutta *et al.*, 1996).

Weitere Untersuchungen sollten mit Präparaten durchgeführt werden, die völlig frei von ADP und ATP sind. Die Abtrennung von ADP und ATP durch Gelfiltration bereitete bisher Schwierigkeiten, da DcuR-P aggregierte und Gelfiltrationssäulen nicht passierte. Durch analytische Gel-Permeationschromatographie und native PAGE wurde bereits gezeigt, dass DcuR nach Phosphorylierung in mehreren Oligomerisierungszuständen vorliegt und zum großen Teil präzipitiert (Abo-Amer *et al.*, 2004).

Nach Abtrennung von markiertem ATP soll in zukünftigen Studien untersucht werden, ob das Verhältnis ATP/ADP die enzymatischen Aktivitäten beeinflusst und so die Signaltransduktion regulieren könnte.

Regulation der Dephosphorylierung durch Histidinkinasen

Die Regulation von Zweikomponentensystemen wird allgemein über den Level an phosphoryliertem Responseregulator erreicht. Typischerweise verfügen Responseregulatoren über eine Phosphataseaktivität und limitieren so die eigene Phosphorylierung. Oft sind Sensorkinasen an der Phosphatasereaktion beteiligt, wie z.B. MtrB und EnvZ (Aiba *et al.*, 1989; Möker *et al.*, 2007). Solche Histidinkinasen werden als bifunktionell bezeichnet und sind zumeist in Signaltransduktionswegen zu finden, die schnell ausgeschaltet werden müssen. Dies ist bei Wachstum in Abhängigkeit von den Substraten der Umgebung, wie im

Falle von DcuS bei der Fumaratatmung, nötig. Das Umschalten zwischen Kinase- und Phosphatasefunktion von transmembranen Histidinkinasen wird meist über die Stimuli gesteuert. Wenn die Sensorkinase unphosphoryliert vorliegt, dephosphoryliert sie den entsprechenden Responseregulator und inaktiviert diesen (Abb. 42). Es ist denkbar, dass Histidinkinasen in Abwesenheit eines Stimulus als Monomere vorliegen und dann Phosphataseaktivität zeigen. Daneben gibt es auch monofunktionelle Histidinkinasen, wie z.B. in der Chemotaxis oder der Sporulation (Blat *et al.*, 1994; Perego *et al.*, 1998; Silversmith *et al.*, 2008), die keine Phosphataseaktivität besitzen. In solchen Systemen wird zur Dephosphorylierung des Responseregulators eine zusätzliche Phosphatase benötigt. In einem klassischen Zweikomponentensystem mit einer bifunktionellen Histidinkinase ist die Signalverstärkung vermutlich effizienter als in einem monofunktionellen System, welches wiederum Signale unterschiedlicher Quellen besser integrieren kann (Alves und Savageau, 2003).

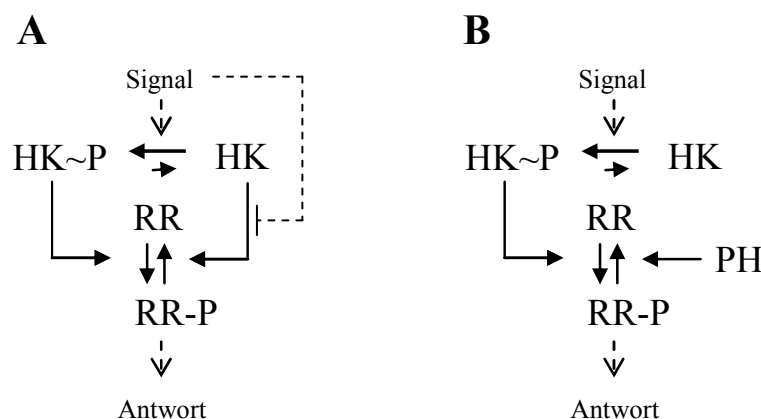


Abb. 42: Alternative Modelle für die Regulation von Zweikomponentensystemen über bifunktionelle (A) und monofunktionelle (B) Histidinkinasen. In beiden Modellen detektiert die membrangebundene Histidinkinase (HK) das Signal und phosphoryliert über eine Autokinaseaktivität (in trans) die Untereinheiten des Dimers. Die phosphorylierte Histidinkinase (HK~P) überträgt das energiereich gebundene Phosphat (~P) an den Regulator, der die spezifische Antwort auslöst. Die Energie des resultierenden Aspartylphosphates wurde vermutlich für Konformationsänderungen des Regulators genutzt (A und B). Bei bifunktionellen Histidinkinasen katalysiert der Sensor, in Abhängigkeit von Signal, die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung des Regulators. Die intrinsische Dephosphorylierungsaktivität des Regulators kann dabei durch die Histidinkinase stimuliert werden (A). In monofunktionellen Histidinkinasen übernimmt eine alternative Phosphatase die Dephosphorylierung des Regulatorproteins (B). Abbildung geändert nach Igoshin *et al.* (2008). Abkürzungen: HK = Histidinkinase; RR = Responseregulator; PH = Phosphatase; ~/-P = energiereich gebundenes bzw. gebundenes Phosphat

Responseregulatoren sind an dem Transfer der Phosphatgruppe von der Sensorkinase auf den eigenen Aspartatrest direkt beteiligt. Obwohl die N-terminale Domäne von Responseregulatoren als Receiverdomäne bezeichnet wird, ist die Generierung von

Aspartylphosphat nicht nur von der katalytischen Aktivität der Histidinkinasen abhängig. Responseregulatoren katalysieren aktiv die eigene Phosphorylierung, da z.B. auch Acetylphosphat und Phosphoramidat als Phosphatdonoren für isolierte Responseregulatoren dienen können (Lukat *et al.*, 1992). Die Raten des Phosphattransfers von phosphorylierten Histidinkinasen auf Responseregulatoren sind jedoch viel höher als die von Acetylphosphat (Zapf *et al.*, 1996; Mayover *et al.*, 1999). Vermutlich erfordert die volle Aktivität die Stimulierung und Anwesenheit von Histidinkinasen.

Trotz der einfachen Phosphorylierung von Responseregulatoren durch kleine Moleküle wie Acetylphosphat, ist ein Cross-talk zwischen nicht-zusammengehörenden Sensorkinasen und Responseregulatoren *in vivo* nicht anzunehmen. *In vitro* wurde ein Cross-talk bisher nur unter artifiziellen und nicht-physiologischen Bedingungen beobachtet (West und Stock, 2001; Bijlsma *et al.*, 2003). Die Raten der Phosphatübertragung sind in zusammengehörenden Sensor- und Regulatorsystemen weiter höher. Bisher gibt es kaum Hinweise auf Cross-talk *in vivo* (West und Stock, 2001; Laub und Goulian, 2007).

Die Phosphatasereaktion in Zweikomponentensystemen

In dem Osmosensor-System MtrBA in *C. glutamicum* stimulierte der Sensor zusammen mit ADP die schnelle Dephosphorylierung des Regulators MtrA (Möker *et al.*, 2007). Die Dephosphorylierungsreaktionen von DcuR-P und MtrB-P zeigen unterschiedlich Merkmale. So wurde die Phosphathydrolyse in DcuR durch DcuS stimuliert. MtrA-P hingegen wurde durch den Sensor MtrB nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von ADP schneller und stärker dephosphoryliert (Möker *et al.*, 2007). Aufgrund seiner guten Löslichkeit konnte MtrA-P von ATP und ADP durch Gelfiltration abgetrennt werden. Die Bindung der Nukleotide ATP, ADP und AMP-PNP (ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon), zusammen mit Mg^{2+} , ist für die Dephosphatase-Reaktion der Responseregulatoren OmpR und PhoQ nötig (Aiba *et al.*, 1989; Parkinson und Kofoid, 1992; Jung *et al.*, 2001; Sanowar *et al.*, 2005). Die Moleküle wirken dabei als Cofaktoren und werden dabei nicht hydrolysiert.

In dem Zweikomponentensystem EnvZ/OmpR aus *E. coli* dient der bifunktionelle Osmosensor EnvZ als Kinase und Phosphatase (Aiba *et al.*, 1989). In Abhängigkeit der Osmolalität werden die Gene *ompF* und *ompC*, die für Porine der äußeren Membran codieren, reguliert (Pratt und Silhavy, 1995). Die Halbwertszeit von phosphoryliertem OmpR beträgt mehrere Stunden und wird durch EnvZ auf Sekunden verkürzt. Der Sensor wird an His243 der konservierten H-Box autophosphoryliert. Die Konsensussequenz der H-Box ist h-HahbTPL (h steht für hydrophobe, a für saure und b für basische Aminosäurereste). Der hoch

konservierte Thr247 Rest ($H^{243} + 4$) liegt in Helix I eine Drehung über dem phosphoryliertem Histidinrest (Grebe und Stock, 1999). NMR-Studien zeigten, dass dieser Bereich dynamisch ist und möglicherweise zwischen helikalen und entfalteten Konformationen wechselt und so die katalytischen Eigenschaften von EnvZ beeinflussen könnte. Durch Mutation des Restes Thr247 wurde die Phosphataseaktivität des Sensors deutlich verringert. Somit wurde für EnvZ postuliert, dass die Dimerisierungs- und Histidinphosphattransfer-Domäne auch die Phosphatase-Domäne stellen könnte. Jedoch gibt es auch Hinweise, dass phosphoryliertes OmpR eine verminderte Affinität zur Kinase hat und somit die Phosphataseaktivität des Sensors in Frage gestellt wird (Mattison *et al.*, 2002). In DcuS existiert die Konsensussequenz der H-Box nicht (DcuS: H^{349} EFMN).

Konsensussequenzen oder Domänen von Phosphatasen in Histidinkinasen und Responseregulatoren sind bisher nicht bekannt. Eine Suche über Sequenzvergleiche ist deshalb nicht möglich. Möglicherweise sind für die Dephosphorylierung der Responseregulatoren nur einzelne hydrolytisch wirkende Aminosäurereste, wie bei EnvZ, ausschlaggebend.

6. Literatur

- Abo-Amer, A. E., Munn J., Jackson, K., Aktas M., Golby, P., Kelly D. J., Andrews S. C. (2004) DNA Interaction and Phosphotransfer of the C₄-Dicarboxylate-Responsive DcuS-DcuR Two-component Regulatory System from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **186**:1879-89
- Aiba, H., Mizuno, T., Mizushima, S. (1989)
Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *E. coli*
J. Bact. Chem. **25**:8563-8567
- Altschul, S. F., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J. Zhang, Z. Miller, W., D. J. Lipman (1997)
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucleic Acids Res. **25**:3389–3402.
- Alves, R., and Savageau, M. A. (2003)
Comparative analysis of prototype two-component systems with either bifunctional or monofunctional sensors: differences in molecular structure and physiological function.
Mol. Microbiol. **48**:25-51
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomkita, M., Wanner, B. L., Mori, H. (2006)
Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.
Molecular Systems Biology 2, 2006.0008.
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., Miller, S. I. (2005)
Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase.
Cell **122**(3):320-2
- Bijlsma, J. J., Groisman, E. A. (2003)
Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems.
Trends Microbiol. **11**(8):359-66
- Blat, Y. and Eisenbach, M. (1994)
Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ.
Biochem. **33**:902-906
- Borgstahl, G. E. O., Williams, D. R., Getzoff, E. D. (1995)
1,4 Å structure of photoactive yellow protein, acytosolic receptor, unusual fold, active side and chromophore.
Biochem. **34**:6278-6287
- Bott, M., Meyer, M., Dimroth P. (1995)
Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*.
Mol. Microbiol. **18**:533-46

- Bott, M. (1997)
Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria.
Arch. Microbiol. **167**:78-88
- Bradford, M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**:248–254
- Chapman-Smith, A., Lutwyche, J.K. and Whitelaw, M.L. (2003)
Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to a DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators.
J. Bact. Chem. **279**:5353-5362
- Cho, H. S., Pelton, J. G., Yan, D., Kustu, S., Wemmer, D. E. (2001)
Phosphoaspartates in bacterial signal transduction.
Curr. Opin. Struct. Biol. **11**(6):679-84
- Dutta, Qin and Inouye (1999)
Histidine kinases: diversity of domain organization
Mol. Microbiol. **34**(4):633-640
- Dutta, R., and M. Inouye. (1996)
Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase_/phosphatase_ mutant of EnvZ (EnvZ.N347D), a bifunctional signal transducer of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **271**:1424–1429
- Engel, P., Krämer, R. and Unden, G. (1994)
Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*: energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux.
Eur. J. Biochem. **222**:605–614
- Farinha, M. A. & Kropinski, A. M. (1990)
High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions.
FEMS Microbiol. Lett. **58**:221-225
- Frickey, T., and A. Lupas. (2004)
CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity.
Bioinformatics **20**:3702-3707
- Goh, E.-B., Bledsoe, P. J., Chen, L.-L., Gyaneshwar, P., Stewart, V., Igo, M. M. (2005)
Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system.
J. Bacteriol. **187**(14):4890-4899
- Golby, P., Kelly, D. J., Guest, J. R. and Andrews, S.C. (1998a)
Topological analysis of DcuA, an anaerobic C₄-dicarboxylate transporter of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **180**(18):4821–4827

- Golby, P., Kelly, D. J., Guest, J. R. and Andrews, S. C. (1998b)
Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **180**(24):6586-6596
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D. J., Guest, J. R. & Andrews S. C. (1999)
Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. **181**:1238-1248
- Gong, W., Hao, B., Mansy, S.S., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez, M. A., Chan, M. K. (1998)
Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:15177-15182
- Grebe, T. W., und Stock, J. B. (1999)
The histidine protein kinase superfamily.
Adv. Microb. Physiol. **41**:139-227
- Gu, Y.-Z., Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. (2000)
THE PAS SUPERFAMILY: sensors of environmental and developmental signals.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **40**:519-561
- Gunsalus, R. P. (1992)
Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes.
J. Bacteriol. **174**(22):7069-74
- Gunsalus, R. P. and Park, S.J. (1994)
Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons.
Res. Microbiol. **145**:437-450
- Gutowski, S. J., Rosenberg, H. (1975)
Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K-12.
J. Biochem. **152**:647-654
- Hess, J. F., Oosawa, K., Kaplan, N., and Simon, M. I. (1988)
Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis.
Cell **53**:79-87
- Hsing, W., Russo, F.D., Bernd, K.K., and Silhavy, T.J. (1998)
Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ.
J. Bacteriol. **180**:4538-4546
- Igo, M. M., Ninfa, A. J., Stock, J. B., Silhavy, T. J. (1989)
Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor
Genes & Development **3**:1725-1734

- Igoshin, O. A., Alves, R., Savageau, M. A. (2008)
Hysteretic and graded responses in bacterial two-component signal transduction.
Mol. Microbiol. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06221.x
- Iuchi, S. and Lin, E. C. C. (1988)
arcA (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of
enzymes in aerobic pathways.
Proc Natl Acad Sci USA **85**:1888-1892
- Janausch, I. G. (Promotion 2001)
Rekonstitution des Fumaratsensors DcuS in Liposomen und Transport von Fumarat
und Succinat in *Escherichia coli*
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I., Uden G. (2002)
Function of DcuS from *Escherichia coli* as a Fumarate-stimulated Histidine Protein
Kinase *in vitro*.
J. Biol. Chem. **277**:39809-14
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A. & Uden, G. (2002b)
C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria.
Biochim. Biophys. Acta. **1553**:39-56
- Janausch, I. G., Garcia-Moreno I., Lehnen D., Zeuner Y., Uden G. (2004)
Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive
two-component system DcuSR of *Escherichia coli*.
Microbiology. **150**:877-83
- Jensen, K. F. (1993)
The *Escherichia coli* K-12 'wild types' W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift
mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels.
Journal of Bacteriology **175**:3401-3407
- Jung, K., Tjaden, B., and Altendorf, K. (1997)
Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of
Escherichia coli.
J. Biol. Chem. **272**:10847-10852
- Jung, K., and Altendorf, K. (1998)
Individual substitutions of clustered arginine residues of the sensor kinase KdpD of
Escherichia coli modulate the ratio of kinase to phosphatase activity.
J. Biol. Chem. **273**:26415-26420
- Jung, K., Veen, M., Altendorf, K. (2000)
K⁺ and ionic strength directly influence the autophosphorylation activity of the
putative turgor sensor KdpD of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **275**:40142-40147

- Jung, K., Hamann, K., Revermann, A. (2001)
K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **276**:40896–40902
- Kadner, R.J., Island, M.D., Dahl, J.L., and Webber, C.A. (1994)
A transmembrane signalling complex controls transcription of the Uhp sugar phosphate transport system.
Res. Microbiol. **145**:381-387
- Kaspar, K., 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.
Mol. Microbiol. **33**:858-872
- Kaspar, S., Bott, M. (2002)
The sensor kinase CitA of *Escherichia coli* functions as a high-affinity citrate receptor.
Arch. Microbiol. **177**:313-321
- Keener, J., Kustu, S. (1988)
Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of the conserved N-terminal domain of NtrC.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**:4976–80
- Kim, OB., Lux, S., Uden, G. (2007)
Anaerobic growth of *Escherichia coli* on D-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the L-tartrate carrier TtdT and L-tartrate dehydratase.
Arch. Microbiol. **188**(6):583-9
- Kleefeld, A. (Dissertation, 2007)
Der Carrier DcuB als zweiter Sensor des Zweikomponentensystems DcuSR in *Escherichia coli*.
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Kneuper, H. (Dissertation, 2005)
Struktur- und Funktionsuntersuchungen des C₄-Dicarboxylat-Sensors DcuS von *Escherichia coli*.
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Krämer, J., Fischer, J., Zientz, E., Vijayan, V., Griesinger, C., Lupas, A., Uden, G. (2007)
Citrate sensing by the C₄-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: binding site and conversion of DcuS to a C₄-dicarboxylate- or citrate-specific sensor.
J. Bacteriol. **189**(11):4290-4298
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G. and Lancaster, C. R. D. (2002)
Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism.
Biochim. Biophys. Acta (Reviews in Bioenergetics) **1553**:23–38

- Laemmli, U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685
- Laub, M. T. and Goulian, M. (2007)
Specificity in Two-component signal transduction pathways.
Annu. Rev. Genet. **41**:121–45
- Lois, A. F., Weinstein, M., Ditta, G. S., Helinski, D. R. (1993)
Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen.
J. Biol. Chem. **268**:4370–75
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. (1992)
Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **15**:89(2):718-22
- Lütgens, M., Gottschalk, G. (1980)
Why a co-substrate is required for anaerobic growth of *Escherichia coli* on citrate.
J. Gen. Microbiol. **119**:63–70
- Lux, S. (Diplomarbeit, 2007)
Spezifität des anaeroben Fumaratcarriers DcuB.
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Mattison, K., Kenney L.J. (2002)
Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ.
J. Biol. Chem. **29**:277(13):11143-8
- Mayover, T. L., Halkides, C. J., Stewart, R. C. (1999)
Kinetic characterization of CheY phosphorylation reactions: comparison of P-CheA and small-molecule phosphodonors
Biochemistry **38**:2259–2271
- Miller, J. H. (1992)
A short course in bacterial genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miroux B. and Walker, J.E. (1996)
Guidelines for users of *Escherichia coli* C 41(DE3) and C 43(DE3) over-expression host strains
J. Mol. Biol. **260**:289-298
- Mizuno, T. (1997)
Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*.
DNA Res. **4**:161-168

- Müller, M. (Diplomarbeit 2007)
Funktionskomplementierung des Fumaratsensors DcuS von *Escherichia coli* durch Hybriddimere.
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Mullis, K. B., Farone, F. A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G., and Ehrlich, H. (1986)
Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **51**:263-273
- Möker, N., Krämer, J., Unden, G., Krämer, R. and Morbach, S. (2007)
In vitro analysis of the two-component system MtrB-MtrA from *Corynebacterium glutamicum*.
J. Bacteriol. **189**(9):3645-3649
- Nakashima, K., Sugiura, A., Momoi, H., Mizuno, T. (1992)
Phosphotransfer signal transduction between two regulatory factors involved in the osmoregulated *kdp* operon in *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. **6**:1777-1784
- Neiditch, M. B., Federle, M. J., Pompeani, A. J., Kelly, R. C., Swem, D. L., Jeffrey, P. D., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2006)
Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing.
Cell **126**(6):1095-108
- Pappalardo, L., Janausch, I. G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Unden, G., Griesinger, C. (2003)
The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **278**:39185-8
- Parkinson, J. S. und Kofoed, E. C. (1992)
Communication modules in bacterial signaling proteins
Annu. Rev. Genet. **26**:71-112
- Paternostre, M.-T., Roux, M. and Rigaud, J.-L. (1988)
Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate.
Biochemistry **27**:2668-2677
- Perego, M. (1998)
Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis*.
Development. Trends Microbiol. **6**:366-370
- Pioszak, A. A., and Ninfa, A. J. (2003)
Genetic and biochemical analysis of phosphatase activity of *Escherichia coli* NRII (NtrB) and its regulation by the PII signal transduction protein.
J. Bacteriol. **185**:1299-1315

- Pratt, L.A. and Silhavy, T. J. (1995)
Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction.
Mol. Microbiol. **17**:565-73
- Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., Madden, D. R. (2003)
The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain.
J. Biol. Chem. **278**:39189-96
- Repik, A., Rebbapragada, A., Johnson, M.S., Haznedar, J. Ö., Zhulin, I. B. and Taylor, B. L. (2000)
PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*.
Mol. Mic. **36**(4):806-816
- Reid, C. J. and Poole, P. S. (1998)
Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*.
J. Bacteriol. **180**: 2660-2669
- Rigaud, J.-L., Paternostre, M.-T. and Bluzat, A. (1988)
Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin
Biochemistry **2**:2677-2688
- Rigaud, J.-L., Pitard, B. and Levy, D. (1995)
Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins
Biochim. Biophys. Acta **1231**:223-246
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanowar, S., and Le Moual, H. (2005)
Functional reconstitution of the *Salmonella typhimurium* PhoQ histidine kinase sensor in proteoliposomes.
Biochem. J. **390**:769–776
- Schiller, D., Rübenhagen, R., Krämer, R., and Morbach, S. (2004)
The C-terminal domain of the betaine carrier BetP of *Corynebacterium glutamicum* is directly involved in sensing K⁺ as an osmotic stimulus.
Biochemistry **43**: 5583-5591
- Schwöppe, C., Winkler, H.H., and Neuhaus, H.E. (2002)
Properties of the glucose-6-phosphate transporter from *Chlamydia pneumoniae* (HPTcp) and the glucose-6-phosphate sensor from *Escherichia coli* (UhpC).
J. Bacteriol. **184**:2108-2115

- Shaw, D.J. and Guest, J.R. (1982)
Nucleotide sequence of the *fnr* gene and primary structure of the Fnr protein of *Escherichia coli*
Nucl. Acids Res. **10**: 6119-6230
- Silversmith, R. E., Levin M. D., Schilling E., Bourret, R. B. (2008)
Kinetic characterization of catalysis by the chemotaxis phosphatase CheZ. Modulation of activity by the phosphorylated CheY substrate.
J. Biol. Chem. **11**:283(2):756-65
- Six, S., Andrews, S. C., Uden, G. & Guest, J. R. (1994)
Escherichia coli possesses two homologous anaerobic C₄-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct).
J. Bacteriol. **176**: 6470-6478
- Stewart, V. (1993)
Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*
Mol. Microbiol. **9**: 425-434
- Stewart, V. and Rabin, R.S. (1995)
Dual sensors and dual response regulators interact to control nitrate and nitrite-responsive gene expression in *Escherichia coli*
In: Two component signal transduction, Hoch JA and Silhavy TJ(eds.), ASM Press, Washington DC, pp233-252
- Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M. & Park, P. (1995)
Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanism of catalysis S. 25 - 51
- Szurmant, H., White, R. A. , Hoch, J. A. (2007)
Sensor complexes regulating two-component signal transduction.
Curr. Opin. Struct. Biol. **17**(6):706-15
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999)
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light
Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 479-506
- Uden, G. and Kleefeld, A. (2004)
C₄-dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth.
Module 3.4.5 In R. Curtiss III (Editor in Chief), *EcoSal - Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology.
(Online) <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.
- Weber, A. and Jung, K. (2002)
Profiling early osmotic stress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA Macroarrays.
J. Bacteriol **184**:5502-5507

- West, A.H., Stock, A.M. (2001)
Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems
Trends Biochem. Sci. **26**(6):369-376
- Weiss V., Magasanik B. (1988)
Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**(23):8919-23
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors.
Gene **33**:103-119
- Yarosh, O.K., Charles, T.C., and Finan, T.M. (1989)
Analysis of C₄-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*.
Mol. Microbiol. **6**:813-823.
- Zapf, J. W., Hoch, J. A., Whiteley, J.M. (1996)
A phosphotransferase activity of the *Bacillus subtilis* sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates.
Biochemistry **35**:2926–2933
- Zhulin, I. B., Taylor, B. L. and Dixon, R. (1997)
PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox.
Trends Biochem. Sci. **22**:331-333
- Zientz, E., Six, S. and Uden, G. (1996)
Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C₄-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange.
J. Bacteriol. **178**: 7241-7247
- Zientz, E., Bongaerts, J. & 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
- Zientz, E. (Promotion 2000)
Identifizierung und Charakterisierung des Fumaratregulationssystems DcuSR in *Escherichia coli*.
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

7. Anhang

Tab. 22: Effekt der C₄-Dicarboxylate, der C₆-Tricarboxylate und ähnlicher Verbindungen auf die Expression von *dcuB*'-'*lacZ* in Stämmen mit Wildtyp-DcuS, C₄-Dicarboxylat-spezifischem DcuS_{DC} (F141S) und Citrat-spezifischem DcuS_{Cit} (T101G F120M I125S). Die Zucht der *dcuS*-Insertionsmutante IMW260 mit low-copy Plasmid-codierten DcuS und DcuS-Mutanten erfolgte anaerob in eM9 mit Glycerin (50 mM) plus DMSO (20 mM) und den Effektoren (20 mM [5 mM Nitropropionat]). Die β -Galactosidase-Aktivität der chromosomalen *dcuB*'-'*lacZ*-Fusion wurde bei OD₅₇₈ 0,5 – 0,8 gemessen.

Effektor	<i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> -Fusion β -Galactosidase-Aktivität (Miller-Units) ^a		
	DcuS Wildtyp	DcuS(F141S) "DcuS _{DC} "	DcuS(T101G F120M I125S) "DcuS _{Cit} "
ohne	17 ± 4	7 ± 1	5 ± 1
Fumarat	189 ± 25	159 ± 1	1 ± 1
Aspartat	143 ± 24	80 ± 6	4 ± 1
D-Tartrat	179 ± 1	72 ± 9	5 ± 1
Nitropropionat	137 ± 13	41 ± 11	2 ± 1
Mesaconat ^b	41 ± 14	4 ± 1	67 ± 3
Citrat	89 ± 19	9 ± 1	58 ± 2
Tricarballylat	18 ± 7	7 ± 1	8 ± 3
Isocitrat	48 ± 4	16 ± 1	15 ± 4
Glutarat	20 ± 1	6 ± 1	4 ± 1
Succinat	106 ± 1	35 ± 1	4 ± 1
2,3-Dimethylsuccinat	13 ± 3	12 ± 2	5 ± 3
Itaconsäure ^c	12 ± 4	4 ± 1	2 ± 1
Phthalat	13 ± 3	8 ± 4	3 ± 1

^a Standardabweichung von sechs unabhängigen Zuchten in vier Parallelen

^b 2-Methylfumarat ^c 2-Methylsuccinat

Die Effektoren 2,3-Dimethylsuccinat, Itaconsäure (2-Methylsuccinat) und Phthalat waren bereits als Effektoren ohne stimulierenden Effekt auf chromosomal codiertes Wildtyp-DcuS bekannt (Kneuper *et al.*, 2005). Diese Effektoren zeigten weder mit der C₄-Dicarboxylat- noch mit der Citrat-spezifischen Mutante eine Induktion.

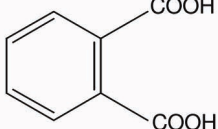
$\begin{array}{c} \text{HC}-\text{COOH} \\ \parallel \\ \text{HOOC}-\text{CH} \end{array}$ Fumarat	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Aspartat	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ L-Malat	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Succinat
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \parallel \\ \text{HOOC}-\text{CH} \end{array}$ Mesaconat	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Itaconat	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{O}_2\text{N}-\text{CH}_2 \end{array}$ Nitropropionat	$\begin{array}{c} \text{HC}-\text{COOH} \\ \parallel \\ \text{HC}-\text{COOH} \end{array}$ Maleinat
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Glutarat	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Citrat	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{HC}-\text{COOH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ Isocitrat	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{HC}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Tricarballylat
$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ D-Tartrat	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ Thiomalat	 Phthalat	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \end{array}$ 2,3-Dimethylsuccinat

Abb. 43: Strukturen der C₄-Dicarboxylate, C₆-Tricarboxylate und verwandter Verbindungen. Die Bezeichnungen entsprechen den Salzen.

Mesaconat = 2-Methylfumarat

Itaconsäure = 2-Methylensuccinat

Thiomalat = Mercaptobornsteinsäure, Mercaptosuccinat

8. Veröffentlichungen

- Krämer J., Fischer J. D., Zientz E., Vijayan V., Griesinger C., Lupas A., Uden G.
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., 2007, 189(11):4290-8
- Möker N., Krämer J., Uden G., Krämer R., Morbach S.
In vitro analysis of the two-component system MtrB-MtrA from *Corynebacterium*
glutamicum.
J. Bacteriol., 2007, 189(9):3645-9
- Kleefeld A., Krämer J., Ackermann B., Bauer J., Uden G.
The fumarate/succinate antiporter DcuB serves as an essential signal input site for the
DcuS histidine kinase of *Escherichia coli*.
Submitted
- Etzkorn M., Kneuper H., Dünnwald P., Vijayan V., Krämer J., Griesinger C., Becker S.,
Uden G., and Baldus M.
Structural aspects of intracellular, PAS mediated, signal transduction in the
membrane-embedded histidine-kinase DcuS.
Submitted