

Signaltransduktion  
in der membranständigen  
Sensor-Histidinkinase DcuS  
von *Escherichia coli*

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES GRADES  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

AM FACHBEREICH BIOLOGIE  
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

**CHRISTIAN MONZEL**  
GEBOREN AM 04. SEPTEMBER 1984 IN WITTLICH

MAINZ, NOVEMBER 2014



Dekan: [REDACTED]  
1. Berichterstatter: [REDACTED]  
2. Berichterstatter: [REDACTED]  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>9</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>11</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> . . . . .	11
2.1.1 Verbreitung und Lebensweise . . . . .	11
2.1.2 Regulation der Atmung . . . . .	11
2.1.3 Stoffwechsel von C <sub>4</sub> -Dicarboxylaten . . . . .	12
2.1.4 Transport von C <sub>4</sub> -Dicarboxylaten . . . . .	13
2.2 Zwei-Komponenten-Systeme . . . . .	14
2.2.1 Sensor-Histidinkinasen . . . . .	15
2.2.2 Phosphotransfer . . . . .	17
2.2.3 Responseregulatoren . . . . .	18
2.3 Per-ARNT-Sim (PAS)-Domänen . . . . .	19
2.4 DcuSR und C <sub>4</sub> -Dicarboxylate: Rezeption und Regulation . . . . .	21
2.4.1 Der Sensor DcuS . . . . .	22
2.4.2 Der Regulator DcuR . . . . .	24
2.5 Intramolekulare Signaltransduktion in bakteriellen Sensoren . . . . .	24
2.5.1 Signalinitiation in der Sensordomäne . . . . .	24
2.5.2 Signaltransduktion durch die Transmembrandomäne . . . . .	25
2.5.3 Signaltransduktion durch weitere cytoplasmatische Domänen . . . . .	27
2.6 Ziel der Arbeit . . . . .	28
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1 Stämme, Plasmide und Primer . . . . .	30
3.1.1 Stämme und Viren . . . . .	30
3.1.2 Plasmide . . . . .	30
3.1.3 Primer . . . . .	37
3.2 Chemikalien . . . . .	44

3.3 Medien, Lösungen und Puffer . . . . .	44
3.3.1 Allgemeines . . . . .	44
3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Test . . . . .	46
3.3.3 Cystein-Zugänglichkeitsstudien . . . . .	46
3.3.4 Oxidatives <i>in vivo</i> Cystein-Crosslinking . . . . .	47
3.3.5 SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting . . . . .	47
3.3.6 Stammkonstruktion . . . . .	49
3.4 Zucht von <i>E. coli</i> . . . . .	50
3.5 Molekularbiologische Methoden . . . . .	52
3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	52
3.5.2 DNA-Sequenzierung . . . . .	53
3.5.3 Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	53
3.5.4 Transformation durch Elektroporation . . . . .	54
3.5.5 Hitzeschocktransformation . . . . .	54
3.5.6 Mutagenese . . . . .	54
3.5.6.1 Ungerichtete Mutagenese . . . . .	55
3.5.6.2 Gerichtete Mutagenese . . . . .	56
3.5.7 Stammkonstruktion . . . . .	56
3.6 Biochemische Methoden . . . . .	57
3.6.1 Bakteriellies Two-Hybrid System (BACTH) . . . . .	57
3.6.2 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase . . . . .	58
3.6.3 SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting . . . . .	59
3.6.3.1 SDS-PAGE . . . . .	59
3.6.3.2 Semi-dry Western-blotting . . . . .	59
3.6.3.3 Antikörperfärbung und Chemilumineszenz-Entwicklung . . . . .	59
3.6.4 Cystein-Zugänglichkeitsstudien . . . . .	60
3.6.5 Oxidatives <i>in vivo</i> Cystein-Crosslinking . . . . .	61
3.7 Bioinformatik . . . . .	62

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>64</b>
4.1 Signaltransduktion durch die Transmembrandomäne . . . . .	66
4.1.1 Positionierung und Bewegung der Transmembranhelices . . . . .	66
4.1.1.1 Cystein zugänglichkeit als Positionsmarker für Transmembranhelices	66
4.1.1.2 TM1 zeigt eine marginale Zugänglichkeitsänderung zwischen beiden Signalzuständen . . . . .	72
4.1.1.3 TM2 zeigt eine ausgeprägte Änderung der Zugänglichkeit zwischen beiden Signalzuständen . . . . .	74
4.1.1.4 Fehlende Co-Regulation durch DctA versetzt beide Transmembran- helices in ihren aktiven Signalzustand . . . . .	77
4.1.1.5 Das Ausmaß der Translokation von TM2 korreliert mit der Effek- torstärke . . . . .	81
4.1.1.6 Substituierte Argininreste in TM2 verschieben diese in ihren aktiven Signalzustand . . . . .	91
4.1.1.7 PAS <sub>c</sub> -ON-Mutationen bewirken rückläufig die Translokation von TM2	95
4.1.1.8 Eine PAS <sub>c</sub> -OFF-Mutation hat keinen rückläufigen Effekt auf TM2 .	101
4.1.2 Substituierte Argininreste im periplasmanahen Teil von TM2 aktivieren DcuS effektorunabhängig . . . . .	103
4.1.3 Verkürzungen von TM2 und assoziierter Abschnitte verändern die Akti- vität von DcuS . . . . .	105
4.1.4 Die Rolle von Tryptophanresten in der Signaltransduktion durch TM2 .	107
4.1.5 Bewegung der Transmembranhelices im Dimer . . . . .	109
4.1.5.1 Oxidatives Cystein-Crosslinking als Positionsmarker von Transmem- branhelices . . . . .	109
4.1.5.2 TM2 und periplasmatisch assoziierte Abschnitte bewegen sich par- allel im Dimer . . . . .	111
4.2 Signaltransduktion durch die cytoplasmatische PAS-Domäne . . . . .	113
4.2.1 Konzentration von ON-Mutationen in PAS <sub>c</sub> . . . . .	113
4.2.2 Klassifizierung von PAS <sub>c</sub> -ON-Varianten anhand ihrer DcuS-Homodimeri- sierung . . . . .	116
4.2.3 Subgruppierung von PAS <sub>c</sub> -ON-Varianten entsprechend ihrer Interaktion zwischen Sensor DcuS und Co-Regulator DctA . . . . .	119

<b>5 Diskussion</b>	<b>121</b>
5.1 Signaltransduktion durch die Transmembrandomäne . . . . .	121
5.1.1 TM2 ist der Signalträger in der Transmembrandomäne . . . . .	122
5.1.2 Eine Kolbenhubbewegung von TM2 in Richtung Periplasma trägt das Signal über die Membran . . . . .	124
5.1.3 Die Amplitude des Kolbenhubs . . . . .	127
5.1.4 Tryptophanreste bestimmen die Auslenkung der Kolbenhubbewegung .	132
5.1.5 Die Amplitude der Kolbenhubbewegung bestimmt die Stärke der DcuS- Aktivierung . . . . .	133
5.2 Signaltransduktion durch PAS <sub>c</sub> . . . . .	135
5.3 Modell der intramolekularen Signaltransduktion in DcuS . . . . .	140
 <b>6 Literatur</b>	 <b>142</b>
 <b>A Anhang</b>	 <b>167</b>
 <b>B Abkürzungsverzeichnis</b>	 <b>173</b>
 <b>C Veröffentlichungen und Präsentationen</b>	 <b>176</b>
 <b>D Lebenslauf</b>	 <b>177</b>
 <b>E Danksagung</b>	 <b>178</b>

# 1 Zusammenfassung

*Escherichia coli* kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten wachsen, die Regulation des Stoffwechsels erfolgt durch das Zwei-Komponenten-System DcuSR. Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter DctA (aerob) bzw. DcuB (anaerob) agieren als Co-Regulatoren und bilden gemeinsam mit der Sensor-Histidinkinase DcuS einen Sensorkomplex, in dem DcuS den Sensor darstellt und DctA bzw. DcuB diesen in seine rezeptive Form überführen. DcuS ist membranständig und verknüpft die Bindung von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten im Periplasma mit der Autophosphorylierung seiner Kinasedomäne im Cytoplasma. Dies stellt den Beginn einer Signalkaskade vom extrazellulären Reiz zum cytoplasmatischen Responseregulator DcuR dar.

In dieser Arbeit wurde die intramolekulare Signaltransduktion in DcuS und über die Membran untersucht. Der Fokus lag auf der Funktion der beiden Transmembranhelices TM1 und TM2 und der cytoplasmatischen PAS-Domäne, die die sensorische PAS<sub>p</sub>- mit der effektorischen Kinasedomäne verbinden. Konformationsänderungen dieser Signalweiterleitung wurden durch Cystein zugänglichkeitsstudien, oxidatives Cystein-Crosslinking und Mutageneseexperimente analysiert.

TM2 wurde als der Überträger eines transmembranen Signals identifiziert, während TM1 als Membrananker fungiert. Der aktive Signalzustand von TM2 wird unabhängig von der Art der DcuS-Aktivierung (Effektorbindung, Deletion des Co-Regulators DctA oder PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen) eingenommen. Der Signaltransduktion liegt eine Verschiebung von TM2 entlang ihrer Längsachse (Kolbenhub) in Richtung Periplasma zu Grunde. Cystein-Crosslinking offenbarte eine durchgehende Helix aus PAS<sub>p</sub>-α<sub>6</sub> und TM2, die im Dimer parallel mit ihrem Pendant verschoben wird. Die Amplitude des Kolbenhubs wurde anhand von Zugänglichkeitsveränderungen, der Lage verankernder Tryptophanreste, Strukturvergleichen und energetischen Berechnungen auf max. 4 - 6 Å festgelegt. Sie ist von der Effektorstärke abhängig und koppelt so die metabolische Bevorzugung einzelner Substrate an das Ausmaß des Kolbenhubs und der Genexpression.

Für die cytoplasmatische PAS-Domäne wurde ein Zusammenhang zwischen lokaler Dimerisierung und Kontrolle der Sensorfunktion nachgewiesen. Schwächung der Dimerisierung führt zu einer Aktivierung der Sensorkinase. Es wurde eine hydrophobe Region identifiziert, deren strukturelle Integrität für diese Dimerisierung essentiell ist. Mit N248 wurde ein funktionell bedeutender Rest beschrieben, der auf Grund seiner Lage und seiner Eigenschaft mehrere Sekundärstrukturelemente zu verknüpfen, als Scharnier innerhalb der Domäne an der Umsetzung des Kolbenhubs in eine veränderte Quartärstruktur von PAS<sub>c</sub> beteiligt sein könnte.

## Abstract

Aerobic and anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate metabolism in *E. coli* is regulated by the two-component system DcuSR. The transporters of C<sub>4</sub>-dicarboxylates, DctA under aerobic and DcuB under anaerobic conditions, respectively, act as co-regulators and form a sensor complex with the sensor histidine kinase DcuS. Therein, DcuS serves as the actual sensor while DctA or DcuB convey DcuS into its responsive state. Binding of C<sub>4</sub>-dicarboxylates at the periplasmic portion of membraneous DcuS induces autophosphorylation of a cytoplasmic histidine residue as the starting point of a signaling cascade via the response regulator DcuR.

The intramolecular signal transduction of DcuS was investigated. This work focuses on the two transmembrane helices and the cytoplasmic PAS domain, since they connect input in PAS<sub>p</sub> with the output in the kinase domain. Conformational shifts during signal transduction were analyzed using scanning cysteine accessibility, oxidative cysteine crosslinking and mutagenesis.

TM2 was identified as the main participant in transmembrane signaling, while TM1 plays only a minor role. The active signaling state is occupied by TM2 irrespective of the way DcuS is stimulated (effector binding, deletion of the co-regulator, ON-mutations). Signal transduction is carried out by a sliding of TM2 along its long axis (piston type) towards periplasm. By means of cysteine crosslinking, a continuous  $\alpha$ -helix of PAS<sub>p</sub>- $\alpha_6$  and TM2 was described, which is shifted in parallel to its counterpart within the dimer. Based on changes in the cysteine accessibility, the position of anchoring tryptophane residues, structure comparisons, and energetic calculations the amplitude of piston type displacement was determined to be 4 - 6 Å at the maximum. Its magnitude corresponds with the strength of an effector and thus, couple metabolic preference with the extent of gene expression.

For the cytoplasmic PAS domain a correlation between local dimerization and control of sensor function was demonstrated. A hydrophobic patch on the surface of PAS<sub>c</sub> with relevance for dimerization was recognized. N248 was shown to be of special interest due to its localization and unique connection of secondary structural elements and could work as a hinge for the sake of signal transformation from piston type to alterations in the quaternary structure of PAS<sub>c</sub>.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Escherichia coli*

#### 2.1.1 Verbreitung und Lebensweise

*Escherichia coli* wurde 1886 durch den deutschen Kinderarzt Theodor Escherich als *Bacterium coli commune* beschrieben (ESCHERICH, 1886). *E. coli* ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges und peritrich begeißeltes Proteobakterium aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Es ist ein wichtiger Kommensale des menschlichen Gastrointestinaltrakts und besiedelt diesen bereits innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. Es findet dort seine Nische in der Mukosa des Kolons (ALLOCATI et al., 2013). Gleichzeitig ist *E. coli* aber auch ein wichtiger pathogener Organismus der mit einem breiten Spektrum an intra- und extraintestinalen Krankheiten verknüpft ist (KAPER et al., 2004).

#### 2.1.2 Regulation der Atmung

Als fakultativ anaerobes Bakterium ist *E. coli* zur aeroben und anaeroben Atmung sowie zur Gärung befähigt. Unter respiratorischen Bedingungen kann die Oxidation von 10 verschiedenen Elektronendonoren an die Reduktion von 6 unterschiedlichen Elektronenakzeptoren geknüpft werden. Dies erfordert die Kopplung verschiedenartiger Dehydrogenasen mit jeweils einer von mehreren Reduktasen, was über den Chinon-Pool innerhalb der Cytoplasmamembran geschieht und verzweigte Atmungsketten entstehen lässt (UNDEN et al., 2014).

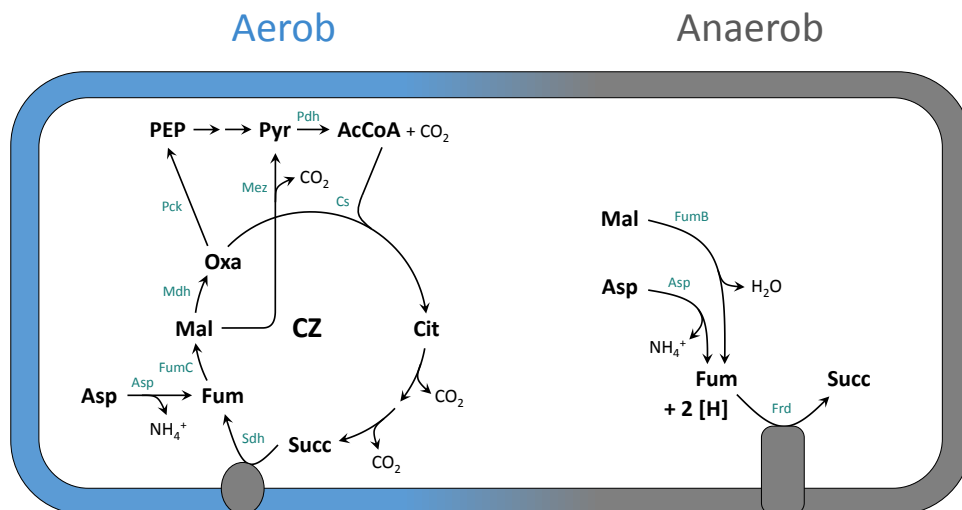
Die Energieausbeute der Atmung wird maßgeblich vom Redoxpotential  $E_0$  ' des Elektronenakzeptors bestimmt. Dieses nimmt von Sauerstoff über Nitrat, Nitrit, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Trimethylamin-N-oxid (TMAO) zu Fumarat ab. Die Atmungsformen werden daher streng reguliert und folgen einer strikten Hierarchie (GUNSALUS, 1992). In *E. coli* erfolgt die Umschaltung auf anaerobe Atmung bei bestimmten Sauerstoffpartialdrücken. Während Enzyme der anaeroben Atmung bereits bei einem Absinken unter 5 mbar exprimiert werden, stoppt die Expression von Enzymen des aeroben Stoffwechsels erst bei Werten unter 1 mbar (BECKER et al., 1996). Zelluläre Schalter sind FNR und ArcBA. Unter mikro- und anoxischen Bedingungen aktiviert der direkte Sauerstoffsensoren FNR (fumarate nitrate reductase regulator) die anaerobe Atmung, während das Zweikomponentensystem ArcBA (aerobic respiration control) indirekt den Redoxstatus

der Zelle misst und die aerobe Atmung inaktiviert (UNDEN et al., 1995; SPIRO und GUEST, 1990; BEINERT und KILEY, 1996; BUENO et al., 2012).

Neben der allgemeinen Expressionsstimulierung während der Anaerobiose bedarf es zusätzlicher Regulationsmechanismen in Abhängigkeit von den jeweiligen Elektronenakzeptoren. Diese Regulatoren sind NarXL (und NarPQ) für Nitrat und Nitrit (STEWART, 2003), TorSR für TMAO (JOURLIN et al., 1996) und DcuSR für Fumarat (ZIENZT et al. (1998); siehe Abschnitt 2.4). Mit Ausnahme von DMSO, für das kein Sensorsystem bekannt ist, stimulieren die Elektronenakzeptoren über die Sensor/Regulatorsysteme vor allem die Expression der terminalen Reduktasen, z.B. die Nitratreduktase NarGHI oder die Fumaratreduktase FrdABCD, und die Transporter (UNDEN et al., 2014).

### 2.1.3 Stoffwechsel von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten

Zu den C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten gehören bspw. Aspartat, Fumarat, Malat und Succinat. Sie werden von *E. coli* sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen verstoffwechselt und zum Wachstum genutzt (FUCHS, 2007). Abb. 1 gibt eine Übersicht über die zugehörigen Stoffwechselwege.



**Abb. 1:** Aerobere und anaerobe Stoffwechselwege von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten in *E. coli*. Intermediate: Ac-CoA, Acetyl-Coenzym A; Asp, Aspartat; Cit, Citrat; Fum, Fumarat; Mal, L-Malat; Oxa, Oxalacetat; PEP, Phosphoenolpyruvat; Pyr, Pyruvat; Succ, Succinat. Enzyme: Asp, Aspartase; Cs, Citratsynthase; Frd, Fumaratreduktase; Fum, Fumarase; Mez, Malatenzym; Mdh, Malatdehydrogenase; Pck, PEP-Carboxykinase; Pdh, Pyruvatdehydrogenase; Sdh, Succinatdehydrogenase. CZ, Citratzyklus. Verändert nach UNDEN und KLEEFELD (2004).

Aerob werden  $C_4$ -Dicarboxylate in den Citratzyklus eingeschleust und dort zu  $CO_2$  oxidiert. Bei den unmittelbar beteiligten Enzymen im Zyklus handelt es sich um die Succinatdehydrogenase, die Malatdehydrogenase und die Fumarasen A und C. Acetyl-CoA, das zum Schließen des Zyklus für die Bildung von Citrat aus Oxalacetat benötigt wird, entsteht aus Pyruvat, das wiederum aus L-Malat direkt durch die Reaktion des Malatenzyms bzw. indirekt über Phosphoenolpyruvat aus den Reaktionen der PEP-Carboxykinase und der Pyruvatkinase gebildet wird. Der Metabolismus von Aspartat benötigt ein weiteres Enzym, die Aspartase, die dieses zu Fumarat desaminiert. Energetisch bilanziert entstehen pro Mol  $C_4$ -Dicarboxylat 14 Reduktionsäquivalente in Form von  $QH_2$  (Ubichinol) und NADH (reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid) (UNDEN und KLEEFELD, 2004).

Da der Citratzyklus unter anaeroben Bedingungen nicht funktional ist, wird dieser hinsichtlich der Verwertung von  $C_4$ -Dicarboxylaten durch die Fumaratatmung ersetzt. Dies verlangt allerdings nach einem zusätzlichen Elektronendonator wie z.B. Glycerin. Die Fumaratreduktase, die statt einer reversen Reaktion der Succinatdehydrogenase zum Einsatz kommt, katalysiert die Reduktion von Fumarat zu Succinat. Succinat wird nicht weiter verstoffwechselt, da die Succinatdehydrogenase spezifisch Ubichinon als Elektronenakzeptor nutzt und das entstehende Ubichinol anaerob nicht reoxidiert werden kann. Lediglich die Nitratatmung kann Ubichinon nutzen und ermöglicht dadurch den Abbau von Succinat über einen Citratzyklus mit reduzierter Aktivität. Andere  $C_4$ -Dicarboxylate werden zunächst zu Fumarat überführt und dann ebenfalls veratmet. Im Fall von Malat ist die Fumarase B, im Fall von Aspartat die L-Aspartase für diese Umwandlung verantwortlich. Es entstehen letztlich maximal 0,5 ATP pro Fumarat (UNDEN und KLEEFELD, 2004).

### 2.1.4 Transport von $C_4$ -Dicarboxylaten

Der Metabolismus von  $C_4$ -Dicarboxylaten erfordert deren Aufnahme in die Zelle bzw. das Ausschleusen von Succinat als Endprodukt der Fumaratatmung. Für diesen Transport existieren mehrere Proteine und es erfolgt eine grundsätzliche Unterscheidung zwischen aerobem und anerobem Transport (KAY und KORNBERG, 1971; ENGEL et al., 1992). Aerob stehen zwei Transporter zur Verfügung, deren Nutzung vom pH-Wert abhängt. Es handelt sich hierbei um DctA und DauA (JANAUSCH et al., 2001; KARINOU et al., 2013). DctA ( $C_4$ -dicarboxylate transport protein A) agiert als sekundärer Carri-

er und katalysiert die Aufnahme von  $C_4$ -Dicarboxylaten im Symport mit zwei bis drei Protonen (GUTOWSKI und ROSENBERG, 1975). Der  $k_M$ -Wert liegt bei rund  $30 \mu\text{M}$  (KAY und KORNBERG, 1971). Die Expression von *dctA* unterliegt der CAP (catabolite activator protein)-abhängigen Katabolitrepession und wird ArcBA-abhängig anaerob ebenfalls reprimiert (DAVIES et al., 1999). Topologisch weist DctA acht Transmembranhelices, zwei Hairpinloops und jeweils eine periplasmatische sowie cytoplasmatische Helix auf (WITAN et al., 2012a). Bei einem niedrigeren pH-Wert von 5, übernimmt DauA (dicarboxylic acid uptake system A) die Aufgabe von DctA und katalysiert die Aufnahme von Succinat als Monocarboxylat in die Zelle (KARINOU et al., 2013).

Unter anaeroben Bedingungen werden DctA bzw. DauA durch insgesamt drei (vier) Transporter ersetzt. Im Gegensatz zum aeroben Symport, findet anaerob hauptsächlich ein Antiport statt (ENGEL et al., 1992). DcuA und DcuB sind benachbart codiert und werden zu unterschiedlichen Anteilen mono- bzw. polycistronisch mit den Genen der Aspartase bzw. Fumarase B (co-)transkribiert (SIX et al., 1994; GOLBY et al., 1998). Während die Expression von DcuA konstitutiv stattfindet, ist diese für DcuB abhängig von anaeroben Bedingungen und der Anwesenheit von  $C_4$ -Dicarboxylaten und unterliegt der Katabolitrepession (GOLBY et al., 1998). Die Hauptaufgabe im Transport wird von DcuB übernommen, der eine Affinität zu Fumarat von  $100 \mu\text{M}$  besitzt und topologisch aus 12 Transmembranhelices besteht (ENGEL et al., 1994; BAUER et al., 2011). Der dritte Transporter DcuC ist funktionell zu DcuA und DcuB ähnlich und kann deren Funktion ersetzen. Er ist aber von diesen phylogenetisch abzugrenzen und seine Hauptaufgabe besteht vermutlich im Succinat-Efflux während der Glucosefermentation (ZIENZT et al., 1996, 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit zu DcuC wurde die Existenz eines vierten Transporters, DcuD, beschrieben. Bisher konnte allerdings keine Funktion nachgewiesen werden (JANAUSCH und UNDEN, 1999).

## 2.2 Zwei-Komponenten-Systeme

Bakterien sind mit einer sich permanent verändernden Umwelt konfrontiert, bei der physikochemische Parameter wie Temperatur, Licht oder Sauerstoff variieren. Durch ihren einzelligen Aufbau sind sie dieser Umgebung unvermittelt ausgesetzt. Um auf verschiedenste Faktoren kurzfristig reagieren und zelluläre Prozesse einstellen zu können, besitzen Bakterien molekulare Anpassungsmechanismen. Bei diesen handelt es sich

häufig um Zwei-Komponenten-Systeme (ZKS) (KRELL et al., 2010). Sie machen rund ein Viertel aller prokaryotischen Signaltransduktionsproteine aus (ULRICH und ZHULIN, 2010). Daneben existieren vor allem Ein-Komponenten-Systeme, z.B. der Sauerstoffsensoren FNR (SPIRO und GUEST, 1990), oder alternative  $\sigma$ -Faktoren der ECF (extracytoplasmic function)-Familie (MASCHER, 2013). Zwei-Komponenten-Systeme sind dabei evolutionär aus den Ein-Komponenten-Systemen hervorgegangen und teilen sich ein Repertoire funktioneller Domänen (WUICHET et al., 2010).

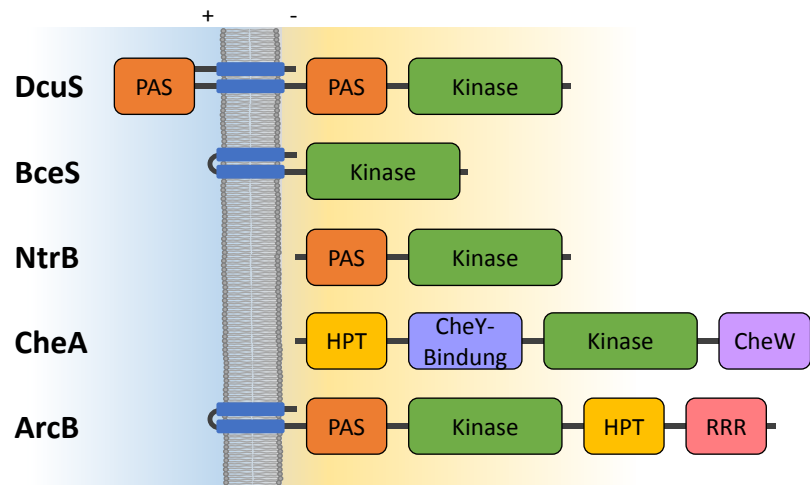
Bakterien besitzen durchschnittlich 52 dieser ZKS (COCK und WHITWORTH, 2007). Prototypisch bestehen sie aus zwei Proteinen, einer membranständigen Sensor-Histidinkinase und einem cytosolischen Responseregulator (GROSS et al., 1989). Der geteilte Aufbau aus zwei unabhängigen Proteinen und die räumliche Trennung machen es erforderlich, dass Sensor und Regulator miteinander wechselwirken. Diese Wechselwirkung besteht aus der Autophosphorylierung des Sensors und der anschließenden Transphosphorylierung des Regulators, d.h. der Übertragung der Phosphorylgruppe, wie erstmals für NtrBC, den Regulator der Stickstoff-Assimilierung, gezeigt werden konnte (NINFA und MAGASANIK, 1986; NIXON et al., 1986; BOURRET et al., 1991). Der phosphorylierte Responseregulator löst die Antwortreaktion des ZKS aus, die üblicherweise in der Transkriptionsregulation besteht (STOCK et al., 2000).

Auch für die Chemotaxis nutzt *E. coli* ein Zwei-Komponenten-System, allerdings ein modifiziertes. Fünf membranständige Chemorezeptoren die Lock- oder Schreckstoffe erkennen, z.B. der Aspartatrezeptor Tar oder der Aerotaxis-Rezeptor Aer, bilden den Input für den Sensor CheA, der im Komplex mit CheW vorliegt. Der Responseregulator des Systems CheY wechselwirkt mit Flagellenmotoren in der Zellhülle und wird in seiner Aktivität von CheZ beeinflusst. Mit CheB und CheR sind zwei weitere Proteine an der Chemotaxis beteiligt, die die Chemorezeptoren durch Methylierung und Demethylierung kontrollieren (ADLER, 1975; EISENBACH, 1996; BAKER et al., 2006).

### 2.2.1 Sensor-Histidinkinasen

Der Sensor eines Zwei-Komponenten-Systems wird von einer Histidinkinase gebildet, die als Homodimer vorliegt (STOCK et al., 2000). Es existieren cytosolische Histidinkinasen wie CheA (STOCK et al., 1988) oder NtrB (JIANG und NINFA, 1999). Alternativ können sie intramembran existieren wie z.B. BceS aus *Bacillus subtilis*, das im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Bacitracin steht, die Kinasedomäne ist aber

auch hierbei cytosolisch (MASCHER et al., 2003). Den weit aus größten Teil aller Sensor-Histidinkinasen (83 %) findet man jedoch wie DcuS in die Membran eingelassen (COCK und WHITWORTH, 2007). Abb. 2 gibt eine Übersicht.



**Abb. 2:** Aufbau und Lage ausgewählter Sensor-Histidinkinasen. PAS: Per-ARNT-Sim. HPT: Histidine containing phosphotransfer. RRR: Response regulator receiver. Verändert nach KRELL et al. (2010)

Aus der Membranständigkeit ergibt sich der prototypische Aufbau aus einer Empfänger-(oder Sensor-)domäne im Periplasma und einer Transmitter-(oder Kinase-)domäne im Cytoplasma, die beide durch eine Transmembrandomäne verbunden sind (GROSS et al., 1989). In der Regel liegen zwischen Transmembrandomäne und Kinasedomäne eine bis mehrere Domänen, wie etwa HAMP- (Histidinkinasen; Adenylcyclasen; Methylakzeptierende Proteine; Phosphatasen), GAF- (cGMP-spezifisch und -stimulierte Phosphodiesterasen, *Anabaena* Adenylatcyclasen und *Escherichia coli* FhlA) oder PAS (Per-ARNT-Sim)-Domänen (ARAVIND und PONTING, 1999; GALPERIN et al., 2001), die der Signalweiterleitung bzw. -integration dienen (APPLEMAN und STEWART, 2003; WITAN et al., 2012b). Auch zusätzliche Phosphorylierungsdomeänen können vorkommen, wodurch Hybridkinasen mit einem Phosphorelay-System entstehen. Dabei wird die Phosphorylgruppe innerhalb des Sensors mehrfach übertragen, ehe sie an den Responseregulator weitergegeben wird. Ein bekanntes Beispiel ist die Sensor-Histidinkinase ArcB (siehe Abb. 2), in der die Phosphorylgruppe vom ersten Histidin über einen Aspartatrest zum zweiten Histidin übertragen wird (KWON et al., 2000).

Die Sensordomäne dient der Signalerkennung, im einfachsten Fall durch eine direkte

Interaktion mit dem Effektormolekül. Es sind 14 verschiedene Sensordomänen bekannt, häufig sind es PAS-Domänen, es finden sich aber auch Faltungen wie die des Vier-Helix-Bündels in NarX (ULRICH et al., 2005; CHEUNG und HENDRICKSON, 2009). Die Affinität zum Effektor variiert je nach Sensor und liegt meist im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich (KASPAR et al., 1999; BUSCH et al., 2007). Die Bindung erfolgt stöchiometrisch pro Monomer, wie z.B. L-Malat in DcuS, oder zwischen den Monomeren eines Dimers wie Nitrat in NarX (CHEUNG und HENDRICKSON, 2008, 2009). Alternativ kann die Bindung nicht-stöchiometrisch und unspezifisch erfolgen. In PhoQ wird durch die Wechselwirkung von  $Mg^{2+}$  und antimikrobieller Peptide die Interaktion zwischen Sensor und Membran geschwächt und dieser dadurch aktiviert (BADER et al., 2005). Die Effektorbindung kann auch indirekt über einen Co-Faktor oder akzessorische Proteine erfolgen. *Rhizobium meliloti* FixL, das die Stickstoff-Fixierung reguliert, detektiert Sauerstoff durch einen kovalent gebundenen Häm-Cofaktor (GILLES-GONZALEZ und GONZALEZ, 1993). In TorSR ist es das Bindeprotein TorT, dass die Bindung des Elektronenakzeptor TMAO an den Sensor TorS vermittelt (BARAQUET et al., 2006).

Von der Sensordomäne wird das Signal über dazwischenliegende Transmembranhelices und/oder weitere Domänen zur Transmitterdomäne geleitet (Details siehe Abschnitt 2.5). Die Transmitterdomäne ist die eigentliche Kinase des Sensors. Sie katalysiert ihre ATP-abhängige Autophosphorylierung, die im Regelfall zwischen zwei Monomeren eines Homodimers *in trans* stattfindet (GAO und STOCK, 2009), aber auch *in cis*, etwa für ArcB, beschrieben wurde (PEÑA-SANDOVAL und GEORGELLIS, 2010). Die Kinasedomäne lässt sich gliedern in zwei funktionelle Einheiten (DHp und HATPase) oder sechs Homologie-Boxen (H-, X-, N-, D-, F- und G-Box; GREBE und STOCK (1999)). H- und X-Box bilden die DHp (dimerization and histidine phosphotransfer)-Subdomäne mit dem konservierten Histidinrest und zwei langen  $\alpha$ -Helices. Diese formen durch hydrophobe Wechselwirkungen ein Vier-Helix-Bündel des Dimers (MARINA et al., 2005). N-, D-, F- und G-Box sind Teil der katalytischen HATPase (CA: Catalytic and ATP binding), die die Autophosphorylierung mit ATP als Phosphorylgruppendonator katalysiert (MASCHER et al., 2006). Die Autophosphorylierung benötigt divalente Kationen ( $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ), die von einem Asparginrest in der N-Box koordiniert werden. Die Bindung des ATP erfolgt über dessen Adeninbase im Bereich der D-Box; F- und G-Boxen bilden einen Deckel, der gebundenes ATP einschließt (YAMADA und SHIRO, 2008). Die Katalyse erfolgt langsam mit Enzymaktivitäten ( $k_{cat}$ ) von 1 - 10  $\text{min}^{-1}$ . Das  $\gamma$ -Phosphat des ATP wird auf das N3-Atom des Imidazolrings des konservierten

Histidinrestes übertragen und eine energiereiche Phosphoramidat-Verbindung entsteht, deren Halbwertszeit von Histidinkinase zu Histidinkinase schwankt und im Mittel etwa 1 Stunde beträgt (KENNEY, 1997; LACAL et al., 2006; KRELL et al., 2010).

### 2.2.2 Phosphotransfer

Zwei monomere Responseregulatoren binden mit geringer Affinität an den Sensor und bilden einen Komplex, so bindet etwa CheY mit einer  $k_D$  von rund  $2 \mu\text{M}$  an die Sensorkinase CheA (YAMADA und SHIRO, 2008; WELCH et al., 1998). Dadurch werden der Histidinrest des Sensors und der Aspartatrest des Regulators in räumliche Nähe zueinander gebracht. In einem intermediären Komplex wird die Bildung eines fünffach-koordinierten Phosphoratoms zwischen  $N_\epsilon$  des Histidinrestes der  $O_\delta$  des Aspartatrestes vorgeschlagen (VARUGHESE et al., 2006). Die phosphorylierten Responseregulatoren lösen sich als Dimer aus dem Komplex.

Die Bindung zwischen Sensor und Responseregulator ist äußerst spezifisch. Cross-Talk, also die Interaktion zwischen nicht-zusammengehörigen Partnern, tritt äußerst selten auf (YAMAMOTO et al., 2005). Offen ist die Frage ob Cross-Talk eine biologische Funktion erfüllt oder eine unerwünschte Nebenreaktion, vor allem *in vitro*, darstellt (KRELL et al., 2010).

### 2.2.3 Responseregulatoren

Responseregulatoren sind cytosolische Proteine mit einer typischen Größe zwischen 20 und 30 kDa. Sie katalysieren den Phosphorylgruppentransfer von der zugehörigen Sensor-Histidinkinase auf ihren eigenen Aspartatrest (STOCK et al., 2000). Die meisten Responseregulatoren bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen Regulatordomäne und einer C-terminalen Effektor-domäne.

Die Regulatordomäne enthält den konservierten Aspartatrest, der die Phosphorylgruppe empfängt. Zusammen mit weiteren Aspartat- sowie einem Asparaginrest wird  $\text{Mg}^{2+}$  koordiniert, das für die Katalyse benötigt wird (LUKAT et al., 1990). Die Halbwertszeit des Acylphosphats liegt je nach Regulator zwischen Sekunden und Tagen (STEWART, 1993; LEWIS et al., 1999).

Die Phosphorylierung der Regulatordomäne verschiebt den Gleichgewichtszustand der Effektor-domäne vom inaktiven zum aktiven Zustand. Diese Aktivierung kann in der Ho-

modimerisierung bzw. Heterooligomerisierung oder einer weitreichenden Strukturveränderung bestehen (STOCK et al., 2000). Die Effektor-domäne ist typischerweise eine DNA-bindende Domäne zur Transkriptionsregulation. Es können zwei Typen unterschieden werden. In Regulatoren wie OmpR ist eine Erkennungshelix zentraler Bestandteil, die in der großen Furche der DNA-Doppelhelix bindet und von zwei Schleifen flankiert wird, die vermutlich in der kleinen Furche wechselwirken (MIZUNO, 1997). Regulatoren wie NarL nutzen hingegen das typische Helix-turn-Helix Motiv zur DNA-Bindung, bei der die Erkennungshelix ebenfalls in der großen Furche der Doppelhelix mit der DNA interagiert (HARRISON, 1991; BAIKALOV et al., 1996). Neben der Transkriptionsregulation sind auch Effektor-domänen bekannt die enzymatisch aktiv sind, wie z.B. die des CheB mit Methylsteraseaktivität (DJORDJEVIC et al., 1998). Alternativ kann eine Effektor-domäne dieser Art auch fehlen. CheY, Regulator der Chemotaxis, gibt sein Signal direkt an den Flagellenmotor weiter, indem es mit FliM interagiert (WELCH et al., 1993). Die Dephosphorylierung des Regulators wird entweder von ihm selbst oder von der Sensorkinase katalysiert. Eine Autodephosphorylierung findet sich bspw. bei CheY (WOLANIN et al., 2003). FixL ist andererseits eine Sensor-Histidinkinase mit Phosphataseaktivität für den Responseregulator (LOIS et al., 1993). Die dritte Alternative ist die Dephosphorylierung durch weitere Proteine, wie sie etwa in der Sporulationsregulation bei *Bacillus subtilis* gefunden wird. Hier sind es mehrere Phosphatasen, die Spo0F und Spo0A dephosphorylieren (PEREGO et al., 1994; OHLSEN et al., 1994).

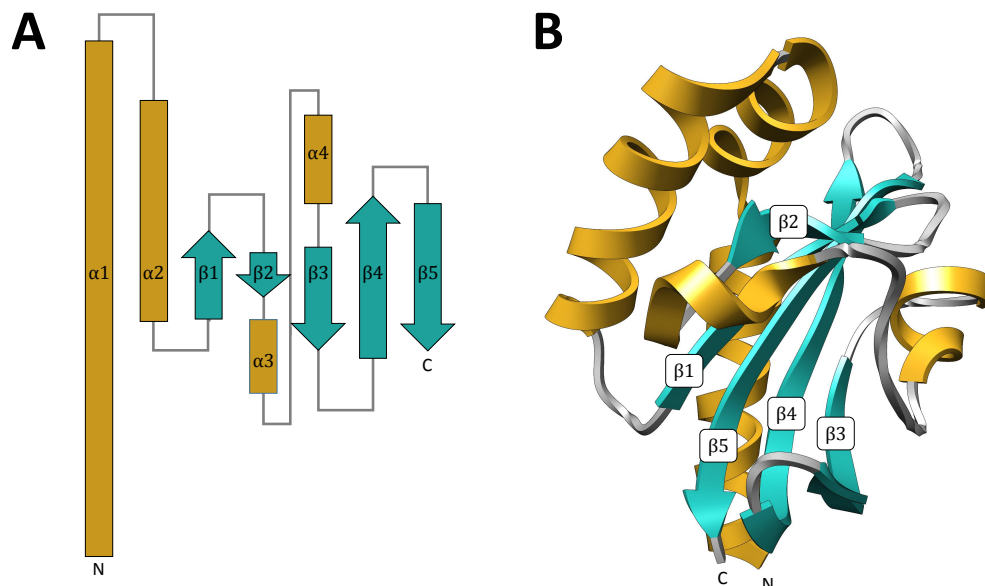
### 2.3 Per-ARNT-Sim (PAS)-Domänen

PAS-Domänen finden sich in allen drei Domänen des Lebens, d.h. Eukaryoten, Bakterien sowie Archaeen. Sie sind dort Bestandteile verschiedenster Proteine, wie z.B. Histidin- und Serin-/Theroninkinasen, Chemo- und Photorezeptoren, Ionenkanälen oder Phosphodiesterasen. Typischerweise sind sie in diesen Proteinen wichtige Sensormodule für die Detektion unterschiedlicher Stimuli wie Licht, das Redoxpotential und der Energiestatus der Zelle, Sauerstoff oder kleine Liganden (TAYLOR und ZHULIN, 1999).

Das Akronym PAS leitet sich von den drei Proteinen ab, in denen PAS-Domänen zuerst als eine homologe Region aus etwa 50 Aminosäureresten beschrieben wurden: PERIOD clock protein (Per), vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) und *Drosophila* single-minded protein (Sim) (HOFFMAN et al., 1991; NAMBU et al.,

1991). C-terminal zu dieser Region wurde anschließend das PAC-Motiv beschrieben (PONTING und ARAVIND, 1997). Basierend auf der ersten Kristallstruktur einer PAS-Domäne aus dem Photoaktiven gelben Protein (PYP) von *Halorhodospira halophila* (BORGSTAHL et al., 1995) wurden PAS- und PAC-Motiv letztlich zur gemeinsamen PAS-Domäne zusammengefasst (HEFTI et al., 2004).

Die Pfam Datenbank (Version 27.0, März 2013; FINN et al. (2006)) ordnet dieser PAS-Faltung über 88000 Sequenzen in fast 6000 Spezies zu. Der entsprechende Clan enthält 13 Familien. Die eigentliche PAS-Familie, zu der DcuS zählt, hat eine durchschnittliche Länge von 102 Aminosäureresten bei einer Sequenzidentität von im Schnitt 15 %. Trotz dieser geringen Homologie auf Sequenzebene besitzen PAS-Domänen eine konservierte dreidimensionale Faltung (HEFTI et al., 2004). Der PAS-Kern besteht aus einem zentralen und antiparallelen, fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt sowie mehreren  $\alpha$ -Helices in der Reihenfolge:  $\beta_1$ - $\beta_2$ - $\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_3$ - $\alpha_4$ - $\beta_3$ - $\beta_4$ - $\beta_5$ . Während Anzahl und Länge der  $\alpha$ -Helices variiert, ist das  $\beta$ -Faltblattgerüst strukturell sehr gut konserviert. Seine topologische Ordnung  $\beta_2$ - $\beta_1$ - $\beta_5$ - $\beta_4$ - $\beta_3$  ist daher das definierende Merkmal des PAS-Kerns (MÖGLICH et al., 2009) Abb. 3 zeigt diese Organisation und die Struktur der periplasmatischen PAS-Domäne am Bsp. von CitA aus *Klebsiella pneumoniae*.



**Abb. 3:** Organisation und Aufbau von PAS-Domänen. A: Topologische Organisation des PAS-Kerns aus fünf  $\beta$ -Strängen und vier  $\alpha$ -Helices am Bsp. von CitA aus *Klebsiella pneumoniae* (SEVVANA et al., 2008). B: Zugehörige Kristallstruktur der periplasmatischen PAS-Domäne von CitA (PDB #2J80)

Untergruppen dieser PAS-Domäne stellen z.B. die LOV- und PDC-Faltung dar, die charakteristisch für pflanzliche Phototropine bzw. bestimmte Sensordomänen (PhoQ, DcuS, CitA) sind (CROSSON et al., 2003; CHEUNG und HENDRICKSON, 2008). Da sie sich in ihrer Topologie jedoch kaum vom definierenden PAS-Kern unterscheiden, sind sie der PAS-Faltung zuzuordnen (MÖGLICH et al., 2009). Auf der anderen Seite existieren Faltungen, die zwar ebenfalls der PAS-Domäne ähneln, jedoch aufgrund bestimmter struktureller Eigenschaften als eigene Domänen klassifiziert werden, darunter GAF oder Cache (ANANTHARAMAN und ARAVIND, 2000; HO et al., 2000).

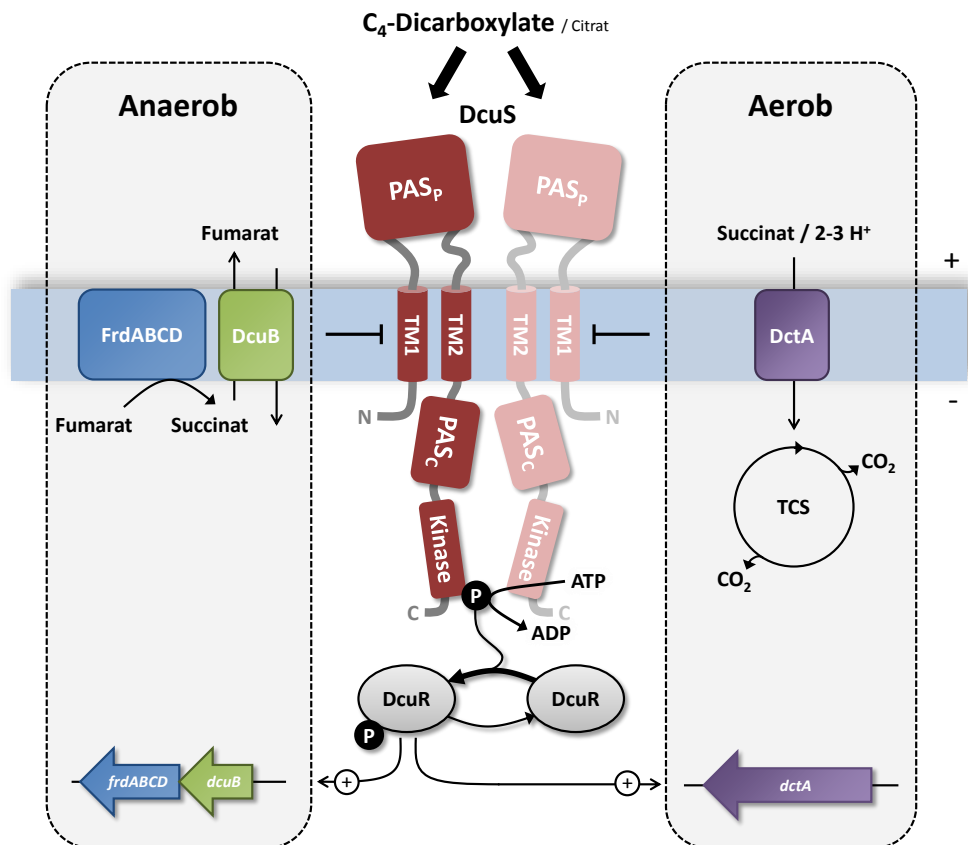
PAS-Domänen liegen in aller Regel als Dimer vor und fördern die Dimerisierung des zugehörigen Proteins (TAYLOR und ZHULIN, 1999). Die Dimerisierungsfläche wird größtenteils von hydrophoben Resten des  $\beta$ -Faltblattgerüsts sowie flankierenden  $\alpha$ -Helices gebildet (CARD et al., 2005; ZHOU et al., 2008; LITTLE et al., 2012). Wie für eine der beiden PAS-Domänen von FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* gezeigt, können dabei verschiedene quaternäre Strukturen existieren und es sind nur geringe Änderungen der freien Energie nötig um eine drastische Lageänderung der Monomere zu bewirken (AYERS und MOFFAT, 2008).

### 2.4 DcuSR und C<sub>4</sub>-Dicarboxylate: Rezeption und Regulation

DcuSR (dicarboxylate uptake sensor/regulator) besteht als klassisches Zweikomponentensystem aus der membranständigen Sensor-Histidinkinase DcuS und dem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR. Gemeinsam regulieren sie die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit dem aeroben und anaeroben Stoffwechsel von C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten in *E. coli* stehen, bspw. den Transporter DcuB oder die Fumaratreduktase FrdABCD (ZIENZT et al., 1998). Die Expression der Gene *dcuS* und *dcuR* erfolgt konstitutiv, wird aber durch NarXL negativ und durch cAMP/CAP positiv reguliert (GOH et al., 2005; OYAMADA et al., 2007).

Das Zweikomponentensystem DcuSR benötigt akzessorische Proteine um seine Funktionalität zu erlangen. Bei diesen handelt es sich um die C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB, die unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen die Aufgabe eines Co-Regulators übernehmen. DcuS und die Transporter wechselwirken über eine direkte Protein-Protein-Interaktion und bilden dadurch einen Sensorkomplex (WITAN et al., 2012a; WITAN, 2012). Die Deletion eines Transporters auf genetischer Ebene aktiviert

DcuS effektorunabhängig (KLEEFELD et al., 2009; WITAN et al., 2012a). Die regulatorische Funktion des Antiporters DcuB unter anaeroben Bedingungen kann bei dessen Deletion durch plasmidcodiertes DctA komplementiert werden (WITAN et al., 2012a). Entgegen ursprünglicher Annahmen, fungieren die Transporter nicht als cosensorische Messeinheiten des metabolischen Fluxes, sondern versetzen den Sensor DcuS in einen rezeptiven Zustand. Die eigentliche Signaleingangsstelle des Sensorkomplexes liegt ausschließlich in DcuS (STEINMETZ et al., 2014). Abb. 4 illustriert Aufbau und Funktion des Zweikomponentensystems DcuSR.



**Abb. 4:** Aufbau und Funktion des Zweikomponentensystems DcuSR aus *E. coli*. Die Detektion von Effektoren durch die Sensor-Histidinkinase im Periplasma führt zur Autophosphorylierung der Kinasedomäne im Cytoplasma. Nach Phosphorylgruppentransfer auf den Responsoreffektor DcuR stimuliert dieser die Expression unterschiedlicher Gene, abhängig von Sauerstoff. Anaerob katalysiert der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DcuB die Aufnahme von Fumarat im Austausch gegen Succinat, das durch die Reaktion der Fumaratreduktase (FrdABCD) gebildet wird. Aerob wird Succinat über den C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA in die Zelle aufgenommen und dort im Citratzyklus (CZ) zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Die Arbeitsweise von DcuSR als Dimer ist hier angedeutet, zur besseren Übersicht wurde die ausgelöste Signalkaskade nur für ein System dargestellt.

### 2.4.1 Der Sensor DcuS

Die Sensor-Histidinkinase DcuS besteht aus 543 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 60,6 kDa. Mit einer Sequenzidentität von 27 % zu CitA, dem Citratsensor aus *Klebsiella pneumoniae*, gehört sie zur CitA-Familie von Sensor-Histidinkinasen (JANAUSCH et al., 2002a). DcuS zeigt eine Akkumulierung an den Zellpolen von *E. coli*, die durch den Effektor Fumarat weiter gesteigert wird (SCHEU et al., 2008). Außerdem ist DcuS ein funktionelles Homodimer oder höheres Homooligomer und der Oligomerisierungsgrad ist unabhängig von Effektoren (SCHEU et al., 2010b).

DcuS setzt sich aus vier Domänen zusammen, der periplasmatischen PAS-Domäne ( $PAS_p$ ), der Transmembrandomäne (bestehend aus den Helices TM1 und TM2), der cytoplasmatischen PAS-Domäne ( $PAS_c$ ) und der Kinasedomäne. Die beiden Transmembranhelices 1 und 2 sind für die Positionen 21 - 41 bzw. 182 - 202 vorhergesagt, d.h. mit einer Länge von 21 Aminosäuren entsprechen sie durchschnittlichen Transmembranhelices (BAEZA-DELGADO et al., 2013). Sie sorgen für die Verankerung des Sensor in der Cytoplasmamembran und lassen N- sowie C-Terminus sich im Cytoplasma befinden. Außerdem trägt die zweite Transmembranhelix zur Dimerisierung bei und bildet hierzu ein SmallxxxSmall-Motiv aus (STEINMETZ, 2014).

$PAS_p$  ist die eigentliche Sensordomäne die die Effektoren direkt bindet, allerdings mit einer Affinität für  $C_4$ -Dicarboxylate (2-3 mM), die deutlich geringer ist als die Affinität der entsprechenden Transporter.  $PAS_p$  erstreckt sich über die Aminosäurereste 42 - 181 und zeigt die typische Faltung von PAS-Domänen (siehe Abschnitt 2.3) aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblattgerüst und sechs  $\alpha$ -Helices (CHEUNG und HENDRICKSON, 2008). Sie weist ein breites Substratspektrum auf und erkennt neben zahlreichen  $C_4$ -Dicarboxylaten auch das  $C_6$ -Tricarboxylat Citrat. Da viele Substituenten an den Positionen C2 und C3 der  $C_4$ -Dicarboxylate toleriert werden ist ein Abstand der Carboxygruppen von 3,1 - 3,8 Å entscheidend (JANAUSCH et al., 2002b; KNEUPER et al., 2005). Die Bindeta-sche wird im Bereich des  $\beta$ -Faltblattgerüsts geformt. Für L-Malat, in dessen Gegenwart die Kristallstruktur von  $PAS_p$  bestimmt wurde, sind Atome des Rückgrats von K121, G140, F141 und L142 sowie die Seitenketten der Reste R107, H110 und R147 an der Koordinierung des Effektors beteiligt (CHEUNG und HENDRICKSON, 2008).

$PAS_c$  schließt sich an die zweite Transmembranhelix an und ist mit dieser über einen kurzen Linker (203 - 211) verbunden. Sie ist kleiner als  $PAS_p$ , dehnt sich über die Aminosäurereste 212 - 323 aus und besteht aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt sowie fünf

$\alpha$ -Helices (ETZKORN et al., 2008). Sie bindet keine Cofaktoren oder Stimuli und dient der Signalweiterleitung (DEGREIF-DÜNNWALD, 2011).

Die Kinasedomäne bildet den Signalausgang des Sensors. Dessen Aktivierung, durch Effektorbindung in  $PAS_p$ , löst die Autophosphorylierung aus. Dabei wird die terminale Phosphorylgruppe von ATP auf den konservierten Histidinrest 349 übertragen (JANAUSCH et al., 2002b).

#### 2.4.2 Der Regulator DcuR

Der Responseregulator DcuR umfasst 239 Aminosäuren, die ihm ein Molekulargewicht von 27,5 kDa verleihen. Seine N-terminale Regulatordomäne schließt den konservierten Aspartatrest 56 ein und die C-terminale Effektoromäne bildet ein Helix-turn-helix (H-T-H)-Motiv. DcuR wird an diesem Aspartatrest phosphoryliert, wobei das phosphorylierte Histidin 349 von DcuS als Phosphorylgruppendonor dient. In der Folge dime-riert der Responseregulator und bindet über das an H-T-H-Motiv an die DNA. Bei den Bindestellen handelt es sich um AT-reiche Regionen, ca. 30 - 90 bp stromaufwärts von Promotoren regulierter Gene wie z.B. *dctA*, *dcuB* oder *frdABCD* (ABO-AMER et al., 2004; JANAUSCH et al., 2004). Um kein permanentes Signal zu erzeugen, besitzt der Responseregulator DcuR eine intrinsische Phosphataseaktivität, die für seine Autodephosphorylierung sorgt (KRÄMER, 2008).

### 2.5 Intramolekulare Signaltransduktion in bakteriellen Sensoren

Die Trennung von Empfänger- und Transmitterdomäne in Sensor-Histidinkinasen und Chemorezeptoren führt zur Aufspaltung von Signaleingang und -ausgang. Die räumliche Separation macht daher eine intramolekulare Signaltransduktion zwingend notwendig. Typischerweise liegen zwischen Sensor- und Kinasedomäne sowohl die Transmembran-domäne als auch weitere cytoplasmatische Domänen, wie z.B.  $PAS_c$  in DcuS (JANAUSCH et al., 2002a) oder eine HAMP-Domäne im Aspartat-Chemorezeptor Tar (ARAVIND und PONTING, 1999). Der Signaltransfer innerhalb des Sensors erfordert weitreichende Konformationsänderungen, die Kompartimentsgrenzen überwinden müssen und sich über Distanzen von 150 Å oder mehr erstrecken können (FALKE und ERBSE, 2009).

### 2.5.1 Signalinitiation in der Sensordomäne

Die intramolekulare Signaltransduktion wird durch die Aktivierung der Sensordomäne initiiert. Im Chemorezeptor Tar bindet die periplasmatische Bindedomäne Aspartat an zwei Positionen der Schnittfläche des Homodimers mit negativer Kooperativität (YEH et al., 1996). Die Bindung löst eine Abwärtsbewegung der C-terminalen Helix um 1,6 Å in Richtung Membran aus, die zusätzlich mit einer Drehung um 5° verbunden ist (FALKE und HAZELBAUER, 2001).

Eine ähnliche Konformationsänderung wurde auch für NarX und TorS beschrieben, die an der Kontrolle der anaeroben Atmung beteiligt sind (JOURLIN et al., 1996; LEE et al., 1999). Ähnlich wie Tar besteht die Sensordomäne von NarX aus einem Vier-Helix-Bündel und bindet Nitrat im Bereich der Schnittfläche des Dimers. Die Bindung stabilisiert das Dimer und bewirkt eine Abwärtsbewegung der N-terminalen gegenüber der C-terminalen Helices um rund 1 Å (CHEUNG und HENDRICKSON, 2009). TorS weist zwei gestapelte Vier-Helix-Bündel auf. Die Bindung von TMAO erfolgt nicht direkt, sondern wird durch das Bindeprotein TorT vermittelt (BARAQUET et al., 2006). Dadurch wird das symmetrische Heterotetramer aus TorS und TorT asymmetrisch und es kommt zu einer Aufwärtsbewegung der proximalen  $\alpha$ -Helices 3 und 6 gegenüber 1 und 2 um ca. 3 Å (MOORE und HENDRICKSON, 2009, 2012).

Ebenfalls mit einem Bindeprotein heterooligomer verknüpft ist die Sensor-Histidinkinase LuxQ aus *Vibrio harveyi*, die Teil der Quorum sensing-Regulation ist (BASSLER et al., 1994; CHEN et al., 2002). Die Bindung des Signalmoleküls (Autoinducer-2, AI-2) an LuxP führt zu einer starken Rotation zwischen beiden Heterodimeren eines Heterotetramers, d.h. LuxPQ dreht sich 40° um LuxP'Q', ein asymmetrisches Dimer zweier LuxPQ-Dimere entsteht (NEIDITCH et al., 2006).

Dazu strukturell völlig anders aufgebaut ist die Sensordomäne von CitA. Im Citrat-sensor CitA aus *Klebsiella pneumoniae* führt die Bindung des Effektors zur Biegung des  $\beta$ -Faltblattgerüsts einer PAS-Domäne. Eine kompaktere Tasche um das gebundene Citratmolekül herum entsteht und der C-terminale  $\beta$ -Strang entfernt sich von der Membranoberfläche (SEVVANA et al., 2008).

Im membranständigen Sensor der Aerotaxis Aer befindet sich die PAS-Sensordomäne im Cytoplasma. Zur Erkennung des intrazellulären Redoxpotentials besitzt sie einen FAD-Cofaktor. Die Aktivierung der Sensordomäne verändert deren Wechselwirkung mit der HAMP-Domäne, die die Verbindung zur Kinase herstellt (WATTS et al., 2011).

Mit Ausnahme von Aer, wo Sensor- und HAMP-Domäne im direkten Kontakt stehen, erfordert der membranständige Aufbau der Sensor-Histidinkinasen nach der Initiierung des Signals in der Sensordomäne, dessen konformative Weiterleitung über die Transmembrandomäne hinweg.

### 2.5.2 Signaltransduktion durch die Transmembrandomäne

Cytoplasmamembranen sind selbstorganisierte Doppelschichten (Bilayer) aus Phospholipiden, deren hydrophober Kern etwa 30 Å dick ist und auf beiden Seiten von einer Übergangszone zur wässrigen Phase mit einer Stärke von ca. 15 Å umgeben ist, die von den polaren Kopfgruppen der Phospholipide gebildet wird (WIENER und WHITE, 1992). Integrale Membranproteine müssen diese Distanz und deren lipophiles Milieu durchqueren und nutzen dazu neben  $\beta$ -Faltblattstrukturen (vor allem in der Äußeren Membran gramnegativer Bakterien) häufig  $\alpha$ -Helices aus rund 20 Aminosäuren (HEDIN et al., 2011).  $\alpha$ -Helices sind in dieser hydrophoben Umgebung energetisch günstig, da polare Gruppen des Polypeptidrückgrats untereinander Wasserstoffbrücken ausbilden und so die eigene Polarität abschirmen können (BAEZA-DELGADO et al., 2013).

Der typische Aufbau einer Sensor-Histidinkinase umfasst zwei solcher Transmembranhelices, eine N-terminal (TM1) vor der Sensordomäne und eine zwischen Sensor- und Kinasedomäne bzw. zwischen Sensordomäne und weiteren cytoplasmatischen Domänen (TM2). Die zweite Transmembranhelix verbindet daher den Signaleingang mit dem Signalausgang und übernimmt folglich die Hauptfunktion in der Signaltransduktion über die Membrangrenzen hinweg.

Am Besten untersucht ist die Rolle von TM2 in der Signaltransduktion der Chemorezeptoren, insbesondere Tar. Die oben beschriebene Abwärtsbewegung der C-terminalen Helix  $\alpha_4$  der periplasmatischen Sensordomäne gegenüber  $\alpha_1$  soll sich entsprechend auf die unmittelbar anschließende zweite Transmembranhelix auswirken (CHERVITZ und FALKE, 1996). Dieser Rückschluss von der Konformationsänderung der Sensordomäne auf die Bewegung der Transmembranhelix wird durch mehrere Untersuchungen unterstützt. Unterschiedliche Disulfidbrücken zwischen  $\alpha_1$ /TM1 und  $\alpha_4$ /TM2 können, je nach Lage, beide Signalzustände des Chemorezeptors einfangen (CHERVITZ und FALKE, 1995). Oxidatives Cystein-Crosslinking zwischen Cysteinresten benachbarter Helices eines Monomers zeigte eine Variation zwischen beiden Signalzuständen, deren Art für eine Verschiebung spricht (HUGHSON und HAZELBAUER, 1996). Durch Elektronenspin-

resonanz (EPR, electron paramagnetic resonance)-Spektroskopie wurden Abstandsmessungen zwischen ausgewählten Positionen innerhalb der TM-Domäne der Chemorezeptoren durchgeführt. Die gemessenen Veränderungen lassen sich am Besten mit einer axialen Bewegung von TM2 relativ zu TM1 erklären (OTTEMANN et al., 1999). Schließlich lässt sich der Chemorezeptor durch das Neupositionieren eines Tryptophanrestes an der Grenze Membran/Cytoplasma oder der Austausch dieses Restes durch Arginin in seiner Aktivität verändern. Repositionierung und Austausch entsprechen dabei den Vorstellungen einer longitudinalen Verschiebung von TM2 (MILLER und FALKE, 2004; DRAHEIM et al., 2005). Diese Art der Translokation erinnert an die Bewegung des Kolbens im Zylinder einer Verbrennungsmaschine. Als Kolbenhub bezeichnet man dort die Strecke die der Kolben zwischen dem oberen und unteren Totpunkt zurücklegt. Daher wurde durch CHERVITZ und FALKE (1996) der Begriff der "Kolbenhubbewegung" (piston type) für die senkrechte und axiale Verschiebung einer Transmembranhelix geprägt. Basierend auf den strukturellen Veränderungen ihrer periplasmatischen Sensordomänen zwischen beiden Signalzuständen wurden für die Sensorkinasen NarX, TorS und CitA ebenfalls Kolbenhubmechanismen vorgeschlagen, ohne allerdings direkte Nachweise für den Bereich der Transmembranhelices zu erbringen (CHEUNG und HENDRICKSON, 2009; MOORE und HENDRICKSON, 2009; SEVVANA et al., 2008).

Für LuxQ wird hingegen angenommen, dass sich der gleiche Wechsel zwischen Symmetrie und Asymmetrie, wie er für die periplasmatische Sensordomäne und das zugehörige Bindeprotein LuxP beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.5.1), ebenfalls im Bereich der Transmembrandomäne des Dimers abspielt (STOCK, 2006). Ein direkter experimenteller Nachweis fehlt auch hier.

Hinsichtlich der Signalweiterleitung durch seine Transmembranhelices gut charakterisiert ist dagegen der Sensor PhoQ. Experimentell wurden dazu Daten aus Disulfid Crosslinking-Experimenten mit MD (molecular dynamics)-Simulationen und Bayesscher Statistik kombiniert. Essentiell für die Anordnung der Transmembranhelices ist der Rest N202, der eine polare Tasche zwischen den beiden TM2 in der Transmembrandomäne eines Dimers bildet. Der Stimuli (Konzentrationsänderung an zweiwertigen Kationen) bewirkt die diagonale scherenförmige Bewegung aller vier TM-Helices eines Dimers an ihrem periplasmatischen Ende, die in eine Rotation am cytoplasmatischen Ende übersetzt wird. Der Prolinrest 208 am cytoplasmatischen Ende von TM2 soll dabei an der Modulation der unterschiedlichen Bewegungen beteiligt sein (LEMMIN et al., 2013; MOLNAR et al., 2014).

### 2.5.3 Signaltransduktion durch weitere cytoplasmatische Domänen

Die zweite Transmembranhelix ist häufig nicht unmittelbar mit der Kinasedomäne verbunden. Stattdessen liegen dazwischen weitere cytoplasmatische Domänen wie HAMP oder PAS, die das Signal zur Kinasedomäne weiterleiten (KRELL et al., 2010).

Am besten untersucht sind HAMP-Domänen, die etwa im Aspartat-Chemorezeptor Tar oder der Sensor-Histidinkinase NarX vorkommen (ARAVIND und PONTING, 1999). HAMP-Domänen umfassen etwa 50 Aminosäurereste und bestehen aus zwei amphiphilen Helices (AS1 und AS2), die durch eine nicht helikale Struktur verknüpft sind und im Dimer ein dynamisches Vier-Helix-Bündel bilden. HAMP-Domänen kontrollieren die Kinasedomäne, die im Grundzustand aktiv ist. Es wird ein Drei-Phasen-Modell vorgeschlagen, bei dem die HAMP-Domäne zwischen zwei Zuständen A und B wechselt. In der Übergangsphase zwischen diesen beiden Zuständen, ist die Stabilität des dynamischen Vier-Helix-Bündels geschwächt, was sich auf die unmittelbar anschließenden  $\alpha$ -Helices der Kinasedomäne auswirkt und wodurch diese aktiviert wird (PARKINSON, 2010).

PAS-Domänen sind die häufigsten Sensordomänen in Sensor-Histidinkinasen (ULRICH und ZHULIN, 2010). Man findet jedoch auch zusätzliche PAS-Domänen, wie etwa in TodS oder NifL aus *Pseudomonas putida* bzw. *Azotobacter vinelandii*. Diese PAS-Domänen sind kaum charakterisiert. Häufig vermutete man dort zusätzliche Signaleingänge, wie etwa für PAS2 in TodS, dass auf Grund seiner Ähnlichkeit zur Sensordomäne von FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* der Detektion von Sauerstoff dienen könnte (LAU et al., 1997) und zur Feinregulation der TodS-Kinaseaktivität beitragen soll (BUSCH et al., 2009). In NifL wird ein Stimulus in PAS1 zu PAS2 weitergeleitet und stimuliert nachfolgend die Kinaseaktivität. Wird dieser Stimulus durch bestimmte ON-Mutationen in der isolierten PAS2-Domäne nachgestellt, kommt es zum Verlust der Homodimerisierung. Die Signaltransduktion erfolgt demnach durch eine veränderte Quartärstruktur zwischen beiden Signalzuständen (SLAVNY et al., 2010). Ähnliche quaternäre Veränderungen wurden für die PAS-Domänen von YtvA aus *Bacillus subtilis* und FixL beschrieben (MÖGLICH und MOFFAT, 2007; AYERS und MOFFAT, 2008). Da für keine dieser zusätzlichen PAS-Domänen ein direkter Stimulus nachgewiesen werden konnte, schreibt man diesen Domänen aktuell Rollen in der Signaltransduktion und -integration zu, ohne jedoch die exakten Strukturänderungen zu kennen (MÖGLICH et al., 2009; MÖGLICH et al., 2010).

### 2.6 Ziel der Arbeit

Seit der ersten Beschreibung durch ZIENTZ et al. (1998) ist das Zweikomponentensystem DcuSR Gegenstand intensiver Forschung. Einzelne Domänen der Struktur wurden unabhängig voneinander aufgeklärt (PAPPALARDO et al., 2003; ETZKORN et al., 2008; CHEUNG und HENDRICKSON, 2008). Die Effektorbindung in PAS<sub>p</sub> wurde detailliert beschrieben (KNEUPER et al., 2005; KRÄMER et al., 2007; CHEUNG und HENDRICKSON, 2008). Sowohl die Autophosphorylierung des Sensors als auch der Phosphorylgruppen-transfer auf den Responeregulator wurden *in vitro* analysiert (JANAUSCH et al., 2002b; KRÄMER, 2008). Die Ausbildung eines Sensorkomplexes aus DcuS und den Transportern DctA und DcuB wurde nachgewiesen und die Rollen der beteiligten Partner verstanden (KLEEFELD et al., 2009; WITAN et al., 2012a; STEINMETZ et al., 2014).

Während also Signaleingang und -ausgang von DcuS gut charakterisiert wurden, herrscht Unklarheit über den Aspekt des intramolekularen Signaltransfers. Wie sorgt die Effektorbindung in PAS<sub>p</sub> für die Autophosphorylierung des rund 150 Å entfernten Histidinrestes in der Kinasedomäne? Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Fragestellung wie das Signal über die Membran gelangt. Die bisherige Annahme eines Kolbenhubmechanismus für die Bewegung von TM2 in der Signaltransduktion wurde lediglich von anderen Proteinen abgeleitet (SCHEU et al., 2010a). Sie beruhte vor allem auf Untersuchungen an Chemorezeptoren und zum Teil auf Strukturen verwandter Sensordomänen. Eine direkte Analyse im Bereich der Transmembrandomäne fehlt bisher für Sensor-Histidinkinasen und soll mit dieser Arbeit erbracht werden.

Die intramolekulare Signaltransduktion sollte durch Ermittlung der Konformationsänderungen von TM1 und TM2 zwischen beiden Signalzuständen analysiert werden. Dazu sollte die Zugänglichkeit einzelner Reste bezüglich ihrer Lage innerhalb oder außerhalb der Membran untersucht und um Cystein-Crosslinking-Experimente ergänzt werden. Die beiden Signalzustände von DcuS sollten auf unterschiedliche Weisen hergestellt bzw. simuliert werden und Funktions- mit Konformationsänderungen verglichen werden.

Darüberhinaus sollten Mutationen in PAS<sub>c</sub> gesucht werden, die Hinweise auf die Funktion von PAS<sub>c</sub> im Signaltransfer geben. Dazu wurden Mutationen von PAS<sub>c</sub> identifiziert und charakterisiert, die im Signaltransfer verändert sind. Darunter fallen Mutationen, die DcuS effektorunabhängig aktivieren. Schließlich sollten aus der Lage im Protein und dem Phänotyp solcher ON-Mutationen Rückschlüsse über die Funktionweise und die Signaltransduktion von und durch PAS<sub>c</sub> gezogen werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Stämme, Plasmide und Primer

#### 3.1.1 Stämme und Viren

**Tab. 1:** Verwendete Stämme von *E. coli* K-12

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
AN387	Wildtyp	WALLACE und YOUNG (1977)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdSB</i> (rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	STUDIER und MOFFATT (1986)
BTH101	F <sup>-</sup> <i>cyo-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> ( <i>Str<sup>r</sup></i> ), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	KARIMOVA et al. (2005)
C43(DE3)	spontane Mutation von BL21(DE3) zur Überproduktion von Membranproteinen	MIROUX und WALKER (1996)
IMW260	MC4100, λ(Φ( <i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> )hyp, <i>bla</i> , <i>dcuS</i> :: <i>Cam<sup>R</sup></i> )	ZIENTZ et al. (1998)
IMW237	MC4100, λ(Φ( <i>dcuB</i> '-' <i>lacZ</i> )hyp, <i>bla</i> )	ZIENTZ et al. (1998)
IMW385	MC4100, λ(Φ( <i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i> )hyb, <i>bla</i> )	KLEEFELD (2006)
IMW386	P1(MDO800) x IMW385, <i>dctA</i> :: <i>Spc<sup>R</sup></i> , λ(Φ( <i>dctA</i> '-' <i>lacZ</i> )hyb, <i>bla</i> )	KLEEFELD (2006)
IMW609	P1(MDO800) x C43(DE3), C43(DE) aber <i>dctA</i> :: <i>Spc<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ</i> ( <i>lac-proAB</i> ) F'[ <i>traD36 proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacIq lacZΔM15</i> ]	YANISCH-PERRON et al. (1985)
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139 Δ</i> ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169</i> , <i>rpsL150</i> , ( <i>ΔlacZ</i> ), <i>relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	SILHAVY et al. (1984)
MDO800	AN387, aber <i>dctA</i> :: <i>Spc<sup>R</sup></i>	SIX et al. (1994)
XL1-blue	F <sup>-</sup> , <i>recA1</i> <sup>-</sup> , ( <i>mk</i> <sup>+</sup> , <i>rk</i> <sup>-</sup> ) <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , λ <sup>-</sup> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , ( <i>lac</i> <sup>-</sup> ) [F <sup>-</sup> , <i>proAB</i> , <i>lacIq</i> , <i>ZΔM15 Tn10</i> ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )]	Stratgene

**Tab. 2:** Verwendete Viren

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
P1 <sub>kc</sub>	Bakteriophage für <i>E. coli</i> Infektion	MILLER (1992)

#### 3.1.2 Plasmide

**Tab. 3:** Allgemeine Ursprungsvektoren

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pET28a	Überexpressionsplasmid, His-Tag, Kan <sup>R</sup>	Novagen

### 3 Material und Methoden

**Tab. 4:** Verwendete Plasmide für Reportergergenmessungen

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW181	pET28a mit 2,2 kb <i>Xba</i> I / <i>Hind</i> III-Fragment <i>dcuS</i> (mit eigenem Promoter), Kan <sup>R</sup>	KNEUPER et al. (2005)
pMW421	pMW181 aber DcuS-N248D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW488	pMW181 aber DcuS-N304D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW667	pMW181 aber DcuS-V276A, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1400	pMW181 aber DcuS-C199R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1401	pMW181 aber DcuS-I200R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1418	pMW181 aber DcuS-L201R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1419	pMW181 aber DcuS-V202R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1545	pMW181 aber DcuS-W181R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1546	pMW181 aber DcuS-W185R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1554	pMW181 aber DcuS-I231F, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1555	pMW181 aber DcuS-E233G, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1556	pMW181 aber DcuS-V235D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1557	pMW181 aber DcuS-V236D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1578	pMW181 aber DcuS-I196R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1579	pMW181 aber DcuS-G197R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1580	pMW181 aber DcuS-T198R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1581	pMW181 aber DcuS-K203R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1582	pMW181 aber DcuS-V204R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1583	pMW181 aber DcuS-L205R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1584	pMW181 aber DcuS-K206R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1585	pMW181 aber DcuS-ΔR180, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1586	pMW181 aber DcuS-ΔS179-R180, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1587	pMW181 aber DcuS-ΔD178-R180, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1602	pMW181 aber DcuS-ΔN177-R180, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1622	pMW181 aber DcuS-ΔI176-R180, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1623	pMW181 aber DcuS-ΔQ175-R180, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1671	pMW181 aber DcuS-ΔV204, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1672	pMW181 aber DcuS-ΔV204-L205, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1673	pMW181 aber DcuS-ΔV204-K206, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1674	pMW181 aber DcuS-ΔV204-K207, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1675	pMW181 aber DcuS-ΔK203-G211, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1676	pMW181 aber DcuS-ΔS182, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1677	pMW181 aber DcuS-ΔS182-I183, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1678	pMW181 aber DcuS-ΔS182-I184, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1679	pMW181 aber DcuS-ΔS182-W185, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1720	pMW181 aber DcuS-F221I, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1725	pMW181 aber DcuS-M227L, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW1726	pMW181 aber DcuS-M227T, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1727	pMW181 aber DcuS-M227V, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1729	pMW181 aber DcuS-E233D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1757	pMW181 aber DcuS-A237D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1758	pMW181 aber DcuS-I247D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1759	pMW181 aber DcuS-I318D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1816	pMW181 aber DcuS-L228D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1828	pMW181 aber DcuS-V308D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW2021	pMW181 aber DcuS-S182R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2022	pMW181 aber DcuS-I183R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2023	pMW181 aber DcuS-I184R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2024	pMW181 aber DcuS-S186R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2119	pMW181 aber DcuS-C199W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2120	pMW181 aber DcuS-I200W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2121	pMW181 aber DcuS-L201W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2122	pMW181 aber DcuS-V202W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2123	pMW181 aber DcuS-K203W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2124	pMW181 aber DcuS-V204W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2125	pMW181 aber DcuS-L205W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2126	pMW181 aber DcuS-K206W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2127	pMW181 aber DcuS-K207W, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tab. 5:** Verwendete Plasmide für das BACTH-System

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pUT18	Plasmid zur Expression von N-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat, Amp <sup>R</sup>	KARIMOVA et al. (2005)
pUT18C	Plasmid zur Expression von C-terminalen T18-Fusionen, pUC19 Derivat, Amp <sup>R</sup>	KARIMOVA et al. (2005)
pUT18C-zip	T18-Zip Expressionsplasmid, pUT18C-Derivat, Amp <sup>R</sup>	KARIMOVA et al. (2005)
pKT25	Plasmid zur Expression von C-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, Kan <sup>R</sup>	KARIMOVA et al. (2005)
pKNT25	Plasmid zur Expression von N-terminalen T25-Fusionen, pSU40 Derivat, Kan <sup>R</sup>	KARIMOVA et al. (2005)
pKT25-Zip	T25-Zip Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan <sup>R</sup>	KARIMOVA et al. (2005)
pMW426	T25-DcuS Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan <sup>R</sup>	SCHEU et al. (2012)
pMW429	T18-DcuS Expressionsplasmid, pUT18C-Derivat, Amp <sup>R</sup>	SCHEU et al. (2012)
pMW856	T25-DctA Expressionsplasmid, pKT25-Derivat, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW950	DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18 Expressionsplasmid (DcuS(1-326)), pUT18-Derivat, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW951	DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25 Expressionsplasmid (DcuS(1-326)), pKNT25-Derivat, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)

### 3 Material und Methoden

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW991	pMW951, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25-N248D, Kan <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW992	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-N248D, Amp <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW993	pMW951, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25-N304D, Kan <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW994	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-N304D, Amp <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW1034	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-L228A, Amp <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW1035	pMW951, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25-R322A, Kan <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW1036	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-R322A, Amp <sup>R</sup>	DEGREIF-DÜNNWALD (2011)
pMW1075	PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25 Expressionsplasmid (DcuS(211-539)), pKNT25-Derivat, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1076	PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18 Expressionsplasmid (DcuS(211-539)), pUT18-Derivat, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1564	pMW429, aber T18-DcuS-L246R, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1565	pMW426, aber T25-DcuS-L246R, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1566	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-L246R, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1567	pMW951, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25-L246R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1568	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-L228A, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1569	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-L228A, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1570	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-L246R, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1571	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-L246R, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1572	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-N248D, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1573	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-N248D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1576	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1577	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-N304D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1618	pMW429, aber T18-DcuS-V235D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1619	pMW426, aber T25-DcuS-V235D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1620	pMW429, aber T18-DcuS-V236D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1621	pMW426, aber T25-DcuS-V236D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1628	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-V235D, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1629	pMW951, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25-V235D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1630	pMW950, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T18-V236D, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1631	pMW951, aber DcuS-PAS <sub>c</sub> -T25-V236D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1632	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-V235D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1633	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-V235D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1634	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-V236D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1635	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-V236D, Amp <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1636	pMW1075, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T25-R322A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1637	pMW1076, aber PAS <sub>c</sub> -Kinase-T18-R322A, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1686	pMW429, aber T18-DcuS-E233G, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1687	pMW426, aber T25-DcuS-E233G, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1735	pMW429, aber T18-DcuS-T320A, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1736	pMW426, aber T25-DcuS-T320A, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW1737	pMW429, aber T18-DcuS-F321A, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1738	pMW426, aber T25-DcuS-F321A, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1760	pMW429, aber T18-DcuS-A237D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1761	pMW426, aber T25-DcuS-A237D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1764	pMW429, aber T18-DcuS-I318D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1765	pMW426, aber T25-DcuS-I318D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1823	pMW429, aber T18-DcuS-I247D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1824	pMW426, aber T25-DcuS-I247D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1829	pMW429, aber T18-DcuS-V308D, Amp <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)
pMW1830	pMW426, aber T25-DcuS-V308D, Kan <sup>R</sup>	MONZEL et al. (2013)

**Tab. 6:** Verwendete Plasmide für Cystein-Zugänglichkeitsstudien

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW151	pET28a mit 1,6 kb <i>NdeI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von <i>dcuS</i> (zur Überexpression), His-tag, Kan <sup>R</sup>	JANAUSCH et al. (2002b)
pMW307	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S80C, Kan <sup>R</sup>	KNEUPER (2005)
pMW324	pMW151, aber DcuS-C199S, Kan <sup>R</sup>	SCHEU et al. (2010b)
pMW325	pMW151, aber DcuS-C471S, Kan <sup>R</sup>	SCHEU et al. (2010b)
pMW336	pMW151, aber DcuS-C199S-C471S (= DcuS-Cys <sup>-</sup> ), Kan <sup>R</sup>	SCHEU et al. (2010b)
pMW1588	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -D178C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1589	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1590	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -R180C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1591	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1592	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S182C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1593	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I183C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1594	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I184C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1595	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1596	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S186C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1597	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V187C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1598	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L188C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1840	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I196C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1841	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -G197C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1842	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -T198C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1843	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I200C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1844	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L201C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1845	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V202C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1846	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K203C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1847	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V204C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1848	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L205C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

### 3 Material und Methoden

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW1849	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K206C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1850	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K207C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1851	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I208C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1852	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L209C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1853	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -F210C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1854	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -G211C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1855	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L212C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1856	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -E213C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1930	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K16C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1931	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L17C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1932	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S18C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1933	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -T19C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1934	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -T20C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1935	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V21C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1936	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I22C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1937	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L23C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1938	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -M24C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1939	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V25C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1977	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V35C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1978	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V36C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1979	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -H37C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1980	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L38C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1981	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I39C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1982	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -Y40C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1983	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -F41C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1984	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S42C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1985	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -Q43C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1986	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I44C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1987	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S45C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1988	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -D46C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1991	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -D178C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1992	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1993	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -R180C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1994	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1995	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S182C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1996	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I183C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1997	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I184C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1998	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW1999	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S186C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2000	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V187C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW2002	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -T198C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2003	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I200C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2004	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L201C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2005	pMW151, aber DcuS-N304D-C471S, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2006	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V202C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2007	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K203C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2008	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V204C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2009	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L205C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2010	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K206C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2011	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -K207C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2012	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I208C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2013	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L209C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2014	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -F210C-N304D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2032	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C-W181R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2033	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181R-S182C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2034	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181R-W185C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2035	pMW151, aber DcuS-W181R-C471S, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2036	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181R-L205C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2037	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181R-L209C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2038	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C-W185R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2039	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181C-W185R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2040	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S182C-W185R, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2041	pMW151, aber DcuS-W185R-C471S, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2042	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185R-L205C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2043	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185R-L209C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2051	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C-N248D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2052	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181C-N248D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2053	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S182C-N248D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2054	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185C-N248D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2055	pMW151, aber DcuS-N248D-C471S, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2056	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L205C-N248D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2057	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L209C-N248D, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2058	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C-V276A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2059	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181C-V276A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2060	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S182C-V276A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2061	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185C-V276A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2062	pMW151, aber DcuS-V276A-C471S, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2063	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L205C-V276A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2064	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L209C-V276A, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2129	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -L169C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

### 3 Material und Methoden

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMW2130	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -S170C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2131	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -R171C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2132	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -V172C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2133	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -T173C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2134	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -Q174C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2135	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -Q175C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2136	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -I176C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pMW2137	pMW336, aber DcuS-Cys <sup>-</sup> -N177C, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

#### 3.1.3 Primer

Die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) in den Tab. 7, 8 und 9 und erfolgte nach Formel 1, wobei  $n$  die Länge des Primers und  $n(GC)$  die Summe aus der Anzahl an Guaninen und der Anzahl an Cytosinen ist.

$$T_M [^{\circ}C] = 69,3 + 41 \cdot \frac{n(GC)}{n} - \frac{650}{n} \quad (1)$$

**Tab. 7:** Verwendete Primer zur Konstruktion von BACTH-Fusionen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	$T_M$ [ $^{\circ}C$ ]
THS_dcuS-f	CACACAAGGATCCGATGAGACATTCATTGC	66,8
THS_dcuS-PASc-r	CGCTGCATCAGTTTACGTGAATTCGTTTTGTC	66,9
THS_dcuS-TM2-r	GCCGAAAAGGATTGAATTCAGTACCTTAACCAG	67,0
THS_PASc-f	CTTTTGGATCCGGAACCCCTAC	59,8
kinase_r	CGATAATTAATACATGAATTCCTGTTCG	59,3
pKT25-dctA_B_for	CTAAAGGATCCCCATGAAAAC	56,5
pKT25-dctA_E_rev	GGGCAGAATTCATGAGATTAAG	56,5

**Tab. 8:** Verwendete Primer zur gerichteten Mutagenese

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	$T_M$ [ $^{\circ}C$ ]
dcuS- $\Delta$ 175-180-fo	CGTGTGACCCAATGGAGCATTATC	62,7
dcuS- $\Delta$ 175-180-re	GATAATGCTCCATTGGGTCACACG	62,7
dcuS- $\Delta$ 176-180-fo	GTGACCCAACAGTGGAGCATTATC	62,7
dcuS- $\Delta$ 176-180-re	GATAATGCTCCACTGTTGGGTCAC	62,7
dcuS- $\Delta$ 177-180-fo	GACCCAACAGATCTGGAGCATTATC	63,0
dcuS- $\Delta$ 177-180-re	GATAATGCTCCAGATCTGTTGGGTC	63,0

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	$T_M$ [°C]
dcuS-Δ178-180-fo	CCAACAGATCAATTGGAGCATTATCTGG	63,7
dcuS-Δ178-180-re	CCAGATAATGCTCCAATTGATCTGTTGG	63,7
dcuS-Δ179-180-fo	CAACAGATCAATGACTGGAGCATTATCTG	63,9
dcuS-Δ179-180-re	CAGATAATGCTCCAGTCATTGATCTGTTG	63,9
dcuS-Δ180-fo	GATCAATGACAGTTGGAGCATTATCTG	61,9
dcuS-Δ180-re	CAGATAATGCTCCAAGTGCATTGATC	61,9
DcuS_C199W_f	CTGATTGGCACCTGGATTCTGGTTAAGGTAC	68,2
DcuS_C199W_r	GTACCTTAACCAGAATCCAGGTGCCAATCAG	68,2
DcuS_D178C_for	CCAACAGATCAATTGCAGTCGCTGGAGC	68,1
DcuS_D178C_rev	GCTCCAGCGACTGCAATTGATCTGTTGG	68,1
DcuS_D46C_for	CGCAAATCAGTTGTATGACGCGAGATGGG	68,1
DcuS_D46C_rev	CCCATCTCGCGTCATACAACTGATTTGGC	68,1
DcuS_del182_f	GATCAATGACAGTCGCTGGATTATCTGGTCCG	69,5
DcuS_del182_r	CCGACCAGATAATCCAGCGACTGTCATTGATC	69,5
DcuS_del182-183_f	GATCAATGACAGTCGCTGGATCTGGTCGGTATTATTTG	70,5
DcuS_del182-183_r	CAAATAATACCGACCAGATCCAGCGACTGTCATTGATC	70,5
DcuS_del182-184_f	GATCAATGACAGTCGCTGGTGGTTCGGTATTATTTGGC	71,7
DcuS_del182-184_r	GCCAAATAATACCGACCACCAGCGACTGTCATTGATC	71,7
DcuS_del182-185_f	GCATGCCAAATAATACCGACCAGCGACTGTCATTGATC	71,6
DcuS_del182-185_r	GATCAATGACAGTCGCTGGTCCGGTATTATTTGGCATGC	71,6
DcuS_del203-211_f	GGCACCTGCATTCTGGTTCTGGAACCCTACG	72,1
DcuS_del203-211_r	CGTAGGGTTCAGAACCAGAATGCAGGTGCC	72,1
DcuS_del204_f	CCTGCATTCTGGTTAAGCTGAAAAAATCCTTTTCGG	68,4
DcuS_del204_r	CCGAAAAGGATTTTTTTCAGCTTAACCAGAATGCAGG	68,4
DcuS_del204-205_f	GCACCTGCATTCTGGTTAAGAAAAAATCCTTTTCGG	68,4
DcuS_del204-205_r	CCGAAAAGGATTTTTTCTTAACCAGAATGCAGGTGC	68,4
DcuS_del204-206_f	CACCTGCATTCTGGTTAAGAAAAATCCTTTTCGGCCTGG	71,6
DcuS_del204-206_r	CCAGGCCGAAAAGGATTTTTCTTAACCAGAATGCAGGTG	71,6
DcuS_del204-207_f	CCTGCATTCTGGTTAAGATCCTTTTCGGCCTGGAAC	71,7
DcuS_del204-207_r	GTTCCAGGCCGAAAAGGATCTTAACCAGAATGCAGG	71,7
DcuS_E213C_for	AAAAAATCCTTTTCGGCCTGTGCCCTACGAAATCTCCACGCTG	74,9
DcuS_E213C_rev	CAGCGTGGAGATTTCTGAGGGGCACAGGCCGAAAAGGATTTTTTT	74,9
DcuS_E233D_for	GCCATGTTGCAGTCTATCAAAGATGGCGTCGTTGCC	72,9
DcuS_E233D_rev	GGCAACGACGCCATCTTTGATAGACTGCAACATGGC	72,9
DcuS_E233G_for	CAGTCTATCAAAGGAGGCGTCGTTGC	66,4
DcuS_E233G_rev	GCAACGACGCCCTCCTTTGATAGACTG	66,4
DcuS_F210C_for	GTTAAGGTACTGAAAAAATCCTTTGCGGCCTGGAACCC	71,6
DcuS_F210C_rev	GGGTTCCAGGCCGCAAAGGATTTTTTTCAGTACCTTAAC	71,6
DcuS_F221I_for	GAAATCTCCACGCTGATTGAGCAACGCCAGG	70,8
DcuS_F221I_rev	CCTGGCGTTGCTCAATCAGCGTGGAGATTC	70,8
DcuS_F321A_f	GTGCCATTTCAACCGCCAGGGACAAAACCTG	69,5
DcuS_F321A_r	CAGTTTTGTCCCTGGCGGTTGAAATGGCAC	69,5
DcuS_F41C_for	GCATCTGATTACTGCTCGCAAATCAGTG	65,3

### 3 Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]
DcuS_F41C_rev	CACTGATTTGCGAGCAGTAAATCAGATGC	65,3
DcuS_G197C_for	GGCATGCTGGTCCGACTGATTTGCACCAGCATT	72,0
DcuS_G197C_rev	AATGCTGGTGCAAATCAGTCCGACCAGCATGCC	72,0
DcuS_G211C_for	GGTACTGAAAAAATCCTTTTCTGCCTGGAACCCTACG	70,5
DcuS_G211C_rev	CGTAGGGTTCCAGGCAGAAAAGGATTTTTTTCAGTACC	70,5
DcuS_H37C_for	GCTATTGGTGGTGTGTCTGATTTACTTCTCG	66,8
DcuS_H37C_rev	CGAGAAGTAAATCAGACACACCACCAATAGC	66,8
DcuS_I176C_f	CCAGCGACTGTCATTGCACTGTTGGGTCACACGG	74,3
DcuS_I176C_r	CCGTGTGACCCAAACAGTGCAATGACAGTCGCTGG	74,3
DcuS_I183C_for	GACAGTCGCTGGAGCTGTATCTGGTCCG	71,0
DcuS_I183C_rev	CCGACCAGATACAGCTCCAGCGACTGTC	71,0
DcuS_I183R_f	GACAGTCGCTGGAGCAGGATCTGGTCCG	72,4
DcuS_I183R_r	CCGACCAGATCCTGCTCCAGCGACTGTC	72,4
DcuS_I184C_for	CGCTGGAGCATTTGCTGGTCCGGTATTATTG	68,2
DcuS_I184C_rev	CAAATAATACCGACCAGCAAATGCTCCAGCG	68,2
DcuS_I184R_f	GCTGGAGCATTAGGTGGTCCGGTATTATTG	68,2
DcuS_I184R_r	CCAAATAATACCGACCACCTAATGCTCCAGC	68,2
DcuS_I196C_for	CATGCTGGTCCGACTGTGTGGCACCAGCATCTG	74,3
DcuS_I196C_rev	CAGAATGCTGGTGCCACACAGTCCGACCAGCATG	74,3
DcuS_I200C_for	CGGACTGATTGGCACCAGCTGTCTGGTTAAGTACTGAAA	73,6
DcuS_I200C_rev	TTTCAGTACCTTAACCAGACAGCTGGTGCCAATCAGTCCG	73,6
DcuS_I200W_f	GATTGGCACCTGTGGCTGGTTAAGGTAC	69,5
DcuS_I200W_r	GTACCTTAACCAGCCAGCAGGTGCCAATC	69,5
DcuS_I208C_for	GCATTCTGGTTAAGGTACTGAAAAAATGCCTTTTCGGCCTGGAAC	73,1
DcuS_I208C_rev	GTTCAGGCCGCGAAAAGGCATTTTTTCAGTACCTTAACCAGAATGC	73,1
DcuS_I22C_for	TGAAATTGAGTACCACAGTGTGCTTAATGGTCAGTGCGGTAC	72,4
DcuS_I22C_rev	GTACCGCACTGACCATTAAAGCACACTGTGGTACTCAATTTCA	72,4
DcuS_I231F_for	CCATGTTGCAGTCTTTCAAAGAAGGCG	65,0
DcuS_I231F_rev	CGCCTTCTTTGAAAGACTGCAACATGG	65,0
DcuS_I247D_for	GCGAGGTCACGCTGGACAACGATGCCGCAC	75,0
DcuS_I247D_rev	GTGCGGCATCGTTGTCCAGCGTGACCTCGC	75,0
DcuS_I318D_f	CGTTATCATCGGTGCCGATTCAACCTTCAGG	69,5
DcuS_I318D_r	CCTGAAGGTTGAATCGGCACCGATGATAACG	69,5
DcuS_I39C_for	GGTGGTGCATCTGTGTTACTTCTCGCAAATC	68,2
DcuS_I39C_rev	GATTTGCGAGAAGTAACACAGATGCACCACC	68,2
DcuS_I44C_for	GATTTACTTCTCGCAATGCAAGTATGACGC	66,9
DcuS_I44C_rev	GCGTCATATCACTGCATTGCGAGAAGTAAATC	66,9
DcuS_K16C_for	CGCAAACGTCCGATGTGCTTGAGTACCACAGTG	72,0
DcuS_K16C_rev	CACTGTGGTACTCAAGCACATCGGACGTTTGCG	72,0
DcuS_K203C_for	GATTGGCACCAGCATTCTGGTTTGGCTACTGAAAAAATCCTTTTCGG	73,7
DcuS_K203C_rev	CCGAAAAGGATTTTTTTCAGTACGCAAACCAGAATGCTGGTGCCAATC	73,7
DcuS_K203W_f	CTGCATTCTGGTTTGGGTTACTGAAAAAATCC	65,6
DcuS_K203W_r	GGATTTTTTTCAGTACCCAAACCAGAATGCAG	65,6

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]
DcuS_K206C_for	CAGCATTCTGGTTAAGGTACTGTGCAAAATCCTTTTCGGCCTGGAAC	74,7
DcuS_K206C_rev	GTTCCAGGCCGAAAAGGATTTTGACAGTACCTTAACCAGAATGCTG	74,7
DcuS_K206W_f	CGAAAAGGATTTTCCACAGTACCTTAACCAG	65,5
DcuS_K206W_r	CTGGTTAAGGTACTGTGGAAAATCCTTTTCG	65,5
DcuS_K207C_for	GCATTCTGGTTAAGGTACTGAAATGCATCCTTTTCGGCCTGGAACCC	75,5
DcuS_K207C_rev	GGGTTCCAGGCCGAAAAGGATGCATTTTCAGTACCTTAACCAGAATGC	75,5
DcuS_K207W_f	CGAAAAGGATCCATTTTCAGTACCTTAACC	63,9
DcuS_K207W_r	GGTTAAGGTACTGAAATGGATCCTTTTCG	63,9
DcuS_L169C_f	TGGTGGCGATCGGCCTTGAGTGCAGCCGTGTGAC	76,7
DcuS_L169C_r	GTCACACGGCTGCACTCAAGGCCGATCGCCACCA	76,7
DcuS_L17C_for	CGTCCGATGAAATGCAGTACCACAGTGGC	69,5
DcuS_L17C_rev	GCCACTGTGGTACTGCATTTTCATCGGACG	69,5
DcuS_L188C_for	GCATTATCTGGTCGGTATGCTTTGGCATGCTGG	70,7
DcuS_L188C_rev	CCAGCATGCCAAAGCATAACCGACCAGATAATGC	70,7
DcuS_L201C_for	CGGACTGATTGGCACCAGCATTTGCGTTAAGGTACTGAAAAAATCC	73,8
DcuS_L201C_rev	GGATTTTTTTTCAGTACCTTAACGCAAATGCTGGTGCCAATCAGTCCG	73,8
DcuS_L201W_f	CCTTAACCCAAATGCAGGTGCCAATCAG	66,6
DcuS_L201W_r	CTGATTGGCACCTGCATTTGGGTTAAGG	66,6
DcuS_L205C_for	CACCAGCATCTGGTTAAGGTATGCAAAAAATCCTTTTCGGCCTGG	73,8
DcuS_L205C_rev	CCAGGCCGAAAAGGATTTTTTTGCATACCTTAACCAGAATGCTGGTG	73,8
DcuS_L205W_f	CTGGTTAAGGTATGGAAAAAATCCTTTTCG	62,9
DcuS_L205W_r	CGAAAAGGATTTTTTCCATACCTTAACCAG	62,9
DcuS_L209C_for	CTGGTTAAGGTACTGAAAAAATCTGTTTCGGCCTGGAACCCCT	72,3
DcuS_L209C_rev	AGGGTTCAGGCCGAAAACAGATTTTTTTTCAGTACCTTAACCAG	72,3
DcuS_L212C_for	CTGAAAAAATCCTTTTCGGCTGCGAACCTACGAAATCTCCACG	74,0
DcuS_L212C_rev	CGTGGAGATTTTCGTAGGGTTCGCAGCCGAAAAGGATTTTTTTTCAG	74,0
DcuS_L228D_for	TGAGCAACGCCAGGCCATGGATCAGTCTATCAAAGAAGGCG	75,4
DcuS_L228D_rev	CGCCTTCTTTGATAGACTGATCCATGGCCTGGCGTTGCTCA	75,4
DcuS_L23C_for	CCACAGTGATCTGCATGGTCAGTGCC	68,0
DcuS_L23C_rev	CGCACTGACCATGCAGATCACTGTGG	68,0
DcuS_L246R_f	GGCGAGGTCACGCGGATCAACGATGCC	72,6
DcuS_L246R_r	GGCATCGTTGATCCGCGTGACCTCGCC	72,6
DcuS_L38C_for	GCTATTGGTGGTGCATTTGATTTACTTCTCGC	68,2
DcuS_L38C_rev	GCGAGAAGTAAATGCAATGCACCACCAATAGC	68,2
DcuS_M227L_for	GAGCAACGCCAGGCCTTGTTCAGTCTATCA	70,8
DcuS_M227L_rev	TGATAGACTGCAACAAGGCCTGGCGTTGCTC	70,8
DcuS_M227T_for	GAGCAACGCCAGGCCACGTTGCAGTCTATCAAA	72,0
DcuS_M227T_rev	TTGATAGACTGCAACGTGGCCTGGCGTTGCTC	72,0
DcuS_M227V_for	GAGCAACGCCAGGCCGTTGTTCAGTCTATCA	72,1
DcuS_M227V_rev	TGATAGACTGCAACACGGCCTGGCGTTGCTC	72,1
DcuS_M24C_for	GATGAAATTGAGTACCACAGTATCTATGCGTCACTGCGGTACTGTT	73,7
DcuS_M24C_rev	AACAGTACCGCACTGACGCATAAGATCACTGTGGTACTCAATTTTCATC	73,7
DcuS_N177C_f	GCTCCAGCGACTGTCACAGATCTGTTGGGTCAC	73,2

### 3 Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	$T_M$ [°C]
DcuS_N177C_r	GTGACCCAACAGATCTGTGACAGTCGCTGGAGC	73,2
DcuS_Q174C_f	CTGTCATTGATCTGGCAGGTACACGGCTTAAC	70,7
DcuS_Q174C_r	GTAAAGCCGTGTGACCTGCCAGATCAATGACAG	70,7
DcuS_Q175C_f	CCGTGTGACCCAATGCATCAATGACAGTC	68,1
DcuS_Q175C_r	GACTGTCATTGATGCATTGGGTCACACGG	68,1
DcuS_Q43C_for	CTGATTTACTTCTCGTGCATCAGTGATATGACG	67,0
DcuS_Q43C_rev	CGTCATATCACTGATGCACGAGAAGTAAATCAG	67,0
DcuS_R171C_f	CTGTTGGGTACACAGCTTAACTCAAGGC	68,1
DcuS_R171C_r	GCCTTGAGTTAAGCTGTGTGACCCAACAG	68,1
DcuS_R180C_for	CAACAGATCAATGACAGTTGCTGGAGCATTATC	67,0
DcuS_R180C_rev	GATAATGCTCCAGCAACTGTCATTGATCTGTTG	67,0
DcuS_S170C_f	CACACGGCATAACTCAAGGCCGATCG	68,0
DcuS_S170C_r	CGATCGGCCTTGAGTTATGCCGTGTG	68,0
DcuS_S179C_for	CAGATCAATGACTGTGCTGGAGCATTATC	66,8
DcuS_S179C_rev	GATAATGCTCCAGCGACAGTCATTGATCTG	66,8
DcuS_S182C_for	CAATGACAGTCGCTGGTGCATTATCTGGTGC	69,5
DcuS_S182C_rev	CGACCAGATAATGCACCAGCGACTGTCATTG	69,5
DcuS_S182R_f	GACAGTCGCTGGAGGATTATCTGGTCCG	69,5
DcuS_S182R_r	CCGACCAGATAATCCTCCAGCGACTGTC	69,5
DcuS_S186C_for	GGAGCATTATCTGGTGCCTATTATTTGGCATG	66,9
DcuS_S186C_rev	CATGCCAAATAATACGCACCAGATAATGCTCC	66,9
DcuS_S186R_f	GCATTATCTGGAGGGTATTATTTGGC	61,6
DcuS_S186R_r	GCCAAATAATACCCTCCAGATAATGC	61,6
DcuS_S18C_for	CGCAAACGTCCGATGAAATTGTGTACCACAGTGATC	70,6
DcuS_S18C_rev	GATCACTGTGGTACACAATTTTCATCGGACGTTTGGC	70,6
DcuS_S42C_for	CTGATTTACTTCTGCCAAATCAGTGATATG	62,7
DcuS_S42C_rev	CATATCACTGATTTGGCAGAAGTAAATCAG	62,7
DcuS_S45C_for	CTTCTCGCAAATCTGTGATATGACGC	63,2
DcuS_S45C_rev	GCGTCATATCACAGATTTGCGGAGAAG	63,2
DcuS_T173C_f	GAGTTAAGCCGTGTGTGCCAACAGATCAATG	68,2
DcuS_T173C_r	CATTGATCTGTTGGCACACACGGCTTAACTC	68,2
DcuS_T198C_for	TGGTCGGACTGATTGGCTGCAGCATTCTGGTTAAGG	72,9
DcuS_T198C_rev	CCTTAACCAGAATGCTGCAGCCAATCAGTCCGACCA	72,9
DcuS_T19C_for	AAACGTCCGATGAAATTGAGTTGCACAGTGATCTTAATGGTCAG	71,3
DcuS_T19C_rev	CTGACCATTAAGATCACTGTGCAACTCAATTTTCATCGGACGTTT	71,3
DcuS_T20C_for	CGTCCGATGAAATTGAGTACCTGCGTGATCTTAATGGTCAGTGCG	74,9
DcuS_T20C_rev	CGCACTGACCATTAAGATCACGCAGGTAATTTTCATCGGACG	74,9
DcuS_V172C_f	CTGTTGGGTGCAACGGCTTAACTCAAGGCCG	72,1
DcuS_V172C_r	CGGCCTTGAGTTAAGCCGTTGCACCCAACAG	72,1
DcuS_V187C_for	GCATTATCTGGTGCCTGCTTATTTGGCATGCTGGTC	70,6
DcuS_V187C_rev	GACCAGCATGCCAAATAAGCACGACCAGATAATGC	70,6
DcuS_V202C_for	GACTGATTGGCACAGCATTCTGTGTAAGGTACTGAAAAAATCCTTT	72,0
DcuS_V202C_rev	AAAGGATTTTTTTCAGTACCTTACACAGAATGCTGGTGCCAATCAGTC	72,0

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]
DcuS_V202W_f	GCACCTGCATCTGTGGAAGGTACTGAAAAAATCC	69,5
DcuS_V202W_r	GGATTTTTTTCAGTACCTCCACAGAATGCAGGTGC	69,5
DcuS_V204C_for	TGGCACCAGCATTCTGGTTAAGTGCCTGAAAAAATCCTTTTCGGCC	74,7
DcuS_V204C_rev	GGCCGAAAAGGATTTTTTTCAGGCACCTAACCCAGAATGCTGGTGCCA	74,7
DcuS_V204W_f	GGATTTTTTTCAGCCACTAACCCAGAATGCAGG	67,0
DcuS_V204W_r	CCTGCATTCTGGTTAAGTGGCTGAAAAAATCC	67,0
DcuS_V21C_for	GAAATTGAGTACCACATGCATCTTAATGGTCAGTGCG	69,5
DcuS_V21C_rev	CGCACTGACCATTAAGATGCATGTGGTACTCAATTC	69,5
DcuS_V235D_for	CTATCAAAGAAGGCGACGTTGCCGTGGACG	70,9
DcuS_V235D_rev	CGTCCACGGCAACGTCGCCTTCTTTGATAG	70,9
DcuS_V236D_for	CAAAGAAGGCGTCGATGCCGTGGACGATC	70,9
DcuS_V236D_rev	GATCGTCCACGGCATCGACGCCTTCTTTG	70,9
DcuS_V25C_for	ATTGAGTACCACAGTGATCTTAATGTGCAGTGGGTACTGTTC	72,3
DcuS_V25C_rev	GAACAGTACCGCACTGCACATTAAGATCACTGTGGTACTCAAT	72,3
DcuS_V308D_for	TGATCAACACCGTTCGGATCGCAGTAATGGCGTTATC	72,7
DcuS_V308D_rev	GATAACGCCATTACTGCGATCCGGAACGGGTGTTGATCA	72,7
DcuS_V35C_for	CGGTGCTATTGTGCGTGCATCTGATTTAC	66,7
DcuS_V35C_rev	GTAAATCAGATGCACGCACAATAGCACCG	66,7
DcuS_V36C_for	GGTGCTATTGGTGTGCCATCTGATTTACTTC	66,8
DcuS_V36C_rev	GAAGTAAATCAGATGGCACACCAATAGCACC	66,8
DcuS_W181C_for	CAATGACAGTCGCTGCAGCATTATCTGGTCCG	69,5
DcuS_W181C_rev	CGACCAGATAATGCTGCAGCGACTGTCAATG	69,5
DcuS_W181R_for	GACAGTCGCCGGAGCATTATCTGGTCCG	71,0
DcuS_W181R_rev	CCGACCAGATAATGCTCCGGCGACTGTGTC	71,0
DcuS_W185C_for	GGAGCATTATCTGCTCGGTATTATTTGGC	65,3
DcuS_W185C_rev	GCCAAATAATACCGAGCAGATAATGCTCC	65,3
DcuS_W185R_for	CGCTGGAGCATTATCCGGTCCGGTATTATTT	66,8
DcuS_W185R_rev	AAATAATACCGACCGGATAATGCTCCAGCG	66,8
DcuS_Y40C_for	GGTGGTGCATCTGATTTGCTTCTCGCAAATC	68,2
DcuS_Y40C_rev	GATTTGCGAGAAGCAAATCAGATGCACCACC	68,2
DcuS-179C-181R-f	GACTGTCCGGGAGCATTATCTGGTCCG	71,0
DcuS-179C-181R-r	CCGACCAGATAATGCTCCGGCGACAGTC	71,0
DcuS-181C-185R-f	CGCTGCAGCATTATCCGGTCCGGTATTATTT	66,8
DcuS-181C-185R-r	AAATAATACCGACCGGATAATGCTGCAGCG	66,8
DcuS-181R-182C-f	GACAGTCGCCGGTGCATTATCTGGTCCG	71,0
DcuS-181R-182C-r	CCGACCAGATAATGCACCGCGACTGTGTC	71,0
DcuS-181R-185C-f	GACAGTCGCCGGGAGCATTATCTGCTCCG	71,0
DcuS-181R-185C-r	CCGAGCAGATAATGCTCCGGCGACTGTGTC	71,0
DcuS-182C-185R-f	CGCTGGTGCATTATCCGGTCCGGTATTATTT	66,8
DcuS-182C-185R-r	AAATAATACCGACCGGATAATGCACCAGCG	66,8
DcuS-C199R-for	GATTGGCACCCGCATTCTGG	61,4
DcuS-C199R-rev	CCAGAATGCCGGGTGCCAATC	61,4
dcuS-G197R-for	GGAATGATTCGCACCTGCATTC	62,1

### 3 Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]
dcuS-G197R-rev	GAATGCAGGTGCGAATCAGTCC	62,1
dcuS-I196R-for	GTCGGACTGAGGGGCACCTGC	67,6
dcuS-I196R-rev	GCAGGTGCCCTCAGTCCGAC	67,6
DcuS-I200R-for	GCACCTGCAGGCTGGTTAAG	61,4
DcuS-I200R-rev	CTTAACCAGCCTGCAGGTGC	61,4
dcuS-K203R-for	CATTCTGGTTAGGGTACTGAAAAAATCC	62,4
dcuS-K203R-rev	GGATTTTTTTCAGTACCCTAACAGAATG	62,4
dcuS-K206R-for	GGTTAAGGTACTGAGAAAAATCCTTTTCG	62,4
dcuS-K206R-rev	CGAAAAGGATTTTTCTCAGTACCTTAACC	62,4
DcuS-L201R-for	CCTGCATTCCGGGTTAAGG	56,0
DcuS-L201R-rev	CCTTAACCCGAATGCAGG	56,0
dcuS-L205R-for	CTGGTTAAGGTACGGAAAAAATCC	59,7
dcuS-L205R-rev	GGATTTTTTTCCTGACCTTAACCAG	59,7
dcuS-T198R-for	CTGATTGGCAGGTGCATTCTGG	62,1
dcuS-T198R-rev	CCAGAAATGCACCTGCCAATCAG	62,1
DcuS-T320A-for	GTTTTGTCCCTGAAGGCTGAAATGGCACCGATGATAAC	71,6
DcuS-T320A-rev	GTTATCATCGGTGCCATTTACAGCCTTCAGGGACAAAAC	71,6
DcuS-V202R-for	CAGTACCTTACGCAGAATGCAG	60,3
DcuS-V202R-rev	CTGCATTCTGCGTAAGGTACTG	60,3
dcuS-V204R-for	GCATTCTGGTTAAGAGACTGAAAAAATCC	62,7
dcuS-V204R-rev	GGATTTTTTTCAGTCTCTTAACCAGAATGC	62,7
PASc_L228A-for	CAACGCCAGGCCATGGCGCAGTCTATC	71,0
PASc_L228A-rev	GATAGACTGCGCCATGGCCTGGCGTTG	71,0
PASc-R322A-for	GCCATTTCAACCTTCGCGGACAAAAC	65,0
PASc-R322A-rev	AGTTTTGTCCGGAAGGTTGAAATGGC	65,0
PASc-V276A-for	CACTCATGGTCACAGGCGGTAGATGTCTCG	70,9
PASc-V276A-rev	CGAGACATCTACCGCCTGTGACCATGAGTG	70,9
PAS-DcuS-N248D-f	GTCACGCTGATCGACGATGCCGCACAAGAATTGCTG	74,0
PAS-DcuS-N248D-r	CAGCAATTCTTGTGCGGCATCGTCGATCAGCGTGAC	74,0
PAS-N304Dfor	CGGCTATTACTGATCGACACCGTTCCGGTGCGC	74,5
PAS-N304Drev	GCGCACCGGAACGGTGTGTCGATCAGTAATAGCCG	74,5

**Tab. 9:** Verwendete Primer zur Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T <sub>M</sub> [°C]
pMW181_Seq_forward	GCCTCATCAGAGATAATGCTTAAG	59,3
pMW181_Seq_reverse	GGATCTCAGTGGTGGTGGTGG	63,7
T18-T25_forward	GTATGTTGTGTGGAATTGTG	53,2
T18-T25_rev_ex	GTCGGGGCTGGCTTAACTATG	61,8
T7prom	TAATACGACTCACTATAGG	50,2
T7term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	56,7

## 3.2 Chemikalien

siehe Anhang.

## 3.3 Medien, Lösungen und Puffer

Alle Komponenten wurden in  $H_2O_{VE}$  gelöst. Sofern nötig wurden alle Medien, Lösungen und Puffer vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 Min.) oder, falls angegeben, sterilfiltriert.

### 3.3.1 Allgemeines

#### **LB-Medium (SAMBROOK und RUSSELL, 1989)**

- 10 g/l Casein
- 5 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl

#### **LB-Agar**

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

#### **KAXI-Agar**

- LB-Agar mit
- 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin
- 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin
- 20  $\mu\text{g/ml}$  5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)
- 500  $\mu\text{M}$  Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

#### **SOC-Medium**

- 26,64 g/l SOB-Medium
- 20 mM Glucose

#### **eM9-Medium (MILLER, 1992; KIM et al., 2007)**

- 10x M9-Stammlösung
  - 75 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 30 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 5 g/l NaCl
  - 10 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

### 3 Material und Methoden

---

Zusätze vor Verwendung	10 ml/l	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	1 ml/l	2 M MgSO <sub>4</sub>
	10 ml/l	10 % AHC
	5 ml/l	1 % L-Tryptophan
Kohlenstoffquelle, Elektronenakzeptor	10 mM	Glycerin (aerob)
	50 mM	Glycerin (anaerob)
	20 mM	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Effektoren	Na <sub>3</sub> Citrat, pH 7,0	
	Na <sub>2</sub> Fumarat, pH 7,0	
	L-Malat, pH 7,0 (sterilfiltriert)	
	Maleinat, pH 7,0	
	3-Nitropropionat, pH 7,0 (sterilfiltriert)	
	Phenylsuccinat, pH 7,0	
	Na <sub>2</sub> Succinat, pH 7,0	
	L-Tartrat, pH 7,0	

Alle Komponenten wurden getrennt angesetzt und autoklaviert. Zur Herstellung des eM9-Mediums wurde die Stammlösung mit den angegebenen Zusätzen, der Kohlenstoffquelle und dem Elektronenakzeptor versetzt und - wenn vorgesehen - mit dem Effektor angereichert. Alternativ können zur Herstellung des Mediums auch alle Komponenten mit Ausnahme von CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> zusammen angesetzt und autoklaviert werden. Letztere werden nach dem Autoklavieren zugefügt.

#### **eM9-X-Gal-Agar**

eM9-Medium mit

20 µg/ml X-Gal

15 g/l Agar-Agar

#### **Glycerin-MOPS-Puffer**

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

15 % (v/v) Glycerin

#### **TSB-Puffer**

LB-Medium mit

100 g/l Polyethylenglycol (PEG) 6000

2,46 g/l MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

2,03 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

100 ml/l DMSO

Die Komponenten wurden in H<sub>2</sub>O<sub>V</sub>E gelöst und steril filtriert.

### Antibiotika

Die für diese Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tab. 10 angegeben. Bei Verwendung von zwei oder mehr Antibiotika wurde die Endkonzentration halbiert.

**Tab. 10:** Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in H <sub>2</sub> O/Ethanol (1:1)	15 µg/ml

### 3.3.2 $\beta$ -Galaktosidase-Test

#### $\beta$ -Galaktosidase-Puffer

- 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0
- 10 mM KCl
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,005 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
- 0,0025 % (w/v) Natriumdesoxycholat
- 2,7 ml/l 2-Mercaptoethanol

#### Lösungen für den $\beta$ -Galaktosidase-Test

- 4 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)
- 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

### 3.3.3 Cystein-Zugänglichkeitsstudien

#### HEPES, pH 6,8

- 50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)
- 50 mM NaCl

#### HEPES/NaCl, pH 6,8

- 50 mM HEPES
- 250 mM NaCl

#### **HEPES/SDS, pH 6,8**

50 mM HEPES  
50 mM NaCl  
1,3 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

#### **NEM**

50 mM N-Ethylmaleimid (NEM)  
gelöst in HEPES

#### **PEG-Mal**

50 mM Methoxy-Polyethylenglykolmaleimid (PEG-Mal)  
gelöst in HEPES

#### **3.3.4 Oxidatives *in vivo* Cystein-Crosslinking**

##### **Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)<sub>3</sub> (CuPhenanthrolin)**

4 mM CuSO<sub>4</sub>  
3,33 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4  
13 mM 1,10-Phenanthrolin

#### **Stopp-Lösung**

20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)  
8 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,8  
12,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)  
12,5 mM NEM  
1,25 % (w/v) SDS  
12,5 % (w/v) Saccharose  
0,2 % (w/v) Bromphenolblau

#### **3.3.5 SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting**

##### **10x PBS, pH 7,5 (SAMBROOK und RUSSELL, 1989)**

1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Trenngelpuffer**

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

**Sammelgelpuffer**

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

**Trenngel (10 %)**

1,98 ml H<sub>2</sub> O<sub>V</sub>E  
1,67 ml 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid  
1,25 ml Trenngelpuffer  
50 µl 10 % SDS  
5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)  
25 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS)

**Sammelgel (4 %)**

1,49 ml H<sub>2</sub> O<sub>V</sub>E  
0,33 ml 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid  
0,63 ml Sammelgelpuffer  
25 µl 10 % SDS  
2,5 µl TEMED  
7,5 µl 10 % APS

**10x SDS-Laufpuffer**

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

**2x SDS-Probenpuffer (LAEMMLI, 1970)**

100 mM Tris/HCl, pH 7,7  
200 mM Dithiothreitol (DTT)  
4 % (w/v) SDS  
0,2 % (w/v) Bromphenolblau  
20 % Glycerin

**Transferpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Ethanol

**Blockingpuffer**

1x PBS  
3 % (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA)  
0,1 % (w/v) Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)

#### Waschpuffer

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

#### Antikörperlösung

1x PBS  
1 % (w/v) BSA  
0,1 % (w/v) Tween 20  
Antikörperverdünnung

#### Antikörper

##### Primäre Antikörper

Anti-DcuS-PD (aus Kaninchen),  
gegen die periplasmatische Domäne von DcuS gerichtet (MÜLLER, 2007)  
Anti-His<sub>6</sub> (aus Maus)  
gegen C- und N-terminale His-tags gerichtet (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Verdünnung für Chemilumineszenz-Entwicklung 1:10000

##### Sekundäre Antikörper

Anti-IgG-Rabbit, HRP-gekoppelt (Carl Roth, Karlsruhe)  
Anti-IgG-Mouse, HRP-gekoppelt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Verdünnung für Chemilumineszenz-Entwicklung 1:10000

#### Chemilumineszenz-Entwicklung

##### Substrat

Immobilon Western HRP Substrat (Merck Millipore, Darmstadt)

##### Filme

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

#### 3.3.6 Stammkonstruktion

##### R-Agar

10 g/l Bacto-Tryptone  
1 g/l Hefe-Extrakt  
8 g/l NaCl  
1 g/l Glucose  
12 g/l Agar-Agar

Nach dem Autoklavieren steril zugeben: 2 mM CaCl<sub>2</sub>

### **R-Top-Agar**

6,5 g/l Agar-Agar

in LB-Medium. Nach dem Autoklavieren steril zugeben: 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

### **MC-Puffer**

5 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

## **3.4 Zucht von *E. coli***

Sofern nicht anders beschrieben, wurden bei allen Zuchten die passenden Antibiotika zugesetzt. Bei Zugabe von zwei oder mehr Antibiotika, wurden die Endkonzentrationen halbiert.

### **Genetische Arbeiten**

Die Zucht von *E. coli* für genetische Arbeiten erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium, aerob bei 37°C unter Schütteln bei 180-220 UpM (EXCELLA E24, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Als Erholungsmedium nach der Elektroporation (siehe 3.5.4) diente SOC-Medium ohne Antibiotika.

**Interaktionsmessungen (BACTH-System)** Für das BACTH-System fand die Zucht von *E. coli* BTH101 nach Co-Transformation mit den jeweiligen Plasmidpaaren, zunächst für 30 Stunden bei 30°C auf KAXI-Platten (siehe 3.3.1) statt. Vor- und Hauptkulturen erfolgten in 48-Well-Platten mit 500 µl LB-Medium pro Well, aerob bei 30°C unter Schütteln bei 1000 UpM (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach). Hauptkulturen wurden hierbei 2-4 %ig angeimpft und der Induktor IPTG wurde mit einer Konzentration von 0,5 mM ab Beginn der Zucht eingesetzt. Nach 2-2,5 Stunden, bei Erreichen einer  $\Delta OD_{570}$  von 0,5-0,8, wurde die Kultur in den  $\beta$ -Galaktosidasetest (siehe 3.6.2) eingesetzt.

### **Cystein-Zugänglichkeitsstudien (SCAM)**

Für die Untersuchungen zur Zugänglichkeit von Cysteinresten wurden Derivate des Plasmids pMW336 (siehe Tab. 6) in *E. coli* C43 transformiert. Die Zucht erfolgte in

LB-Medium in 48-Well-Platten (500  $\mu$ l Medium/Well). Wurde der Einfluss von Effektoren getestet, wurde dem LB-Medium der jeweilige Effektor mit einer Konzentration von 50 mM (3-Nitropropionat: 5 mM) zugesetzt. Vorkultivierungen wurden über Nacht bei 30 °C und 1000 UpM durchgeführt (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach). Hauptkulturen wurden 2 %ig beimpft und für 6 Std. bei 30 °C und 1000 UpM gezüchtet (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach), wobei nach 2 Std. mit 1 mM IPTG induziert wurde.

#### **Oxidatives *in vivo* Cystein-Crosslinking**

Die Zucht für das oxidative Crosslinking von Cysteinresten *in vivo* erfolgte wie für die Cystein-Zugänglichkeitsstudien.

#### **Aerobe Reportergergemessungen**

Zuchten für die Messung der aeroben Reportergergenfusion *dctA-lacZ* fanden in 48-Well-Platten statt. Pro Well wurde 500  $\mu$ l eM9 Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle verwendet. Um den Einfluss des Effektors Fumarat zu testen, wurde dieser dem Medium mit 50 mM zugesetzt. Vorkulturen wurden für über Nacht bei 37 °C und 1000 UpM (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Hauptkulturen wurden anschließend 2 %ig inokuliert und bei 37 °C und 1000 UpM (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach) ohne Antibiotikum für etwa 14 Stunden bis zu einer  $\Delta$ OD<sub>570</sub> von 0,5-0,8 gezüchtet. Diese Kulturen wurden in den  $\beta$ -Galaktosidasetest (siehe 3.6.2) eingesetzt.

#### **Anaerobe Reportergergemessungen**

Zuchten für die Messung der anaeroben Reportergergenfusion *dcuB-lacZ* fanden in 96-Deep-Well-Platten statt. Pro Well wurde 1 ml eM9 Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle und DMSO als Elektronenakzeptor verwendet. Um den Einfluss von Effektoren zu testen, wurden diese dem Medium mit 20 mM zugesetzt. Vorkulturen wurden semi-anaerob für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C gezüchtet. Hauptkulturen wurden 10 %ig (ohne Effektor) bzw. 1 %ig (mit Effektor) inokuliert. Zur Anaerobisierung der Hauptkulturen wurden die 96-Deep-Well-Platten mit passenden Silikonmatten oder selbstklebender Polypropylenfolie verschlossen und in Anaerobentöpfe gestellt. Der Anaerobentopf wurde für 15 Min. evakuiert und die Luft durch Stickstoff ersetzt (1,2 atm; Reinheit 99,999 %; Westfalengas). Die Zucht erfolgte für 32 Stunden (ohne Effektor)

bzw. 16 Stunden (mit Effektor) bei 37 °C ohne Antibiotikum. Nach dieser Zeit hatten die Kulturen  $\Delta OD_{570}$  Werte zwischen 0,5 und 0,8 erreicht und wurden für den  $\beta$ -Galaktosidasetest (siehe 3.6.2) verwendet.

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, erfolgten molekularbiologische Standardmethoden nach SAMBROOK und RUSSELL (1989). Alkalische Phosphatase, DNA-Leitern, DNA-Polymerasen, dNTPs, T4-DNA-Ligase und alle Restriktionsenzyme (i.d.R. sog. FastDigest Enzyme) wurden von Thermo Fisher Scientific Biosciences, St. Leon-Rot, bezogen. Kits zur Aufreinigung von Nukleinsäuren (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, GenElute™ PCR Purification Kit und GenElute™ Gel Extraction Kit) kamen von Sigma-Aldrich, Taufkirchen. Oligonukleotide (Primer) wurden von Eurofins MWG, Ebersberg, und Sigma-Aldrich, Taufkirchen, synthetisiert. Die Synthese erfolgte im jeweils kleinsten, verfügbaren Maßstab (0,01  $\mu$ mol - 0,025  $\mu$ mol) und die Aufreinigung erfolgte für längere Primer über Kartuschen. Ligationen wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 von Vektor zu Integrat, bei 16°C ü.N., vorgenommen.

#### 3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten oder ganzen Plasmiden wurden sog. High-Fidelity DNA-Polymerasen mit geringer Fehlerrate eingesetzt. Dabei handelte es sich um die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Biosciences, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) oder die *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Biosciences, St. Leon-Rot). Die verwendeten PCR-Protokolle sind in Tab. 11 angegeben. Elongationszeit und Anlagerungstemperatur wurden mit der Länge des Templates bzw. der Schmelztemperatur der Primer variiert und orientierten sich an den Herstellervorgaben. Es wurden folgende Cycler verwendet: iCycler, MyCycler oder MJ Mini Cycler (alle Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 3 Material und Methoden

---

Tab. 11: PCR-Protokolle

Komponente	Phusion <sup>®</sup>	<i>Pfu</i>
PCR-Puffer	1X Phusion Buffer GC	1X <i>Pfu</i> Buffer + MgSO <sub>4</sub>
dNTP-Mix (je 10 mM)	je 0,2 mM	je 0,2 mM
Primer-Mix (je 10 mM)	je 0,5 $\mu$ M	je 0,5 $\mu$ M
Template DNA	50 ng	50 ng
Polymerase	1 U	2,5 U
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l

#### 3.5.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde durch die Firmen LGC Genomics (Berlin) oder StarSeq (Mainz) durchgeführt, wobei eigene Primer (siehe Tab. 9) oder Standardprimer des Herstellers verwendet wurden.

#### 3.5.3 Herstellung kompetenter Zellen

**Elektrokompetente Zellen** Die Zuchten erfolgten in LB-Medium, je nach Bedarf mit passenden Antibiotika. Die Vorkultur wurde aerob bei 37°C und 180-220 UpM (EXCELLA E24, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) über Nacht in Reagenzgläsern gezüchtet. Die Hauptkultur wurde mit 1-2 % Inokulum beimpft und in 1l- oder 2l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37°C und 150 UpM (G25, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) bis zu einer  $\Delta$ OD<sub>570</sub> von 0,5 gezüchtet. In dieser Wachstumsphase mit der besten Kompetenz wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 UpM, 4°C, 10 Min.; Beckmann Coulter J2MC, Rotor JA-10 oder Thermo Scientific Heraeus Biofuge Primo R, Rotor #7588) geerntet. Zur Entfernung von Salzen wurde drei Mal mit 1/8 Kulturvolumenteilen Glycerin-MOPS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden abschließend in 1/100 Kulturvolumenteilen Glycerin-MOPS-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

**Hitzekompetente Zellen** Die Vorkultur von *E. coli* XL1-Blue wurde in LB-Medium mit Tetracyclin über Nacht in Reagenzgläsern bei 37 °C und 180-220 UpM (EXCELLA E24, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) inkubiert. Für die Zucht der

Hauptkultur wurden 400 ml LB-Medium mit Tetracyclin in einem 2l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen 2 %ig angeimpft und bei 37 °C und 150 UpM (G25, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) bis zu einer  $\Delta OD_{570}$  von 0,5 gezüchtet. In dieser frühen log-Phase des Wachstums mit der besten Kompetenz wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 UpM, 4°C, 10 Min.; Thermo Scientific Heraeus Biofuge Primo R, Rotor #7588) geerntet. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1/8 Kulturvolumenteilen TSB-Puffer. Abschließend wurden die Zellen in 1/100 Kulturvolumenteilen TSB-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.5.4 Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit dem Eporator der Firma Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Dazu wurde ein Ansatz aus 1-5  $\mu$ l Plasmid-DNA und 50-100  $\mu$ l elektrokompenter Zellen in einer sterilen Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand; PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) einem Puls von 2500 V ausgesetzt. Der Ansatz wurde in 1 ml vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C und 300 UpM (Thermomixer<sup>®</sup> comfort, Eppendorf, Hamburg) für 1 Std. inkubiert. Der ganze Transformationsansatz oder 50-200  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar mit passenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 3.5.5 Hitzeschocktransformation

Zunächst wurden 100  $\mu$ l hitzekompenter XL1-Blue Zellen mit 3  $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt und auf Eis eine Stunde inkubiert. Dem anschließenden Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C folgte eine Inkubation auf Eis für 2 Minuten. 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium wurde zum Transformationsansatz gegeben und dieser für 2 Stunden bei 37 °C und 300 UpM (Thermomixer<sup>®</sup> comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Abschließend wurde der komplette Transformationsansatz auf LB-Agar mit passendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 3.5.6 Mutagenese

Punktmutationen in einem Protein, bei denen eine einzelne Aminosäure ausgetauscht ist, können Veränderungen des Phänotyps hervorrufen, bspw. das Protein in einem definierten Aktivitätszustand einfangen. Aus dem Wissen um solche Zusammenhänge aus

Punktmutation und Phänotypsveränderung, insbesondere beim Vorhandensein zahlreicher, verschiedener Punktmutationen, lassen sich häufig Rückschlüsse über die Bedeutung einzelner Aminosäurepositionen oder Aufbau und Funktionsweise des gesamten Proteins ziehen. Man unterscheidet zwei grundlegende Ansätze, die gerichtete und die ungerichtete Mutagenese. Während bei letzterer Position und Art des Austausches dem Zufall überlassen werden, ermöglicht die gerichtete Mutagenese das gezielte Substituieren einer bestimmten Position gegen eine Aminosäure der Wahl und dient damit auch anderen Fragestellungen. In beiden Ansätzen erfolgt der Aminosäureaustausch durch Codon-Veränderung im Leserahmen des zu mutierenden Gens, das auf einem geeigneten Vektor codiert vorliegt.

#### 3.5.6.1 Ungerichtete Mutagenese

Die ungerichtete Mutagenese von *DcuS* folgte dem Prinzip der fehleranfälligen PCR (CADWELL und JOYCE, 1992). Dabei wurde das Plasmid pMW181, das *dcuS* unter die Kontrolle seines natürlichen Promotors stellt (siehe Tab. 4), als Template eingesetzt. Es sollte nicht das komplette *dcuS*-Gen mutiert werden, sondern nur ein abgegrenzter Bereich, z.B.  $PAS_c$  umfassend. Die Ausdehnung dieses Bereichs wurde durch das Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen bestimmt, die den späteren Austausch des wildtypischen Abschnitts auf pMW181 gegen den mutierten Bereich ermöglichten, ohne den Leserahmen zu verändern. Die hohe Fehlerrate der *Taq*-Polymerase von etwa  $2 \times 10^{-4}$  (KEOHAVONG und THILLY, 1989) wurde durch eine erhöhte Magnesiumkonzentration und eine Verlängerung des PCR-Laufs um einige Zyklen weiter gesteigert. Amplifikat und pMW181 wurden anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen restringiert und miteinander ligiert. Das Ligat wurde in elektrokompetente Zellen des Reporterstamms *E. coli* IMW260 transformiert und diese Zellen auf eM9-X-Gal-Agarplatten mit oder ohne 20 mM Fumarat als Effektor (siehe 3.3.1), anaerob inkubiert. *E. coli* IMW260 codiert für eine *dcuB'*-*lacZ*-Reportergenfusion, wodurch bei Aktivität von *DcuS* das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert wird. Die  $\beta$ -Galaktosidase setzt X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Eine blaue Kolonie ohne Effektor bzw. eine weiße Kolonie auf Agarplatten mit Effektor war daher ein Hinweis auf einen veränderten Phänotyp. Die hierfür verantwortliche(n) Punktmutation(en) wurden durch Sequenzierung (siehe 3.5.2) des im entsprechenden Klons enthaltenen Plasmids ermittelt.

### 3.5.6.2 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese erfolgte nach den Vorgaben des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kits (AgilentTechnologies, Santa Clara, CA, USA) mit den DNA-Polymerasen *Pfu* oder Phusion<sup>®</sup> (siehe 3.5.1) in Kombination mit dem Restriktionsenzym *DpnI* und XL1-Blue hitzekompetenter Zellen (AgilentTechnologies, Santa Clara, CA, USA). Die für die gerichtete Mutagenese benötigten komplementären Primerpaare (siehe Tab. 8), codierten den gewünschten Basenaustausch und sorgten für die Amplifikation des gesamten Plasmids. Der erfolgreiche Basenaustausch wurde durch Sequenzierung (siehe 3.5.2) des kompletten Gens bestätigt.

### 3.5.7 Stammkonstruktion

In *E. coli* können Gene und Mutationen bis zu einer Größe von 80 kB von einem Stamm zum anderen mithilfe des unspezifisch transduzierenden Phagen P1<sub>kc</sub> übertragen werden. Dabei wird im Rezipientenstamm das vom Donorstamm gelieferte Gen durch homologe Rekombination ins Genom integriert.

Eine aerobe 5-ml-ü.N.-Kultur des Donorstamms in LB-Medium wurde mit 5 ml MC-Puffer versetzt und für 30 Min. bei 37°C geschüttelt. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 100 µl P1<sub>kc</sub> Phagen (plaque forming unit, PFU = 10<sup>5</sup>) für 15 Min. bei 37°C infiziert. Die infizierten Zellen wurden anschließend mit 3 ml flüssigem, auf 50°C abgekühltem R-Top-Agar vermischt und gleichmäßig auf eine R-Agar-Platte gegossen. Nach Eintritt der konfluenten Lyse (5-7 Std.) wurden 2 ml LB-Medium hinzupipettiert und die Flüssigkeit samt R-Top-Agar nach 10 minütiger Inkubation in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Verbliebene Zellen wurden durch Zugabe von 500 µl Chloroform und kräftigem Vortexen lysiert. Nach weiterer Inkubation für 10 Min. wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugation (10k x g, 4°C, 15 Min.) abgetrennt. Das klare Lysat hatte einen Titer von ca. 10<sup>10</sup> Phagen und konnte mit 50 µl Chloroform/ml mehrere Monate haltbar gemacht werden.

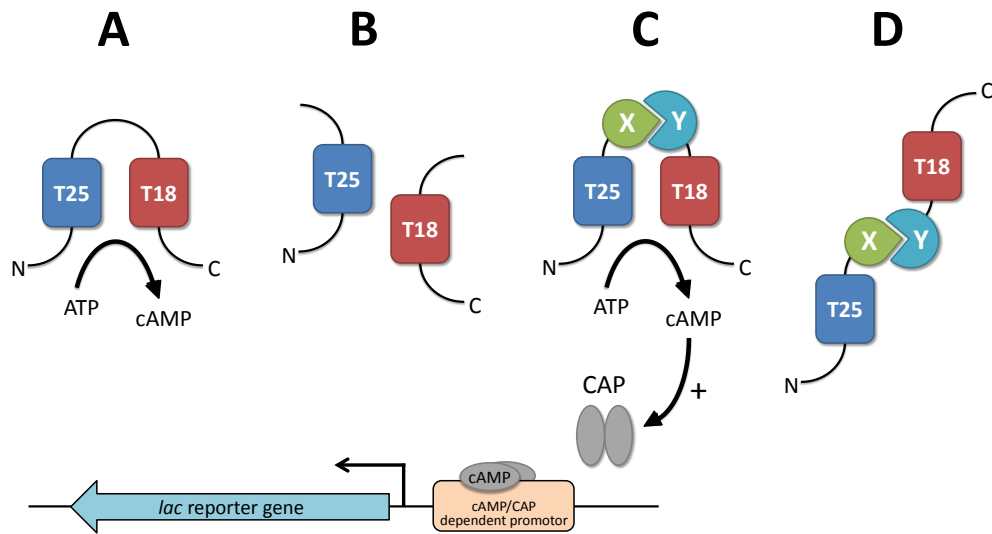
Für die Transduktion wurde eine aerobe 5-ml-ü.N.-Kultur des Rezipientenstamms in LB-Medium mit 3 ml MC-Puffer versetzt und für 30 Min. bei 37°C geschüttelt. Zur Aufkonzentrierung wurde die Kultur abzentrifugiert (6 kUpM, 4°C, 5 Min.) und in 1 ml LB-Medium gelöst. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 100 µl des auf 10<sup>9</sup> verdünnten Phagenlystas und 10 µl 0,1 M CaCl<sub>2</sub> versetzt und für 30 Min. bei 37°C inkubiert.

Die Infektion wurde mit 200  $\mu$ l 0,1 M  $\text{Na}_3\text{-Citrat}$  und 500  $\mu$ l LB-Medium durch Schütteln für 1 Std. bei 37°C gestoppt. Der komplette Ansatz wurde letztlich auf selektive LB-Agar-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37°C bebrütet. Einzelne Kolonien wurden erneut auf selektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C bebrütet. Durch Kolonie-PCR mit passenden Primerpaaren wurde der Erfolg der Transduktion überprüft.

### 3.6 Biochemische Methoden

#### 3.6.1 Bakteriell-elles Two-Hybrid System (BACTH)

Das BACTH System dient der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* und basiert auf der Wiederherstellung des cAMP/CAP Signaltransduktionswegs in dem Adenylatcyclase-defizienten *E. coli* Stamm BTH101 (KARIMOVA et al., 1998). Die beiden zu prüfenden Proteine werden mit den komplementären Fragmenten T18 und T25 genetisch fusioniert. Diese bilden die katalytische Domäne der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* (Abb. 5A), sind für sich alleine aber katalytisch inaktiv (Abb. 5B). Handelt es sich bei den zu untersuchenden Proteinen X und Y um Interaktionspartner, so wird die Adenylatcyclase funktionell wiederhergestellt (Komplementation von T18 und T25) und ATP wird zu cAMP umgesetzt (Abb. 5C). Der Komplex aus cAMP und CAP (Catabolite activator protein) aktiviert CAP-abhängige Promotoren und entsprechend regulierte Gene, darunter *lacZ*, werden exprimiert. Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase kann durch Umsetzung chromogener Substrate wie X-Gal oder ONPG sichtbar gemacht werden. Dabei kann angenommen werden, dass die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die Bildung von cAMP und die Interaktionsstärke der untersuchten Proteine in einer Proportionalitätsbeziehung zueinander stehen. Ein Ausbleiben der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität muss dabei aber nicht zwangsläufig auf eine fehlende Interaktion zwischen den Proteinen X und Y zurück zu führen sein. Alternativ kann die Interaktion zwischen diesen Proteinen sterisch die Bildung einer funktionellen Einheit aus den Domänen T18 und T25 verhindern (Abb. 5D).



**Abb. 5:** Funktionelles Schema des BACTH-Systems. Erläuterungen siehe Text. Verändert nach KARI-MOVA et al. (1998). A: Wildtyp, d.h. intakte *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase, setzt ATP zu cAMP um. B: Getrennte T18- und T25-Domänen. C: Durch interagierende Proteine X und Y zusammengeführte Domänen T18 und T25, setzen ATP zu cAMP um. D: Aus sterischen Gründen findet trotz Interaktion zwischen den Proteinen X und Y keine funktionelle Wiederherstellung der Adenylatcyclase-Aktivität statt.

### 3.6.2 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Miller-Units [MU] wurde gemäß MILLER (1992) durchgeführt und mit dem eingesetzten Kulturvolumen  $V$  und der Reaktionszeit  $t$  nach Gleichung 2 berechnet:

$$\beta - \text{Galaktosidaseaktivität [MU]} = \frac{1000 \cdot (\Delta E_{415} - OD_{570})}{t [\text{min}] \cdot V [\text{ml}] \cdot \Delta OD_{570}} \quad (2)$$

Zur Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Mikrotiterplatten (MTP) wurde ein nach GRIFFITH und WOLF (2002) verändertes Protokoll angewandt (MONZEL et al., 2013). Zur Bestimmung der Zelldichte wurden  $315 \mu\text{l}$  Kultur/Well in eine MTP überführt und die  $OD_{570}$  gemessen (EL808, Biotek, Winooski, VT, USA). Der Zellaufschluss fand mit  $200 \mu\text{l}$  Kultur und  $800 \mu\text{l}$   $\beta$ -Galaktosidase-Puffer in einer Deep-Well-Platte durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren (E4 XLS Rainin, Mettler-Toledo, Gießen) statt. Für den eigentlichen Test wurde die aufgeschlossene Kultur zu  $215 \mu\text{l}$  in 3 Wells einer MTP aliquotiert und diese bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 Min. äquilibriert. Der Test wurde durch Zugabe

von 40  $\mu\text{l}$  ONPG gestartet und nach 20 Min. Inkubation bei 30 °C mit 60  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gestoppt. Abschließend wurden die Extinktionen bei 415 nm und 570 nm bestimmt (EL808, Biotek, Winooski, VT, USA).

#### 3.6.3 SDS-PAGE und semi-dry Western-blotting

##### 3.6.3.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erlaubt die denaturierende Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN System der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 250 V für 35-40 Minuten.

##### 3.6.3.2 Semi-dry Western-blotting

Western-blotting ermöglicht die Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf Membranen bspw. aus Nitrocellulose, um bestimmte Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachzuweisen. Dazu wurden im Sandwich-Verfahren drei Lagen Chromatographiepapier (2043B, Schleicher & Schüll, Dassel), die Nitrocellulosemembran (BA85 0,45  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll, Dassel), das SDS-Gel und wiederum drei Lagen Chromatographiepapier geschichtet und auf die Kathode platziert (Pierce Fast Semi-Dry Blotter; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatographiepapier, Nitrocellulose und SDS-Gel wurden jeweils zuvor kurz in Transferpuffer eingelegt. Nach Auflegen der Anode erfolgte der Proteintransfer bei konstanter Stromstärke von 1,6 mA pro  $\text{cm}^2$  Membranfläche für 45-55 Minuten.

##### 3.6.3.3 Antikörperfärbung und Chemilumineszenz-Entwicklung

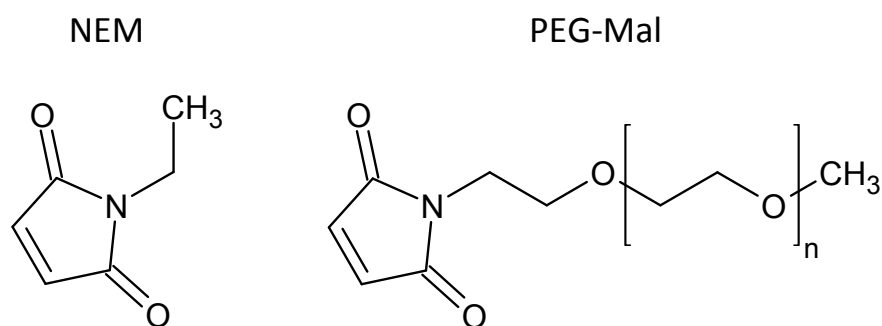
Im Anschluss an den Proteintransfer wurden freie Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran durch eine 45-minütige Inkubation in Blockingpuffer abgesättigt. Die Bindung des primären bzw. sekundären Antikörpers erfolgte für 45 Minuten, wobei nicht-gebundener Antikörper jeweils durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer für 5 Minuten entfernt wurde. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem taumelnden Plattformschüttler (Polymax 1040; Heidolph, Schwabach) durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran zwischen Kosmetiktüchern vorsich-

tig getrocknet. Für die Chemilumineszenz-Entwicklung wurde die Membran mit 700  $\mu\text{l}$  Substrat bedeckt (Immobilon Western HRP Substrat; Merck Millipore, Darmstadt). Die gleichmäßige Verteilung des Substrats wurde durch Auflegen einer Folie sichergestellt. Nach 5 Minuten wurde überschüssiges Substrat mit Hilfe von Kosmetiktüchern entfernt, ein Röntgenfilm aufgelegt (LucentBlue X-ray film; Advansta, Menlo Park, CA, USA), und dieser nach definierter Exposition (10 Sekunden bis 30 Minuten) entwickelt (SRX101A; Konica Minolta, Tokyo, Japan).

### 3.6.4 Cystein-Zugänglichkeitsstudien

Für die Untersuchungen zur Zugänglichkeit von Cysteinresten wurden Derivate des Plasmids pMW336 verwendet. Während pMW336 eine cysteinfreie Variante von DcuS (C199S, C471S) unter die Kontrolle eines T7 Promotors stellt, codierten die in Tab. 6 aufgelisteten Derivate für definierte Cysteinsubstitutionen. Im Anschluss an die Zucht (siehe 3.4) wurden 400  $\mu\text{l}$  der Zellen zunächst geerntet (12k x g, RT, 5 Min.) und einmal in 750  $\mu\text{l}$  HEPES/NaCl gewaschen und resuspendiert. Die Protein-Konzentration wurde in HEPES nach Gleichung 3 auf 2,083  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt, wobei davon ausgegangen wurde, dass 1 ml Kultur bei einer  $\Delta\text{OD}_{578} = 1$  einen Proteingehalt von 280  $\mu\text{g}$  aufweist. Wurde der Einfluss von Effektoren getestet, enthielten alle Puffer den jeweiligen Effektor mit einer Konzentration von 50 mM (3-Nitropropionat: 5 mM).

$$V_{\text{Puffer}} = \frac{V_{\text{Kultur}} [\text{ml}] \cdot 280 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1} \cdot \Delta\text{OD}_{578}}{10 \mu\text{g}/\mu\text{l}} \quad (3)$$



**Abb. 6:** Chemische Struktur von N-Ethylmaleimid (NEM) und Methoxy-Polyethylenglycolmaleimide (PEG-Mal).

Die eigentliche Zugänglichkeitsstudie setzte sich aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen. Im ersten Schritt wurden *in vivo* zugängliche Cysteine durch N-Ethylmaleimid (NEM, Abb. 6) maskiert. SDS sorgte im Anschluss für den Aufschluss der Zellen und die Denaturierung der Proteine. Im zweiten Schritt reagierte Methoxy-Polyethylenglykolmaleimid (PEG-Mal, Abb. 6) mit allen zuvor nicht maskierten Cysteinen, d.h. solchen die *in vivo* unzugänglich waren. Das hohe Molekulargewicht von PEG-Mal verursachte eine Änderung des Laufverhaltens von DcuS während der Proteinelektrophorese, was sich in einer Bandenverschiebung äußerte. Das Auftreten einer solchen hochmolekularen Bande war damit gleichbedeutend mit einem *in vivo* unzugänglichen Cysteinrest.

Für das **NEM-Labeling** wurden 48  $\mu\text{l}$  Kultur ( $\equiv$  100  $\mu\text{g}$  Protein in HEPES) mit 2  $\mu\text{l}$  50 mM NEM versetzt, gevortext und für 1,5 Std. bei 25 °C inkubiert, wobei die Proben alle 10 Min. für 10 Sekunden erneut bei 1400 UpM (Thermomixer<sup>®</sup> comfort, Eppendorf, Hamburg) durchmischt wurden. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Zugabe von 750  $\mu\text{l}$  HEPES und Zellernte (12k x g, RT, 5 Min.; Heraeus Pico 17, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zum Waschen wurde das Zellpellet in 750  $\mu\text{l}$  HEPES resuspendiert und erneut abzentrifugiert (12k x g, RT, 5 Min.; s.o.). Der Überstand wurde vollständig entfernt.

Für das **PEG-Mal-Labeling** wurde dieses Zellpellet in 40  $\mu\text{l}$  HEPES/SDS durch mehrfaches auf- und abpipettieren gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  50 mM PEG-Mal und vortexen gestartet und anschließend für 1,5 Std. bei 25 °C inkubiert. Auch hier wurden die Proben alle 10 Min. erneut für jeweils 10 Sekunden bei 1400 UpM durchmischt (Thermomixer<sup>®</sup> comfort, Eppendorf, Hamburg). Reaktionsstopp und Vorbereitung auf die SDS-PAGE erfolgten durch Zugabe von 55  $\mu\text{l}$  2x SDS-Probepuffer (mit 250 mM DTT) und Erhitzen für 5 Min. bei 95°C.

#### 3.6.5 Oxidatives *in vivo* Cystein-Crosslinking

Das oxidative *in vivo* Crosslinking von Cysteinresten folgte dem von LEE et al. (1995); HUGHSON und HAZELBAUER (1996) beschriebenen Prinzip. Stamm, Plasmide sowie

Zucht- und Induktionsbedingungen (siehe 3.4) waren die selben wie in den Cystein-Zugänglichkeitsstudien (siehe 3.6.4). Für das Crosslinking wurden 100  $\mu$ l Hauptkultur, am Ende ihrer Zucht, mit 100  $\mu$ l CuPhenanthrolin-Lösung (siehe 3.3.4) bei 1300 UpM (Titramax 1000, Heidolph, Schwabach) und 25 °C in 48-Well-Platten inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 Min. durch Zugabe von 50  $\mu$ l einer Kombination aus Stopp-Lösung und SDS-Probenpuffer sowie Erhitzen auf 95 °C für 5 Min. gestoppt. Zur Analyse des Crosslinking wurden die Proben in SDS-PAGE und Western-Blotting eingesetzt.

### 3.7 Bioinformatik

#### **BLAST**

Vergleich von Nukleotid- und Proteinsequenzen untereinander und gegen Datenbanken  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### **Chimera**

Programm zur Visualisierung von 3D-Molekülstrukturen (PETTERSEN et al., 2004)  
<http://www.clustal.org/omega/>

#### **Clustal Omega**

Erstellt multiple Sequenz-Alignments (SIEVERS et al., 2011)  
<http://www.clustal.org/omega/>

#### **$\Delta G$ prediction server v1.0**

Vorhersage der apparenten freien Energie Differenz ( $\Delta G_{app}$ ) für die Insertion einer mutmaßlichen Transmembranhelix in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums durch das Sec61 Translocon  
<http://dgpred.cbr.su.se/>

#### **OligoCalc**

Berechnet die Schmelztemperatur und weitere Eigenschaften von Oligonukleotiden  
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

#### **Protein Molecular Weight Calculator**

Berechnet das Molekulargewicht von Proteinen anhand ihrer Primärsequenz

<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>

#### **PubMed**

Meta-Datenbank zur Recherche biomedizinischer Literatur

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

#### **QUARK**

*Ab initio* Protein Strukturvorhersage. Modelliert Proteinstrukturen ausschließlich anhand der Aminosäuresequenz. (XU und ZHANG, 2012)

<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>

#### **RCSB Protein Data Bank**

Experimentelle Strukturdaten von Proteinen, Nukleinsäuren und Komplexen

[www.rcsb.org/](http://www.rcsb.org/)

#### **SWISS-MODEL**

Modelliert Proteinstrukturen basierend auf Homologien zu existierenden NMR- und Kristallstrukturen (BIASINI et al., 2014)

<http://swissmodel.expasy.org/>

#### **UniProt**

Umfangreiche Protein-Datenbank mit Sequenzen und funktionellen Informationen

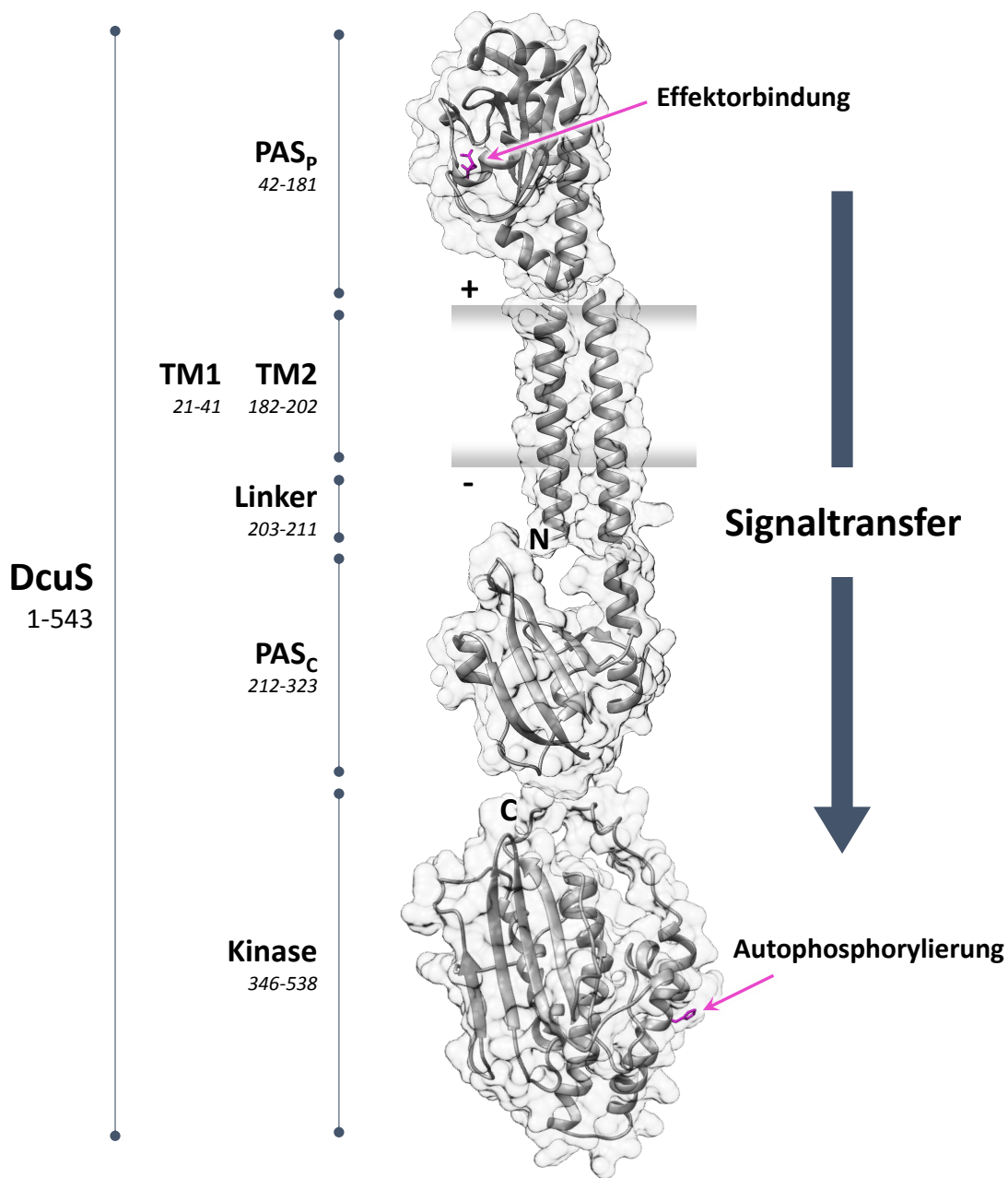
<http://www.uniprot.org/>

## 4 Ergebnisse

*Escherichia coli* nutzt das Zwei-Komponenten-System DcuSR zur Regulation der C<sub>4</sub>-Dicarboxylatverwertung. Dabei ist die Sensor-Histidinkinase DcuS in die Membran eingelassen und erkennt mit ihrer periplasmatischen Sensordomäne (PAS<sub>p</sub>) externe C<sub>4</sub>-Dicarboxylate wie Fumarat als Effektoren. Die Bindung eines Liganden im Periplasma führt zur Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrestes in der cytoplasmatischen Kinasedomäne. Es folgt der Phosphorylgruppentransfer auf den Responseregulator DcuR, der als Transkriptionsfaktor u.a. die Gene der Fumaratatmung *frdABCD*, *fumB* und *dcuB* reguliert. (ZIENTZ et al., 1998; GOLBY et al., 1999).

In DcuS sind demzufolge Signaleingang (PAS<sub>p</sub>) und Signalausgang (Kinasedomäne) durch die Cytoplasmamembran räumlich getrennt (Abb. 7A). PAS<sub>p</sub> und die Kinasedomäne werden von der zweiten Transmembranhelix (TM2; Abb. 7B), die die Membran durchquert, und der cytoplasmatischen PAS-Domäne (PAS<sub>c</sub>; Abb. 7C) verbunden. Es kann daher angenommen werden, dass diese dem intramolekularen Signaltransfer dienen.

Die Konformationsänderungen, die dieser Signalweiterleitung zu Grunde liegen, waren unbekannt. Da die Kristallisation von Membranproteinen aufwändig ist und für membranständige Sensorkinasen keine vollständige Struktur bekannt ist, sollte die Signalweiterleitung *in vivo* analysiert werden. Es wurden dafür Punktmutationen in DcuS eingeführt. Aus der Beziehung von Lage, Art und Phänotyp zahlreicher Punktmutationen lassen sich Informationen über die Bedeutung und Funktion einzelner Reste oder ganzer Bereiche eines Proteins gewinnen. Darüber hinaus wurden substituierte Cysteinreste zur Analyse von Struktur und Konformationsänderungen genutzt. Hierbei gibt die Wasserzugänglichkeit von Cysteinresten die Lage der zugehörigen Position relativ zur Membran wieder (SCAM = Scanning Cysteine Accessibility Method bzw. Substituted Cysteine Accessibility Method) (BOGDANOV et al., 2005). Veränderungen in dieser Zugänglichkeit in unterschiedlichen Aktivierungszuständen des Proteins reflektieren zugehörige Konformationsänderungen.



**Abb. 7:** Aufbau von DcuS und Lage von Signaleingang und -ausgang. PAS<sub>p</sub>: Periplasmatische PAS-Domäne. TM1: Erste Transmembranhelix. TM2: Zweite Transmembranhelix. PAS<sub>c</sub>: Cytoplasmatische PAS-Domäne. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an, die der jeweilige Abschnitt umfasst. Es wurden Strukturen/Modelle wie folgt verwendet. PAS<sub>p</sub>: 3BY8 (CHEUNG und HENDRICKSON, 2008). TM1, TM2: *Ab initio* Modellierung durch den QUARK Server (XU und ZHANG, 2012). PAS<sub>c</sub>: Modellierung durch den SWISS-MODEL Server (BIASINI et al., 2014) mit PAS1 von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (2GJ3) als Vorlage (KEY et al., 2007). Kinase: Modellierung durch den SWISS-MODEL Server (BIASINI et al., 2014) mit der Kinasedomäne von ThkA aus *Thermotoga maritima* (3A0T) als Vorlage (YAMADA et al., 2009). Das in PAS<sub>p</sub> gebundene L-Malat ist als Ort der Effektorbindung und der konservierte Histidinrest 349 als Ort der Autophosphorylierung eingezeichnet.

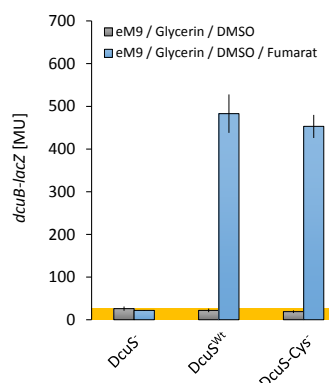
## 4.1 Signaltransduktion durch die Transmembrandomäne

### 4.1.1 Positionierung und Bewegung der Transmembranhelices

#### 4.1.1.1 Cysteinzugänglichkeit als Positionsmarker für Transmembranhelices

Die Transmembrandomäne von DcuS, insbesondere TM2, verbindet den periplasmatischen mit dem cytoplasmatischen Teil des Sensors. Ihr kommt daher eine besondere Rolle im intramolekularen Signaltransfer bei. Ändert sich die Konformation der Transmembrandomäne als Reaktion auf die Bindung eines Effektors, dann verändern sich auch Position und Stellung ihrer Reste hinsichtlich der Membran. Verfolgt man diese Lageveränderung jedes einzelnen Restes, so lassen sich daraus Strukturumwandlungen ableiten. Dafür ist es erforderlich jede Position im Bereich der Transmembranhelix individuell markieren und überwachen zu können. *In vivo* bieten sich hierfür aus drei Gründen substituierte Cysteinreste an. Erstens können diese ohne großen Aufwand durch Punktmutation auf genetischer Ebene eingeführt werden, zweitens unterscheiden sich Cysteine durch ihre Sulfhydrylgruppe was die chemische Reaktivität und Spezifität angeht entscheidend von allen anderen proteinogenen Aminosäuren und drittens werden sie durch ihren amphiphilen Charakter sowohl in hydrophiler als auch hydrophober Umgebung toleriert (POPOT und SARASTE, 1995; MACCALLUM et al., 2008).

Grundvoraussetzung zur Anwendung dieser Methode auf DcuS war das Vorhandensein einer cysteinfreien aber funktionalen Variante des Sensors, zum gezielten Einbringen von Cysteinresten. DcuS besitzt zwei Cysteinreste (C199 in TM2 und C471 in der Kinasedomäne). Wie bereits von SCHEU et al. (2010b) gezeigt, ist C471 zwar für die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke verantwortlich, das Fehlen beider Cysteinreste hat aber keinen Einfluss auf die Funktionalität von DcuS hinsichtlich der Stimulierung der DcuS-abhängigen *dcuB* Expression. Wie Abb. 8 zeigt, erfolgt abhängig von DcuS eine 22-fache Expressionsstimulierung der Reporterfusion *dcuB-lacZ* durch Fumarat. Diese Stimulierung verringert sich um etwa 7 % in der cysteinfreien Variante DcuS-Cys<sup>-</sup>.



**Abb. 8:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und DcuS-Cys<sup>-</sup>. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS*::Kan<sup>R</sup>) mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW151, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. einem für eine cysteinfreie Variante von DcuS codierendem Derivat (pMW336, DcuS-Cys<sup>-</sup>) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

Auf Basis von DcuS-Cys<sup>-</sup> wurde daher eine umfangreiche Sammlung aus 60 Einzelcysteinvarianten hergestellt. Es wurden sämtliche Reste im Bereich der vorhergesagten TM-Grenzen (siehe Abb. 7) einzeln zu Cysteinen mutiert (siehe 3.5.6). Da auch diese nur dann sinnvolle Daten für das Verhalten von wildtypischem DcuS liefern, wenn sie die Funktionalität von DcuS nicht verändern, wurden alle Einzelcysteinvarianten hinsichtlich ihres Einflusses auf die *dcuB-lacZ*-Expression überprüft (siehe Tab. 12). Im Vergleich zum Wildtyp änderte sich die Expressionsstimulierung durch Fumarat unwesentlich und schwankte zwischen einer Steigerung um 9 % und einer Reduktion um 13 %.

**Tab. 12:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und DcuS-Cys<sup>-</sup>-Varianten. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS*::Kan<sup>R</sup>) mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW151, DcuS<sup>Wt</sup>) oder auf pMW336 (DcuS-Cys<sup>-</sup>) basierenden und für Einzelcysteinvarianten von DcuS codierenden Derivaten (siehe Tab. 6) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne oder mit 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat.

Variante	$\beta$ -Galaktosidase [MU] ( <i>dcuB-lacZ</i> )	
	ohne	Fumarat
-	26( $\pm$ 5)	22( $\pm$ 1)
DcuS <sup>Wt</sup>	22( $\pm$ 4)	483( $\pm$ 45)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -K16C	23( $\pm$ 3)	520( $\pm$ 30)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L17C	22( $\pm$ 7)	461( $\pm$ 20)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S18C	24( $\pm$ 5)	435( $\pm$ 16)

Variante	$\beta$ -Galaktosidase [MU] ( <i>dcuB-lacZ</i> )	
	ohne	Fumarat
DcuS-Cys <sup>-</sup> -T19C	16(±3)	514(±54)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -T20C	21(±7)	504(±30)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V21C	16(±2)	503(±29)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I22C	21(±2)	486(±53)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L23C	22(±4)	435(±30)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -M24C	22(±6)	503(±45)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V25C	16(±2)	434(±43)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V35C	23(±4)	513(±13)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V36C	25(±2)	428(±59)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -H37C	18(±4)	421(±41)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L38C	17(±4)	495(±24)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I39C	14(±2)	468(±49)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -Y40C	20(±5)	451(±37)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -F41C	23(±5)	449(±26)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S42C	15(±4)	475(±20)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -Q43C	19(±3)	440(±27)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I44C	21(±2)	447(±22)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S45C	10(±3)	476(±37)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -D46C	22(±3)	443(±46)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L169C	18(±4)	430(±21)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S170C	15(±2)	499(±41)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -R171C	19(±4)	478(±13)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V172C	16(±4)	488(±22)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -T173C	21(±5)	491(±19)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -Q174C	20(±3)	448(±58)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -Q175C	17(±7)	424(±22)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I176C	13(±4)	509(±39)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -N177C	19(±3)	462(±54)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -D178C	18(±2)	514(±37)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S179C	19(±2)	500(±15)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -R180C	20(±3)	528(±17)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -W181C	19(±2)	495(±14)

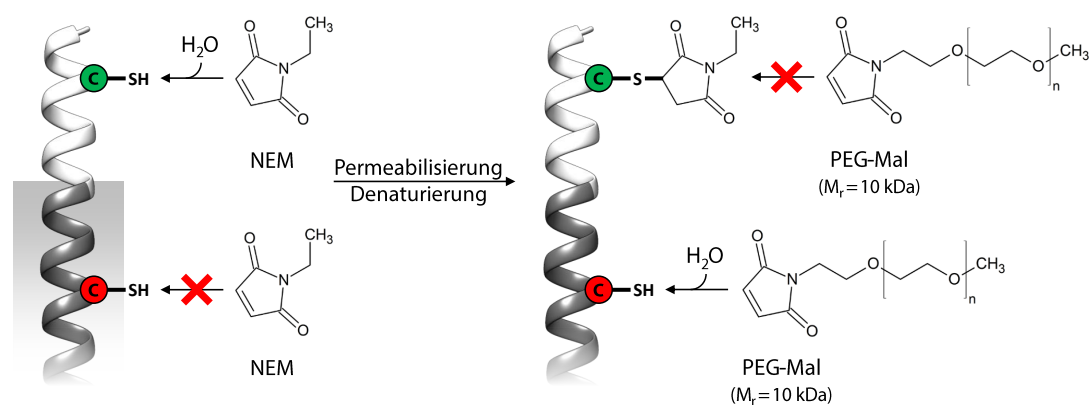
## 4 Ergebnisse

Variante	$\beta$ -Galaktosidase [MU] ( <i>dcuB-lacZ</i> )	
	ohne	Fumarat
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S182C	22( $\pm$ 3)	518( $\pm$ 31)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I183C	22( $\pm$ 4)	518( $\pm$ 22)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I184C	16( $\pm$ 1)	511( $\pm$ 13)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -W185C	17( $\pm$ 1)	505( $\pm$ 13)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -S186C	20( $\pm$ 5)	509( $\pm$ 23)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V187C	17( $\pm$ 1)	471( $\pm$ 17)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L188C	17( $\pm$ 1)	510( $\pm$ 13)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I196C	21( $\pm$ 5)	459( $\pm$ 39)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -G197C	21( $\pm$ 4)	467( $\pm$ 63)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -T198C	20( $\pm$ 7)	511( $\pm$ 39)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -C199	21( $\pm$ 8)	489( $\pm$ 20)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I200C	21( $\pm$ 7)	501( $\pm$ 44)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L201C	22( $\pm$ 4)	478( $\pm$ 39)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V202C	22( $\pm$ 8)	467( $\pm$ 37)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -K203C	22( $\pm$ 5)	450( $\pm$ 13)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -V204C	21( $\pm$ 7)	494( $\pm$ 31)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L205C	23( $\pm$ 9)	492( $\pm$ 38)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -K206C	22( $\pm$ 6)	503( $\pm$ 31)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -K207C	22( $\pm$ 4)	465( $\pm$ 80)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -I208C	22( $\pm$ 9)	468( $\pm$ 24)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L209C	23( $\pm$ 10)	471( $\pm$ 34)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -F210C	20( $\pm$ 7)	421( $\pm$ 45)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -G211C	21( $\pm$ 5)	441( $\pm$ 52)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -L212C	20( $\pm$ 5)	472( $\pm$ 40)
DcuS-Cys <sup>-</sup> -E213C	21( $\pm$ 5)	490( $\pm$ 27)

Da alle Einzylcysteinvarianten annähernd dem Wildtyp entsprachen wurden mit diesen die SCAM-Experimente durchgeführt (siehe 3.6.4). Das Prinzip der Cysteinzugänglichkeitsstudie basiert auf der spezifischen Reaktion von Maleimidderivaten mit der endständigen Sulfhydrylgruppe von Cysteinen. Dabei kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Sulfhydrylanions auf ein Kohlenstoffatom der Doppelbindung des Maleimidrings (FALKE et al., 1988). Es entsteht eine stabile Thioetherbindung, die eine Weiterreaktion

des Cysteinrestes verhindert. Da diese Reaktion Wasser benötigt, reagieren ausschließlich wasserexponierte Cysteinreste auf diese Weise.

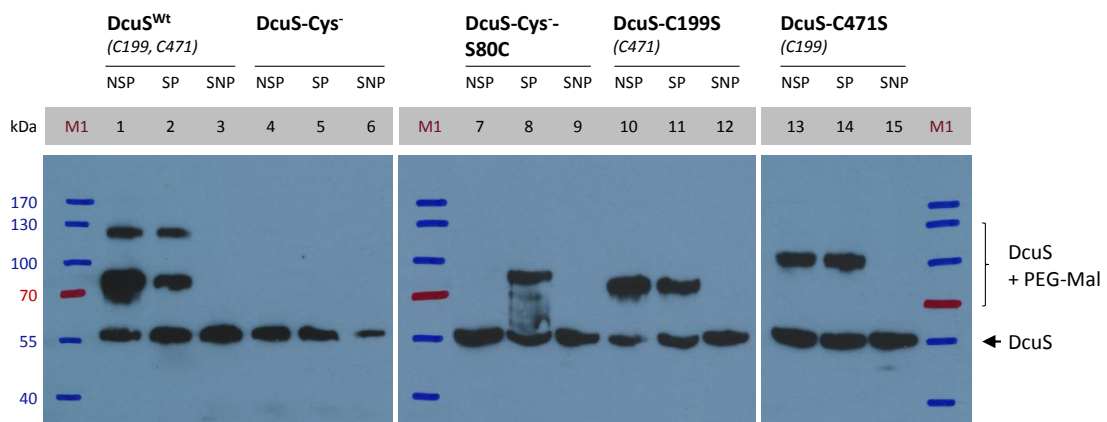
Die Cysteinzugänglichkeitsstudie nutzt das geschilderte Prinzip zur Differenzierung zwischen Cysteinresten im Periplasma/Cytoplasma und der Membran (BOGDANOV et al., 2005; WANG et al., 2008). Wie in Abb. 9 dargestellt, sorgt in einem zweiphasigen Experiment zunächst N-Ethylmaleimid (NEM) für die Maskierung wasserzugänglicher Cysteinreste, in dem es mit diesen reagiert. Da NEM membranpermeabel ist, werden Cysteinreste sowohl auf periplasmatischer als auch auf cytoplasmatischer Seite maskiert (KARLIN und AKABAS, 1998). Anschließend werden mit SDS die Zellen permeabilisiert und die Proteine denaturiert, sodass alle Reste in eine hydrophile Umgebung gelangen. Diese Cysteinreste werden von einem zweiten Maleimidderivat, Methoxypolyethylenglycolmaleimid (PEG-Mal), markiert. Ein Cysteinrest, der zuvor durch NEM maskiert wurde, ist in diesem Fall jedoch unzugänglich für PEG-Mal und wird nicht markiert. Die Auswertung der Cysteinzugänglichkeit erfolgt durch SDS-PAGE und Western-Blot, mit spezifischen Antikörpern. Das große Molekulargewicht von PEG-Mal (ca. 10000 Da) im Vergleich zum relativ kleinen NEM (ca. 125 Da) sorgt für ein langsameren Lauf von markierten Proteinen. Eine (zusätzliche) hochmolekulare Bande ist daher gleichbedeutend mit einem *in vivo* unzugänglichen Cysteinrest.



**Abb. 9:** Prinzip der Untersuchungen zur Cysteinzugänglichkeit (SCAM). In einem zweistufigen Experiment werden zunächst nur wasserzugängliche Cysteinreste (grün) mit N-Ethylmaleimid (NEM) maskiert. Unzugängliche, in der Membran oder dem Proteininneren verborgene Reste (rot) bleiben davon unberührt. Die anschließende Permeabilisierung der Zellen sowie die Denaturierung der Proteine sorgt dafür, dass in der zweiten Stufe zuvor nicht maskierte Cysteinreste durch Methoxypolyethylenglycolmaleimid (PEG-Mal) markiert werden. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Wendet man dieses Prinzip auf DcuS an, so ergibt sich das in Abb. 10 dargestellte Bandenmuster. Der Wildtyp (DcuS<sup>Wt</sup>, Spuren 1-2) besitzt zwei Cysteinreste, die jeweils von einem Molekül PEG-Mal markiert wurden, wodurch sich zwei zusätzliche Banden ergaben. Beide Cysteinreste waren daher unzugänglich, da sie in der Membran (C199) oder der globulären Proteinstruktur (C471) verborgen zu sein scheinen. DcuS hat eine Größe von ca. 60 kDa. Einfach oder zweifach mit PEG-Mal markiert, ergäbe sich daraus eine Gesamtmasse für DcuS von 70 kDa bzw. 80 kDa. Einfach oder doppelt markiertes DcuS zeigte jedoch ein Laufverhalten, was einem deutlich größeren Protein (> 70 kDa bzw. > 100 kDa) entsprach. Vermutlich verlangsamte die langkettige Struktur des PEG-Mals aus über 200 PEG-Grundeinheiten den Lauf von markiertem DcuS deutlich. Löst man DcuS<sup>Wt</sup> aus der Membran und denaturiert es durch SDS vor der Maskierung mit NEM (Spur 3), so sind beide Cysteinreste wasserzugänglich und zusätzliche Banden fehlen. Die cysteinfreie Variante von DcuS (DcuS-Cys<sup>-</sup>; Spuren 4-6) zeigte erwartungsgemäß keine zusätzlichen Banden und Einzelcysteinvarianten (Spuren 7-15) nur maximal eine weitere hochmolekulare Bande. Bei der Variante DcuS-Cys<sup>-</sup>-S80C fehlte eine weitere Bande nach der oben geschilderten Durchführung der Cysteinzugänglichkeitsstudie (Spur 7), existierte aber bei Verzicht auf die Maskierung mit NEM (Spur 8). Der Cysteinrest an Position 80 von DcuS ist demnach wasserzugänglich. Die Varianten DcuS-C199S (Spuren 10-12) und DcuS-C471S (Spuren 13-15), bei denen nur einer der beiden natürlich vorkommenden Cysteinreste in DcuS vorhanden war, zeigten die sich aus dem Wildtyp ergebende Unzugänglichkeit der jeweiligen Cysteinreste. Wie zu erwarten, wurde nur eine statt zwei weiterer Banden beobachtet.

Unabhängig von der Existenz einer oder mehrerer hochmolekularer Banden, bleibt in allen Fällen die Bande für unmarkiertes DcuS (ca. 60 kDa) vorhanden. Die Markierungen mit NEM und PEG-Mal sind demzufolge nicht vollständig und es ist am Ende des Experiments nachwievornicht-reagiertes DcuS vorhanden. Das Fehlen einer zusätzlichen Bande ist dennoch spezifisch und auf die Reaktion mit NEM und damit auf die Wasserzugänglichkeit des zugehörigen Cysteinrestes zurückzuführen. Das ergibt sich aus den im Anhang gezeigten Markierungskontrollen. Hierfür wurden alle Cysteinvarianten, denen eine zusätzliche Bande fehlte, erneut untersucht. Dabei wurde jedoch auf das Blockieren mit NEM verzichtet und stattdessen direkt mit SDS solubilisiert und mit PEG-Mal markiert. Alle Varianten zeigte eine zusätzliche Bande.



**Abb. 10:** Spezifische Markierung von Cysteinresten in DcuS. Auf Grund des Molekulargewichts von PEG-Mal (ca. 10 kDa) bewirkt die Markierung mit PEG-Mal ein verlangsamtes Wandern von DcuS während der SDS-PAGE und so zusätzliche Banden im Western-Blot. NSP (NEM;Solubilisierung;PEG-Mal): Experimenteller Ablauf wie in Abb. 9 beschrieben, d.h. nur wasserunzugängliche Cysteinreste wurden markiert. SP (Solubilisierung;PEG-Mal): Keine Maskierung durch NEM, d.h. alle vorhandenen Cysteinreste im Protein wurden mit PEG-Mal markiert. SNP (Solubilisierung;NEM;PEG-Mal): Zellpermeabilisierung und Proteindenaturierung erfolgten vor der Maskierung mit NEM, d.h. es wurde kein Cysteinrest mit PEG-Mal markiert. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1-15: DcuS (pMW151) und Varianten (siehe Tab. 6) wie angegeben.

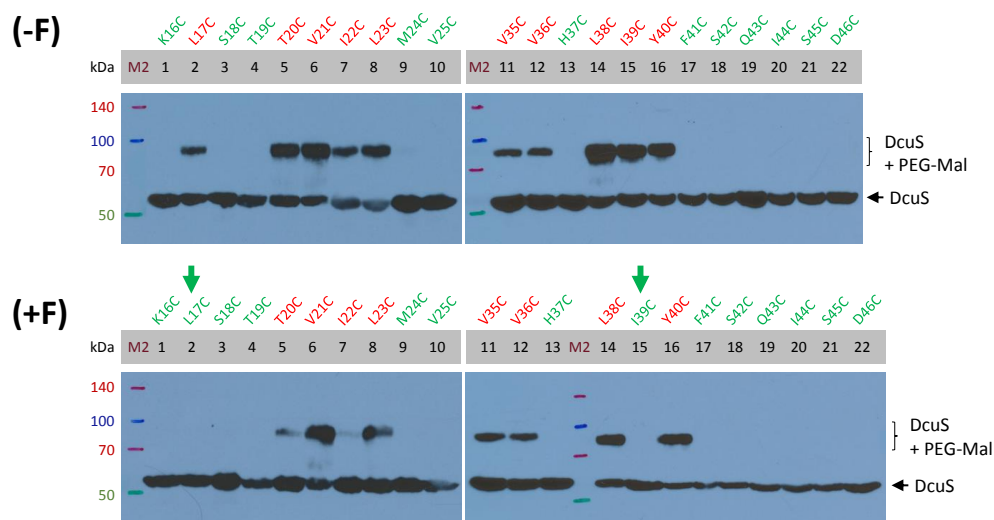
Das hier und in seiner Durchführung in 3.6.4 beschriebene Verfahren zur Untersuchung der Cysteinzugänglichkeit ist demnach auf DcuS anwendbar. Es bietet die Möglichkeit Cysteinreste in Abhängigkeit von ihrer Lage zur Cytoplasmamembran spezifisch zu markieren. Eine sukzessive Analyse von substituierten Cysteinresten an allen Positionen um die Membrangrenzen herum sollte die Lage der Helices und eine eventuelle Veränderung (= Translokation) wiedergeben können.

#### 4.1.1.2 TM1 zeigt eine marginale Zugänglichkeitsänderung zwischen beiden Signalzuständen

Die erste Transmembranhelix verbindet den im Cytoplasma gelegenen N-Terminus von DcuS mit der periplasmatischen PAS-Domäne. Laut Vorhersage, erstreckt sie sich über die Positionen 21 bis 41 (UniProt # P0AEC8) und soll auf periplasmatischer Seite kontinuierlich in die erste  $\alpha$ -Helix von PAS<sub>p</sub> übergehen (KNEUPER et al., 2010). Die Reste von DcuS an den Positionen 16 - 25 und 35 - 46 wurden gegen Cysteine getauscht um die Zugänglichkeit von TM1 an den Grenzen Cytoplasma/Membran bzw. Membran/Periplasma zu untersuchen. Die resultierenden Einzelcysteinvarianten K16C - V25C und V35C - D46C wurden in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM

## 4 Ergebnisse

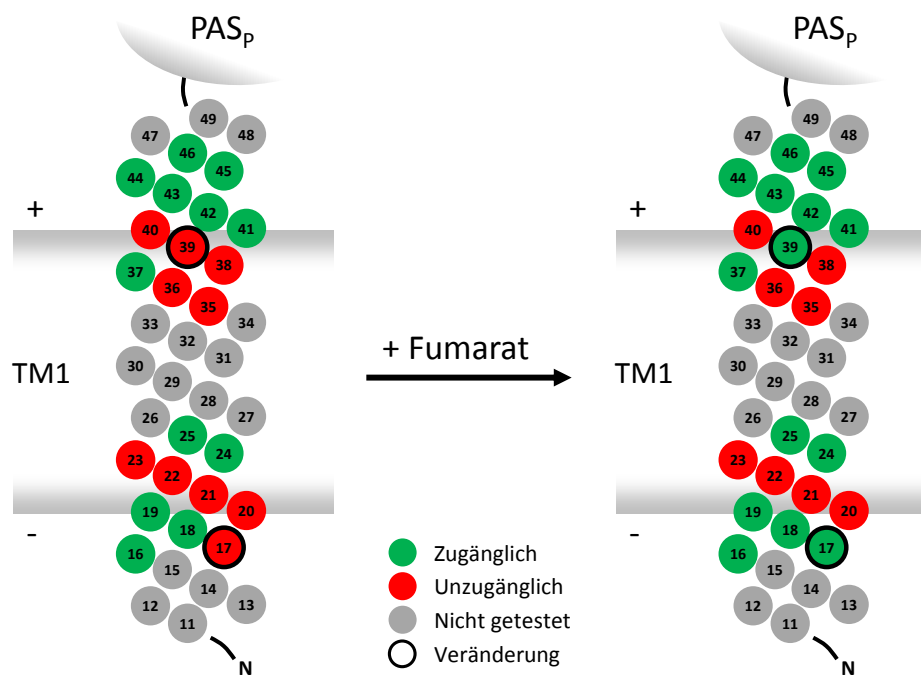
Na<sub>2</sub>Fumarat getestet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 und 12 als Western-Blot bzw. im Modell dargestellt.



**Abb. 11:** Cystein zugänglichkeit und Veränderung durch Fumarat: TM1. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM1 und angrenzenden Bereichen wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

Wie aus Abb. 11(-) hervorgeht, waren die Positionen 16, 18, 19, 24 und 25 auf cytoplasmatischer Seite sowie 37 und 41 - 46 zugänglich. Die Positionen 17 und 20 - 23 sowie 35, 36 und 38 - 40 waren hingegen unzugänglich. Die vorhergesagten Grenzen der ersten Transmembranhelix (21 - 41) wurden damit annähernd wiedergegeben. Lediglich die Zugänglichkeit von 24, 25 und 37 entsprach nicht der Vorhersage, da diese in der Membran verborgen und unzugänglich hätten sein sollen. Die Unzugänglichkeit von Position 17 könnte auf eine wasserunzugängliche Lage außerhalb der Membran hindeuten.

Unter Fumarateinfluss (Abb. 11(F)) änderte sich die Zugänglichkeit von zwei Positionen: 17 und 39, beide wurden zugänglich. Mit letzterer wurde eine weitere Position auf periplasmatischer Seite wasserzugänglich, die laut Vorhersage innerhalb der Membran liegen sollte. Gleichzeitig blieb die cytoplasmatische Grenze um die Position 20 herum unverändert. TM1 scheint demnach ihre Lage zu verändern, das Ausmaß der Translokation fällt aber gering aus und zeigte keine klare Richtung.



**Abb. 12:** Cysteinzugänglichkeit und Veränderung durch Fumarat: TM1. Modellhafte Darstellung von TM1 mit ihrem helikalen Aufbau und ihrer ungefähren Lage in der Membran, jedem Rest ist eine Kugel zugeordnet, die ihre Position in DcuS angibt. Entsprechend des jeweiligen SCAM Experiments (siehe Abb. 11) sind zugängliche Positionen grün und unzugängliche rot gefärbt, nicht untersuchte Positionen sind grau hinterlegt. Ein schwarzer Rahmen markiert Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. Ohne Effektor zugänglich: 16, 18, 19, 24, 25, 37, 41 - 46. Ohne Effektor unzugänglich: 17, 20 - 23. Mit Fumarat zugänglich: 16 - 19, 24, 25, 37, 39, 41 - 46. Ohne Fumarat unzugänglich: 20 - 23, 35, 36, 38, 40. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 17, 39.

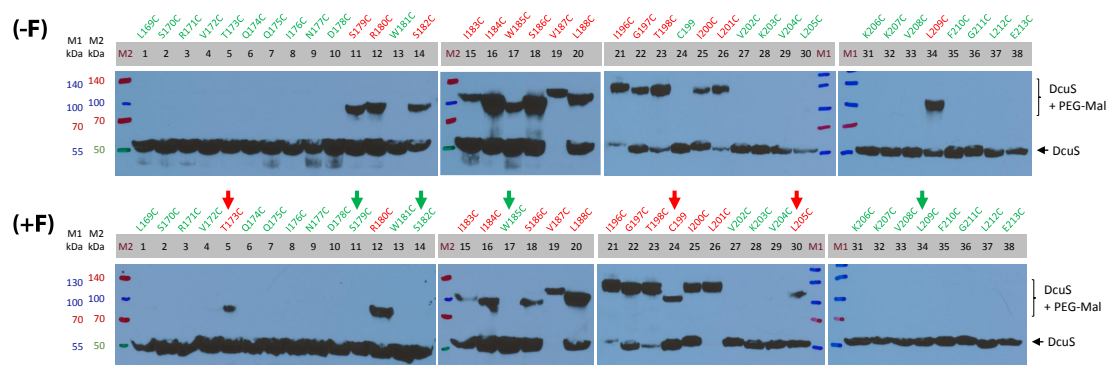
#### 4.1.1.3 TM2 zeigt eine ausgeprägte Änderung der Zugänglichkeit zwischen beiden Signalzuständen

Die zweite Transmembranhelix erstreckt sich laut Vorhersage über die Positionen 182 - 202 von DcuS (UniProt # P0AEC8). Sie liegt im Zentrum des Sensors und verbindet PAS<sub>p</sub> mit PAS<sub>c</sub> und der Kinasedomäne, d.h. die sensorische mit der effektorischen Untereinheit der Sensor-Histidinkinase. Es wird angenommen, dass ähnlich wie für TM1, die letzte  $\alpha$ -Helix von PAS<sub>p</sub> kontinuierlich in die zweite Transmembranhelix übergeht (KNEUPER et al., 2010). Unklar ist, wie die Verbindung von TM2 mit PAS<sub>c</sub> strukturell aufgebaut ist, NMR-Daten legen jedoch eine ungeordnete Struktur zumindest am Beginn von PAS<sub>c</sub> nahe (ETZKORN et al., 2008).

Für die Cysteinzugänglichkeitsstudie der zweiten Transmembranhelix wurden Cysteinreste an den Positionen 169 - 188 und 196 - 213 eingebaut. Dadurch wurden neben TM2

## 4 Ergebnisse

auch der C-Terminus von  $PAS_p$  ( $PAS_p-\alpha_6$ ) sowie der Linker, der TM2 und  $PAS_c$  verbindet, in die Untersuchung einbezogen. Die zugehörigen Einzelcysteinvarianten L169C - L188C und I196C - E213C wurden sowohl in Abwesenheit (-) als auch Anwesenheit (F) von 50 mM  $Na_2Fumarat$  getestet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 und 14 als Western-Blot bzw. im Modell dargestellt.

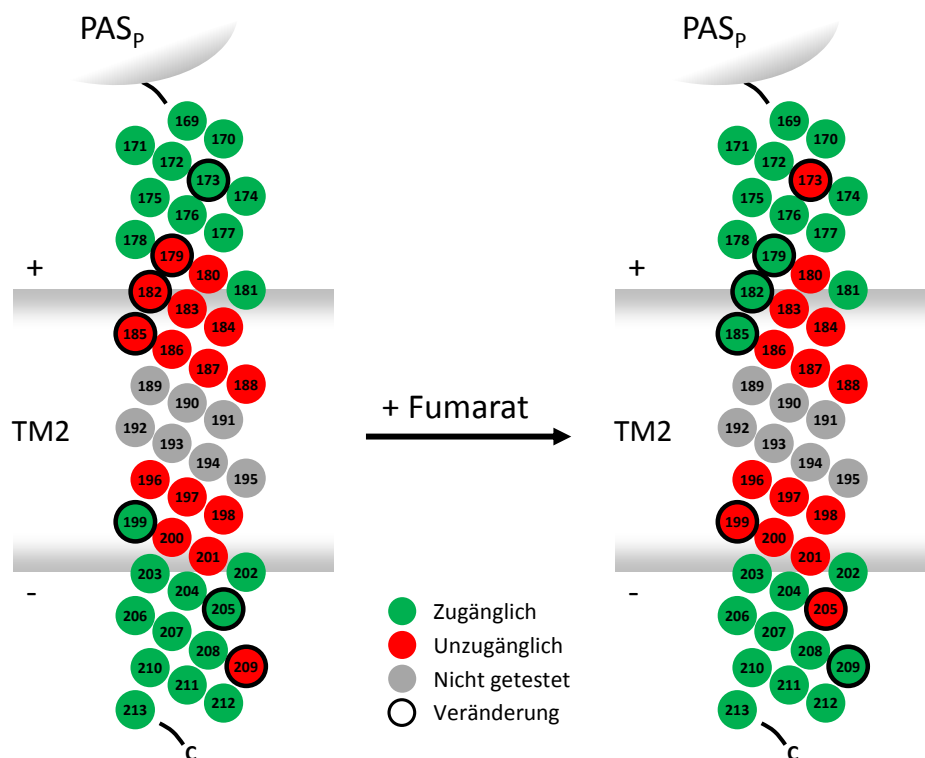


**Abb. 13:** Cystein zugänglichkeit und Veränderung durch Fumarat: TM2. Die Zugänglichkeit von 38 substituierten Cysteinen in TM1 und angrenzenden Bereichen wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM  $Na_2Fumarat$  ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-38: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

Der Western-Blot aus Abb. 13(-) zeigt, dass die Positionen 169 - 178 und 181 auf periplasmatischer Seite sowie die Positionen 199, 202 - 208 und 210 - 213 auf cytoplasmatischer Seite zugänglich waren. Als unzugänglich in der periplasmatischen Hälfte erwiesen sich die Positionen 179, 180 und 182 - 188. Auf cytoplasmatischer Seite waren die Positionen 196 - 198, 200, 201 und 209 unzugänglich. Auch für TM2 wurden die vorhergesagten Grenzen (182 - 202) mit der Cystein zugänglichkeitsstudie in etwa getroffen. Verfolgt man den analysierten Abschnitt vom N-Terminus zum C-Terminus, dann war auf periplasmatischer Seite die Position 181 der letzte zugängliche Rest und in der cytoplasmatischen Hälfte die Position 201 der letzte unzugängliche Rest, wenn man von dem dazwischen liegenden zugänglichen Rest 199 absieht. Auffällig war die Unzugänglichkeit an Position 209. Der zugehörige Rest L209 liegt eindeutig im Cytoplasma und ist mehr als zwei Helixumdrehungen (8 Reste) von der Membrangrenze entfernt.

In Anwesenheit des Effektors Fumarat veränderte sich das Zugänglichkeitsmuster deutlich, wie in Abb. 13 anhand der Pfeile gezeigt ist. Im Periplasma verlor die Position 173 ihre Zugänglichkeit, während die Positionen 179, 182 und 185 zugänglich wurden. Umgekehrt verloren die Positionen 199 und 205 ihre Zugänglichkeit, während an Position 209 die Zugänglichkeit hergestellt wurde. Ähnlich wie der Rest L209 ist auch T173 weit (9 Reste) von der Membrangrenze entfernt und liegt eindeutig im Periplasma. Klammert man T173 und L209 daher aus, wurden auf periplasmatischer Seite ausschließlich Reste zugänglich, während Reste auf der gegenüberliegenden Seite im Cytoplasma ausschließlich unzugänglich wurden.

Verfolgt man den analysierten Abschnitt erneut vom N- zum C-Terminus, dann verschob sich im Periplasma die letzte zugängliche Position von 181 nach 185 und im Übergangsbereich Cytoplasma/Membran die letzte unzugängliche Position von 201 nach 205. In beiden Fällen kam es zu einer Verlagerung um vier Positionen, was in etwa einer Helixumdrehung entspricht. Wie aus dem Modell in Abb. 14 ersichtlich, liegen die Positionen mit einer veränderten Zugänglichkeit näherungsweise auf einer Helixseite. Die hohe Zahl von Positionen mit einer veränderten Zugänglichkeit sprechen für eine ausgeprägte Translokation der zweiten Transmembranhelix. Die Richtung der Translokation wird durch die Zugänglichkeitszunahme im Periplasma bei gleichzeitiger Abnahme der Zugänglichkeit im Cytoplasma festgelegt und scheint zum Periplasma hin statt zu finden. Das Ausmaß der Zu- bzw. Abnahme um eine Helixdrehung und die Lage von Positionen mit veränderter Zugänglichkeit auf einer gemeinsamen Seite der Transmembranhelix sprechen für die vertikale Verschiebung ohne starke Rotationsanteile. Zusammengefasst lässt sich der durch die Cystein zugänglichkeitsstudie untersuchte Einfluss des Effektors Fumarat auf die Positionierung von TM2 als Kolbenhubbewegung in Richtung Periplasma beschreiben, was im Einklang mit der bisherigen Hypothese steht (ETZKORN et al., 2008; SEVVANA et al., 2008; SCHEU et al., 2010b; KNEUPER et al., 2010)



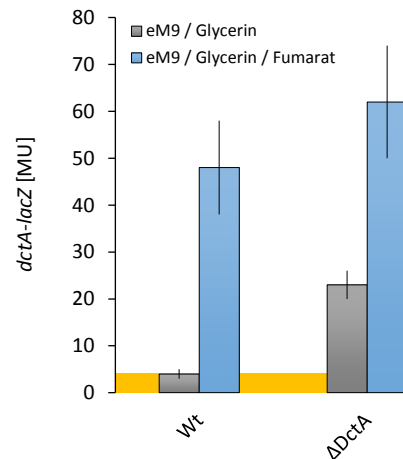
**Abb. 14:** Cysteinenzugänglichkeit und Veränderung durch Fumarat: TM2. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 13. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 169 - 172, 174 - 179, 181, 182, 185, 202 - 204 und 206 - 213. Ohne Fumarat unzugänglich: 173, 180, 183, 184, 186 - 188, 196 - 201 und 205. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 173, 179, 182, 185, 199, 205 und 209.

#### 4.1.1.4 Fehlende Co-Regulation durch DctA versetzt beide Transmembranhelices in ihren aktiven Signalzustand

DcuS ist Teil eines Sensorkomplexes, bestehend aus DcuS und einem der beiden C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA bzw. DcuB (KLEEFELD et al., 2009; WITAN et al., 2012a; STEINMETZ et al., 2014). DcuS ist dabei der Sensor für C<sub>4</sub>-Dicarboxylate, benötigt jedoch die Transporter um seine Funktionalität zu erhalten (STEINMETZ et al., 2014). Entfernt man die Transporter auf genetischer Ebene durch Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette, so erlangt DcuS einen permanenten ON-Zustand, was sich in der effektorunabhängigen Expression der von DcuS regulierten Reportergene *dcuB-lacZ* bzw. *dctA-lacZ* zeigt (KLEEFELD et al., 2009; WITAN et al., 2012a).

Die Abhängigkeit der DcuS-Funktionalität von DctA unter aeroben Bedingungen ist in Abb. 15 gezeigt. Im Wildtyp wurde die *dctA-lacZ*-Expression durch den Effektor Fu-

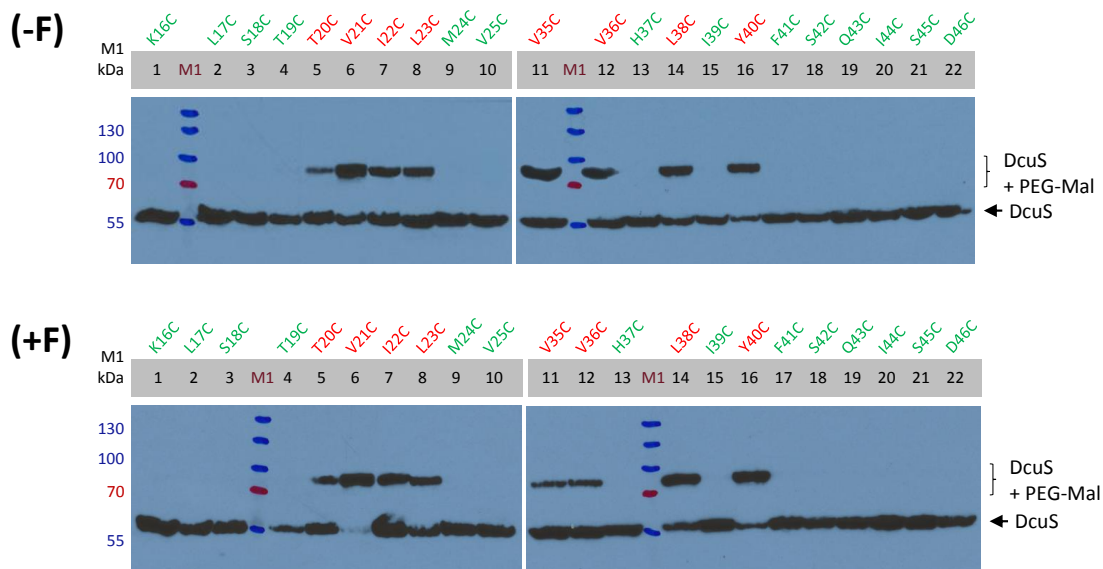
marat um das 12-fache von 4 MU auf 48 MU gesteigert. In der *dctA*-Insertionsmutante ( $\Delta$ DctA) erfolgte eine Expression der Reporterfusion bereits ohne Effektor (Faktor 5,8) und wurde durch Fumarat lediglich um das 2,7-fache auf 62 MU gesteigert.



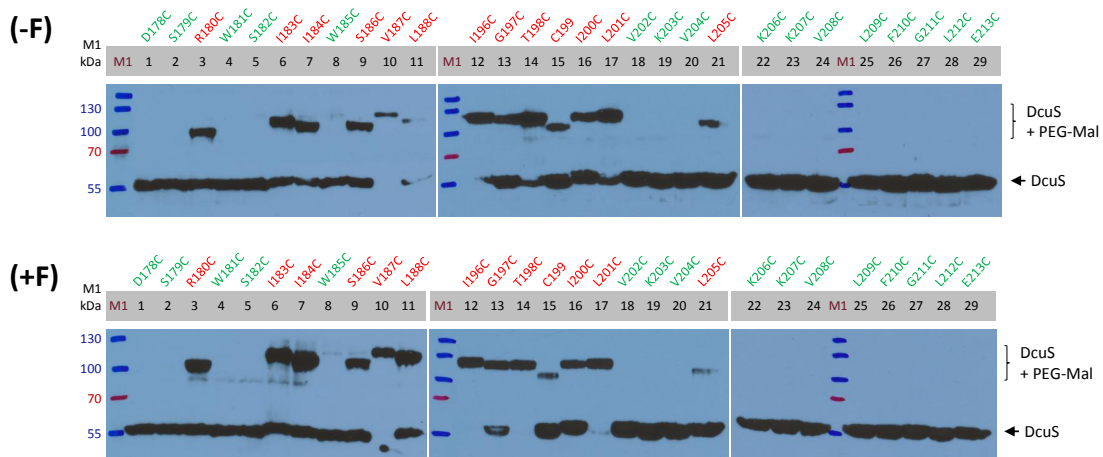
**Abb. 15:** Einfluss des Co-Regulators DctA auf die DcuS-abhängige *dctA-lacZ* Expression. Die Messung der *dctA-lacZ* Expression erfolgte in *E. coli* IMW385 (Wt) bzw. IMW386 (*dctA::Spc<sup>r</sup>*  $\cong$   $\Delta$ DctA). Die aerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin, ohne (grau) oder mit (blau) 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Wildtypstammes IMW385 wieder.

DcuS erlangt damit ohne den Co-Regulator DctA, zumindest in Teilen, seinen aktiven Signalzustand. Es sollte der Einfluss einer DctA-Deletion auf die Translokation der beiden Transmembranhelices untersucht und mit den durch den Effektor Fumarat verursachten Zugänglichkeitsänderungen verglichen werden. Dazu wurden die plasmidcodierten Einzelcysteinvarianten in einen *dctA*-Insertionsstamm (IMW609) transformiert und die Cysteinzugänglichkeitsstudie vor diesem genetischen Hintergrund durchgeführt. Die Ergebnisse sind für TM1 in Abb. 16 und für TM2 in Abb. 17 dargestellt, Abb. 18 fasst diese im Modell zusammen.

## 4 Ergebnisse



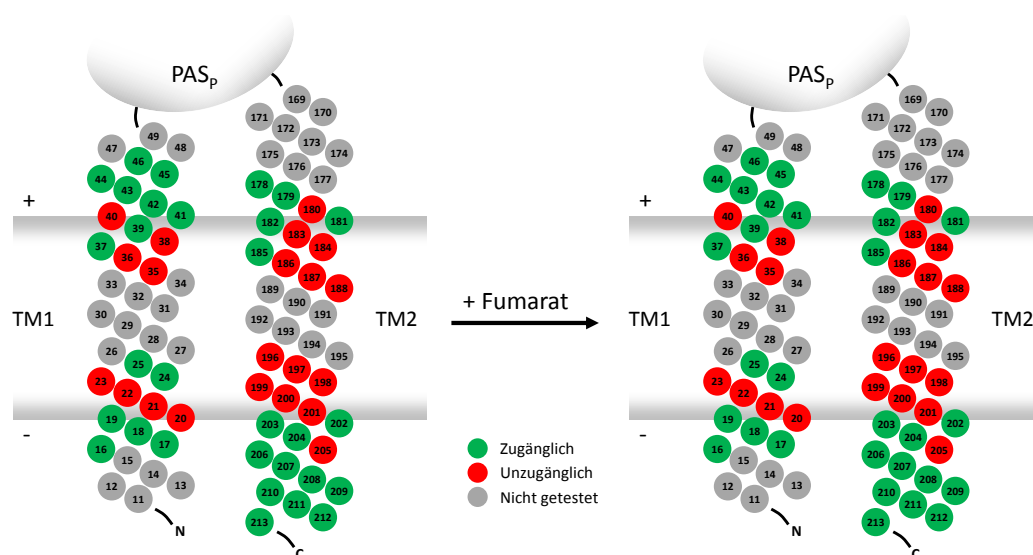
**Abb. 16:** Cysteinenzugänglichkeit ohne den Co-Regulator DctA: TM1. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM1 und angrenzenden Bereichen wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM  $\text{Na}_2\text{Fumarat}$ , in einem DctA-defizienten Stamm (IMW609) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.



**Abb. 17:** Cysteinenzugänglichkeit ohne den Co-Regulator DctA: TM2. Die Zugänglichkeit von 29 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM  $\text{Na}_2\text{Fumarat}$ , in einem DctA-defizienten Stamm (IMW609) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

In TM1 waren ohne Fumarat die gleichen Reste zugänglich wie in Anwesenheit von DctA. Auch der Zusatz von Fumarat änderte nichts an der Zugänglichkeit der Cysteinreste (Abb. 16). Im Bereich von TM2 waren in der *DctA*<sup>-</sup>-Mutante bereits ohne Fumarat die gleichen Reste für NEM zugänglich, die im *DctA*<sup>+</sup>-Stamm erst mit Fumarat zugänglich waren: 178 - 179, 181 - 182, 185, 202 - 204 und 206 - 213. Der Zusatz von Fumarat machte keine zusätzlichen Reste zugänglich (Abb. 17). Das Zugänglichkeitsmuster ist damit für die hier untersuchten Positionen in der ersten und zweiten Transmembranhelix identisch zu der Fumarat-stimulierten Form im Stamm mit *DctA* (siehe Abb. 12 und 14).

Ohne die co-regulatorische Funktion von *DctA* erfolgt in *DcuS* demzufolge bereits ohne Effektor dieselbe Translokation der Transmembranhelices, wie sie durch Fumarat im Wildtyp ausgelöst wird. Die Translokation insbesondere von TM2 erklärt so die effektorunabhängige Stimulierung der *dctA-lacZ*-Expression. Eine darüberhinaus gehende Veränderung dieses Zustands durch Fumarat findet im *DctA*-defizienten Hintergrund nicht statt. Die zusätzliche Stimulierung wie sie für *dctA-lacZ*-Expression beschrieben wurde (Abb. 15) zeigte sich in der Cysteinzugänglichkeitsstudie nicht. Möglicherweise ist eine unzureichende Auflösung des SCAM für diese Diskrepanz verantwortlich.



**Abb. 18:** Cysteinzugänglichkeit in TM1 und TM2 von *DcuS* ohne den Co-Regulator *DctA*. Modellhafte Darstellung von TM1 und TM2 wie in Abb. 12. Ohne Effektor/mit Fumarat zugänglich: 16 - 19, 24, 25, 37, 39, 41 - 46, 178 - 179, 181 - 182, 185, 202 - 204 und 206 - 213. Ohne Effektor/mit Fumarat unzugänglich: 20 - 23, 35, 36, 38, 40, 180, 183, 184, 186 - 188, 196 - 201 und 205. Keine Positionen mit veränderter Zugänglichkeit.

## 4 Ergebnisse

### 4.1.1.5 Das Ausmaß der Translokation von TM2 korreliert mit der Effektorstärke

DcuS wird neben Fumarat von weiteren Effektoren stimuliert. Neben C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten z.T. auch C<sub>3</sub>- und C<sub>5</sub>-Dicarboxylate oder das C<sub>6</sub>-Tricarboxylat Citrat. Viele Substituenten an den Position C2 oder C3 der C<sub>4</sub>-Dicarboxylate, oder der Austausch einer Carboxylat- gegen eine Nitrogruppe werden toleriert. Ausschlaggebend für die Erkennung eines Effektors durch DcuS ist der Abstand zwischen den Carboxylatgruppen, der zwischen 3,1 und 3,8 Å liegen muss (KNEUPER et al., 2005). Eine Auswahl an Verbindungen ist in Abb. 19 und ihr Einfluss auf die *dcuB-lacZ*-Expression in Abb. 20 gezeigt.

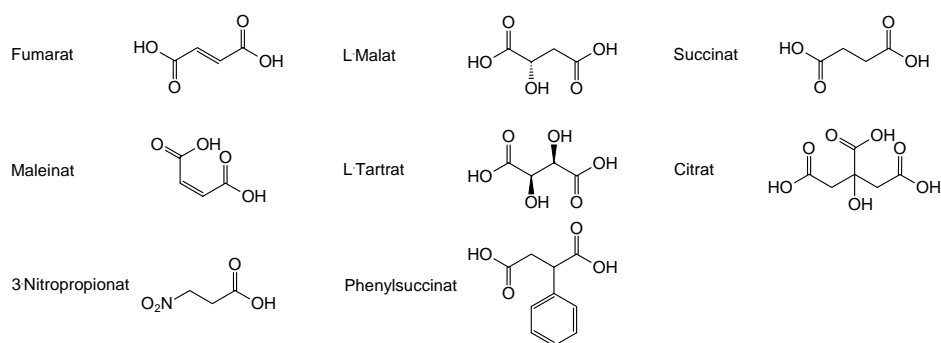


Abb. 19: Auswahl an Effektoren und Nicht-Effektoren von DcuS.

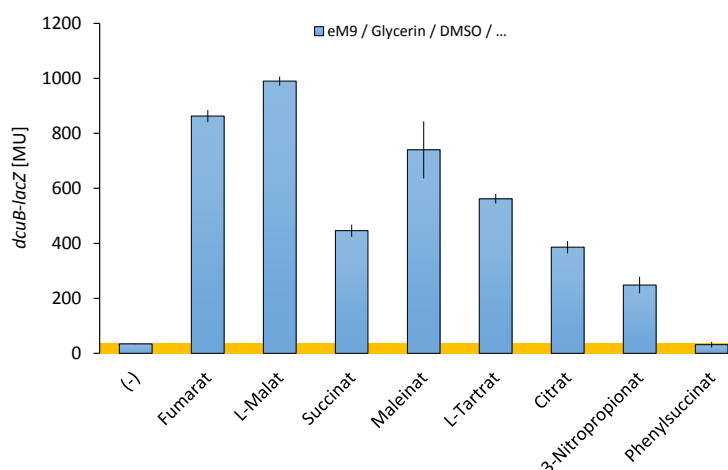


Abb. 20: Aktivierung von DcuS durch unterschiedliche Effektoren. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW237 anaerob, wie in 3.4 beschrieben, in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO sowie 50 mM der genannten Effektoren (3-Nitropropionat: 5 mM) gezüchtet. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Stammes IMW237 wieder.

Die geringe Hintergrundaktivität des *dcuB-lacZ*-Reporterstammes IMW237 wurde von 34 MU durch Fumarat um das 25-fache auf 863 MU gesteigert. Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate L-Malat, Succinat, Maleinat und L-Tartrat steigerten die Reporterexpression ähnlich deutlich um das 29-, 13-, 22- bzw. 17-fache. Von den Nicht-C<sub>4</sub>-Dicarboxylaten aktivierte Citrat die Reporterexpression stärker (Faktor 11,3) als 3-Nitropropionat (Faktor 7,3). Phenylsuccinat wurde bereits als Nicht-Effektor von DcuS beschrieben, ursächlich könnte hierfür der sperrige Phenylrest sein (WÖRNER, 2013). Ähnliches gilt für eine Sulfonat- oder Methoxygruppe an dieser Position (KNEUPER et al., 2005). Die *dcuB-lacZ*-Expression wurde entsprechend durch Phenylsuccinat nicht stimuliert und lag auf dem Hintergrundniveau des Stammes.

Der Einfluss der in Abb. 20 aufgeführten Effektoren auf die Translokation der zweiten Transmembranhelix wurde untersucht. Hierzu wurde die Cystein zugänglichkeitsstudie mit Einzelysteinvarianten ausschließlich im Bereich von TM2 und unter Einsatz der jeweiligen Effektoren mit einer Konzentration von 50 mM (3-Nitropropionat: 5 mM) durchgeführt. Die detaillierten Ergebnisse sind in den Abb. 22 - 35 gezeigt und werden hier und in Abb. 21 zusammenfassend beschrieben bzw. gezeigt.

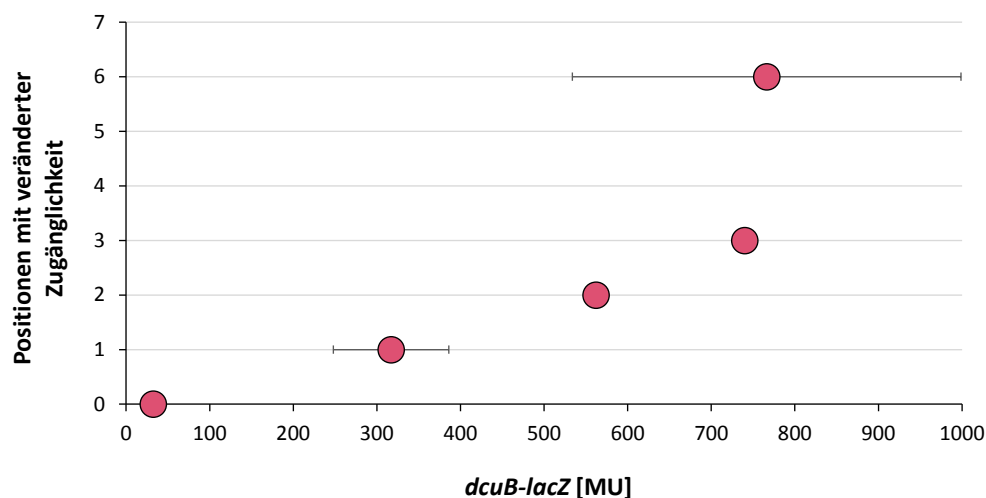
Die C<sub>4</sub>-Dicarboxylate L-Malat und Succinat (Abb. 22 - 25) hatten denselben Effekt auf die Cystein zugänglichkeit von TM2 wie Fumarat. Fumarat, L-Malat und Succinat sorgen daher für dieselbe Translokation von TM2 und versetzen sie in einen Zustand, der mit der maximalen DcuS-Aktivität einhergeht. Für Fumarat und L-Malat korreliert dieser Zustand mit der *dcuB-lacZ*-Expression, die auf ähnlich hohem Niveau stattfindet. Succinat hingegen stimuliert die Reporterexpression nur etwa halb so stark wie Fumarat oder L-Malat.

Maleinat (Abb. 26 und 27), ebenfalls ein C<sub>4</sub>-Dicarboxylat und das *cis*-Isomer von Fumarat, veränderte die Zugänglichkeit von drei Positionen: 179 und 182 wurden zugänglich, 205 wurde unzugänglich. Die Reste 185, 199 und 209 änderten ihre Zugänglichkeit im Vergleich zur Fumarat-Aktivierung nicht. Insgesamt fiel die Zugänglichkeitsveränderung geringer aus, dennoch war die Expression von *dcuB-lacZ* nur unwesentlich schwächer als mit Fumarat.

Für L-Tartrat, Citrat und 3-Nitropropionat (Abb. 28 - 33) fiel die Translokation der zweiten Transmembranhelix mit zwei bzw. einer sich verändernden Position für letztere Beiden nochmals geringer aus. Alle drei Effektoren bewirkten den Zugänglichkeitsverlust an Position 205. Nur L-Tartrat sorgte zusätzlich für die Zugänglichkeit an Position 179. Diese kontinuierliche Abnahme der Zugänglichkeitsveränderung steht im Zusam-

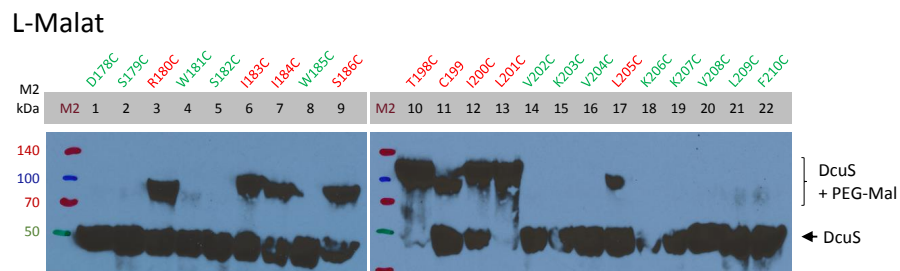
menhang mit einer von L-Tartrat über Citrat zu 3-Nitropropionat schwächer werdenden Stimulierung der Reporterexpression.

Phenylsuccinat (Abb. 34 - 35) zeigte erwartungsgemäß und entsprechend seiner fehlenden *dcuB-lacZ*-Expression keine Veränderung des Zugänglichkeitsmusters im Vergleich zum nicht-induzierten Zustand.

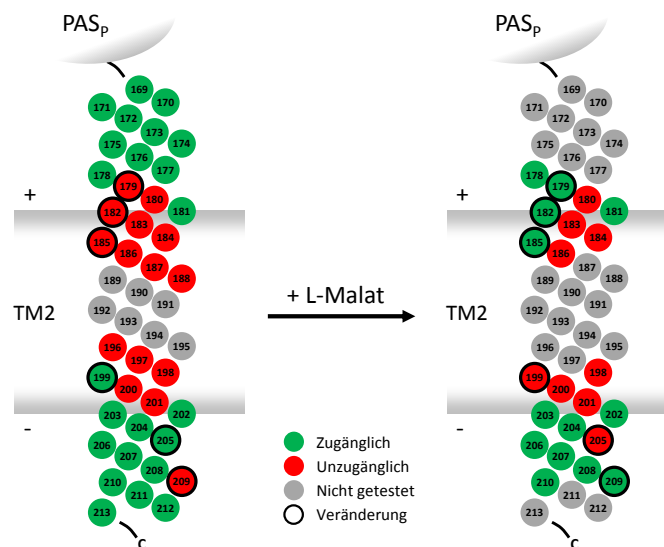


**Abb. 21:** Korrelation zwischen der DcuS-Aktivierung durch unterschiedliche Effektoren und der Anzahl an Positionen mit einer veränderter Zugänglichkeit. Als Maß für die Aktivierung von DcuS dient die Expressionsstärke der Reporterexpression *dcuB-lacZ* (siehe Abb. 20), die hier auf der Ordinate aufgetragen ist. Die Anzahl von Positionen mit einer veränderter Zugänglichkeit für jeden Effektor ergibt sich aus den Abb. 22 - 35.

Trotz Abweichungen insbesondere für Succinat und Maleinat stehen die gemessene *dcuB-lacZ*-Reporterexpression und das Ausmaß der Zugänglichkeitsänderungen im Bereich von TM2 in Verbindung (siehe Abb. 21). Mit zunehmender Stimulierung der *dcuB-lacZ*-Expression nimmt die Zahl an Positionen mit veränderter Zugänglichkeit zu. Damit gleichbedeutend korrelieren die DcuS-Aktivität und die Translokation von TM2. Folglich bestimmt letztere wie stark der Sensor angeregt wird und erlaubt dabei Aktivitäts- und Konformations-Zwischenstufen.

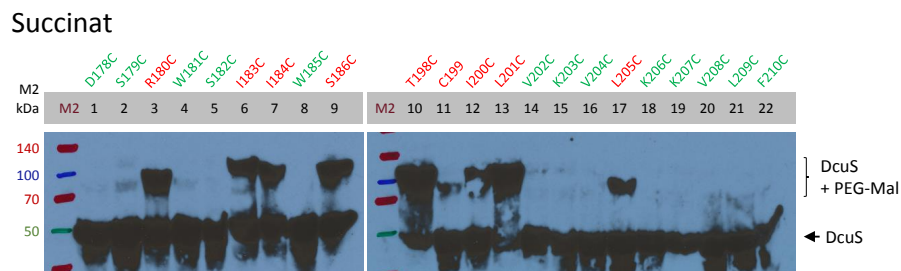


**Abb. 22:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch L-Malat. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 50 mM L-Malat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

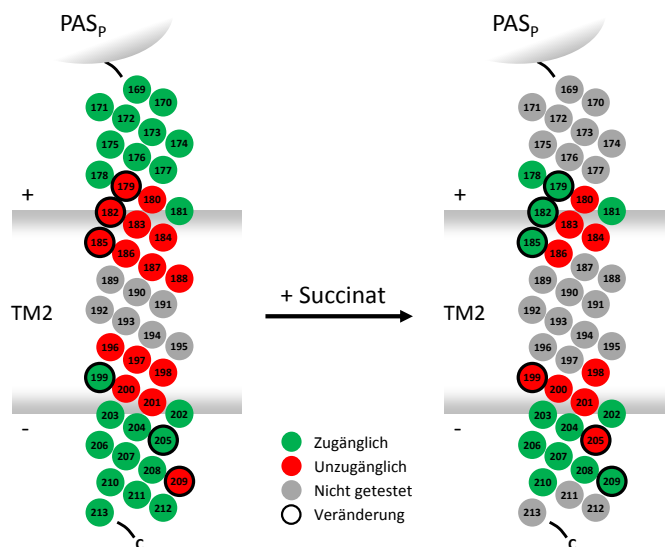


**Abb. 23:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch L-Malat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 22. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 179, 181, 182, 185, 202 - 204 und 206 - 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 180, 183, 184, 186, 198 - 201. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 179, 182, 185, 199, 205 und 209.

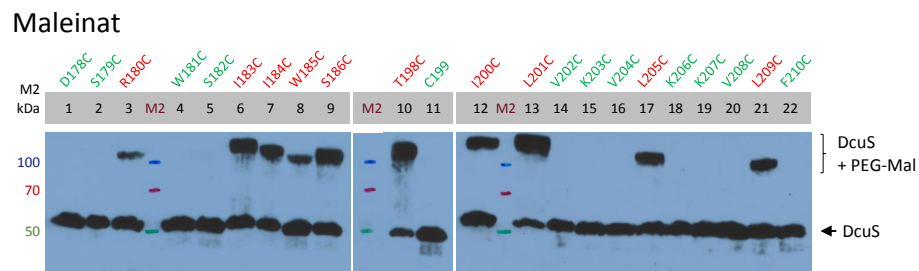
## 4 Ergebnisse



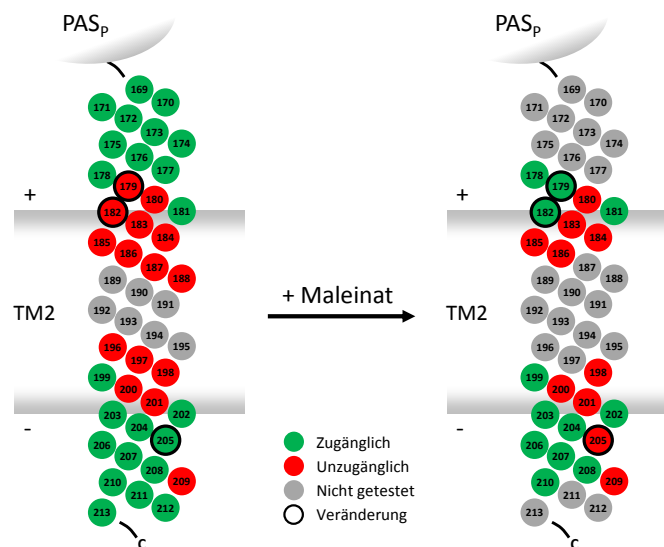
**Abb. 24:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch Succinat. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 50 mM Succinat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelsysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).



**Abb. 25:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch Succinat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 24. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 179, 181, 182, 185, 202 - 204 und 206 - 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 180, 183, 184, 186, 198 - 201. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 179, 182, 185, 199, 205 und 209.

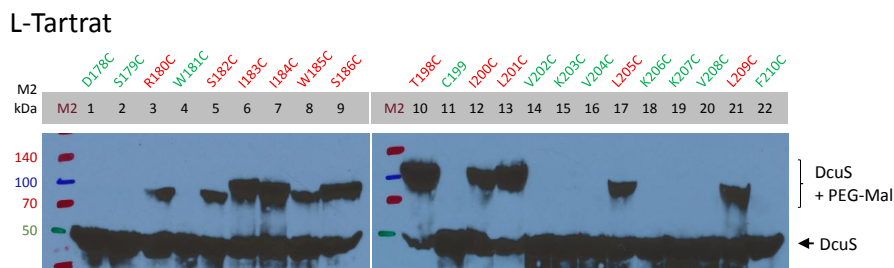


**Abb. 26:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch Maleinat. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 50 mM Maleinat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

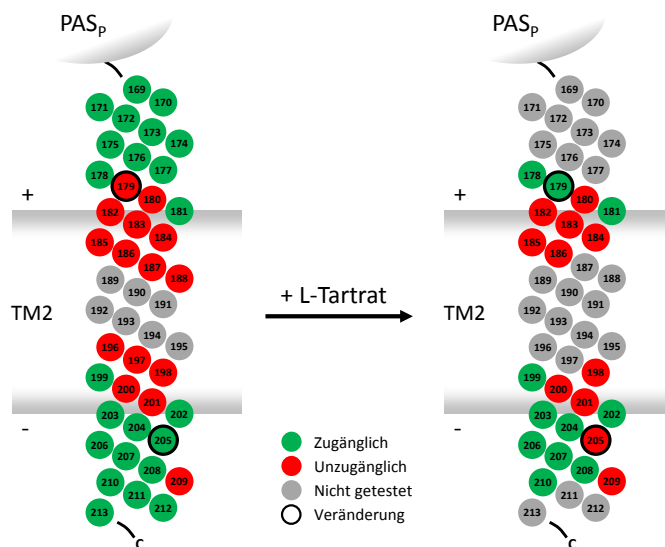


**Abb. 27:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch Maleinat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 26. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 179, 181, 182, 199, 202 - 204, 206 - 208 und 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 180, 183 - 186, 198, 200, 201, 205 und 209. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 179, 182 und 205.

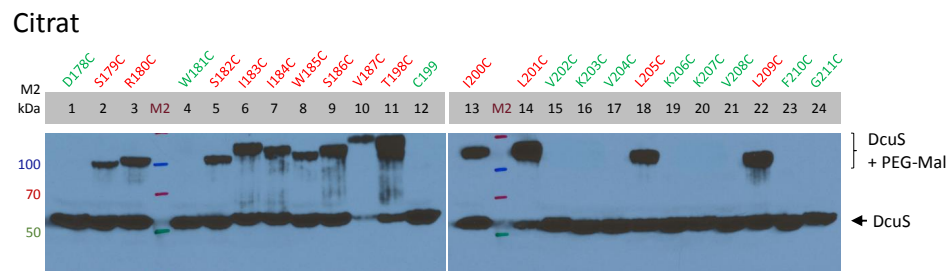
## 4 Ergebnisse



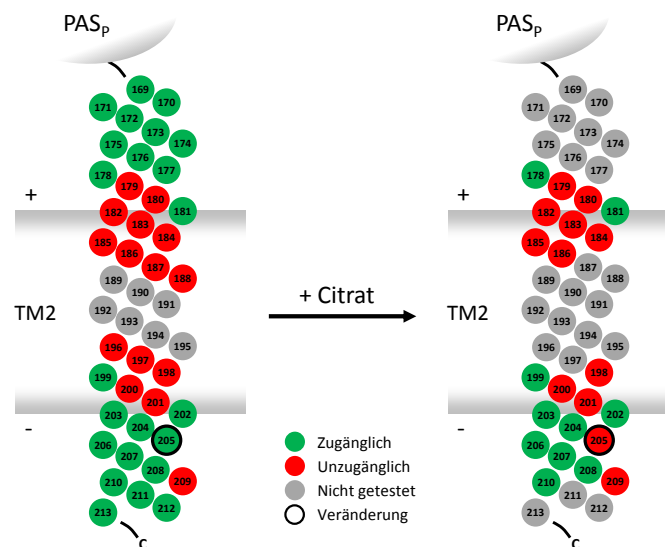
**Abb. 28:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch L-Tartrat. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 50 mM L-Tartrat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).



**Abb. 29:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch L-Tartrat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 28. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 179, 181, 199, 202 - 204, 206 - 208 und 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 180, 182 - 185, 198, 200, 201, 205 und 209. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 179 und 205.

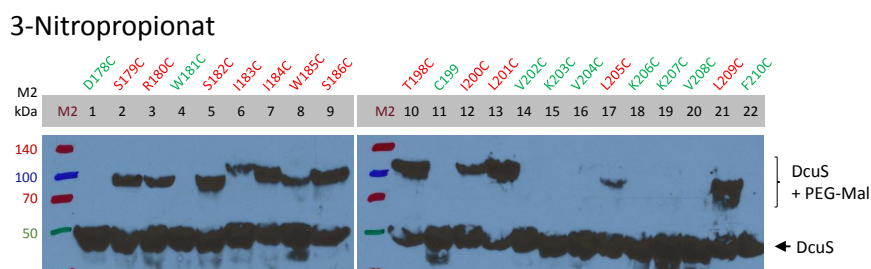


**Abb. 30:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch Citrat. Die Zugänglichkeit von 24 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 50 mM Citrat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-24: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

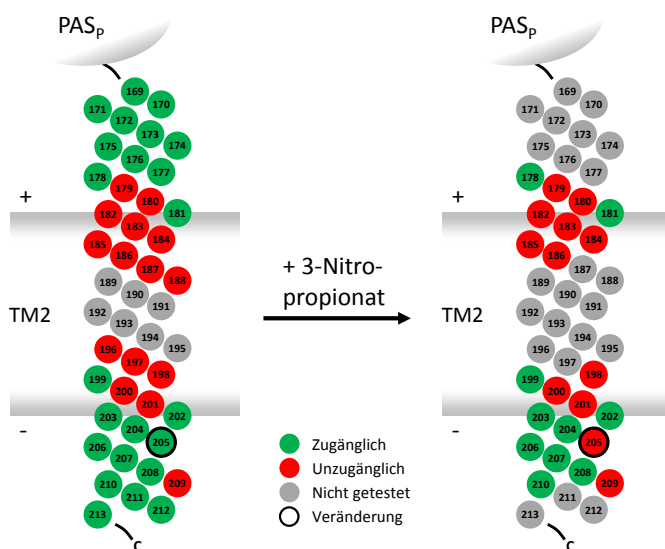


**Abb. 31:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch Citrat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 30. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 181, 199, 202 - 204, 206 - 208 und 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 179, 180, 182 - 186, 198, 200, 201, 205 und 209. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 205.

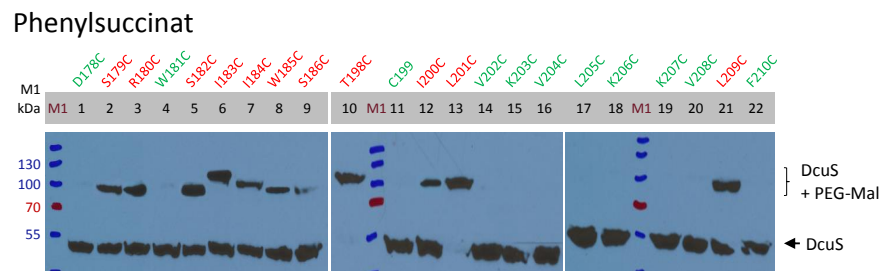
## 4 Ergebnisse



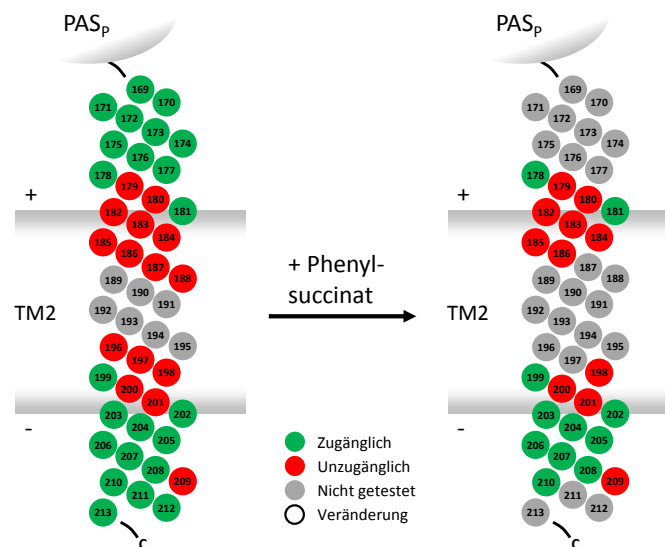
**Abb. 32:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch 3-Nitropropionat. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 5 mM 3-Nitropropionat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).



**Abb. 33:** Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2 durch 3-Nitropropionat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 32. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 181, 199, 202 - 204, 206 - 208 und 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 179, 180, 182 - 186, 198, 200, 201, 205 und 209. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 205.



**Abb. 34:** Veränderung der Cysteinenzugänglichkeit von TM2 durch Phenylsuccinat. Die Zugänglichkeit von 22 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen in Anwesenheit von 50 mM Phenylsuccinat wurde durch SCAM (siehe 3.6.4) ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1-22: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

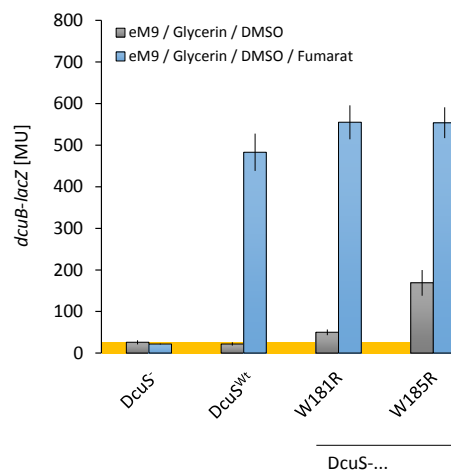


**Abb. 35:** Veränderung der Cysteinenzugänglichkeit von TM2 durch Phenylsuccinat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 34. Ohne Effektor zugänglich: 169 - 178, 181, 199, 202 - 208 und 210 - 213. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 180, 182 - 188, 196 - 198, 200, 201 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 181, 199, 202 - 208 und 210. Ohne Fumarat unzugänglich: 179, 180, 182 - 186, 198, 200, 201 und 209. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: keine.

### 4.1.1.6 Substituierte Argininreste in TM2 verschieben diese in ihren aktiven Signalzustand

Der Einbau einer Helix in die Cytoplasmamembran und deren dortige Stabilität wird u.a. durch die physikochemischen Eigenschaften ihrer Reste bestimmt (WHITE und VON HEIJNE, 2008). Hydrophobe Reste wie Leucin, Valin, Isoleucin und Alanin machen mit knapp 50 % den Großteil einer Transmembranhelix aus (BAEZA-DELGADO et al., 2013). Positiv geladene Reste wie Arginin benötigen hingegen Wasser zur Hydratisierung und finden sich daher bevorzugt außerhalb des hydrophoben Inneren einer Membran (ROUX, 2007). Im Bereich der (negativ geladenen) polaren Kopfgruppen von Phospholipiden bildet das positiv geladene Arginin zahlreiche Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen aus und stabilisiert seine Lage dort (LI et al., 2013). Tryptophan besitzt hingegen durch einen aromatischen Indol-Ring einen lipophilen Charakter, gleichzeitig bietet die sekundäre Aminogruppe des Pyrrol-Rings als Wasserstoffbrückendonator hydrophile Eigenschaften. Tryptophan ist in Transmembranhelices überrepräsentiert und ordnet sich dort im Grenzbereich zwischen hydrophobem Kern und polaren Kopfgruppen an (SCHIFFER et al., 1992).

Argininreste in einer Transmembranhelix orientieren sich weiter in Richtung Membranaußeres als Tryptophanreste. DcuS besitzt u.a. zwei Tryptophanreste am N-Terminus von TM2, W181 und W185. Die zugehörigen Positionen 181 und 185 waren die letzten zugänglichen Reste in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des Effektors Fumarat (siehe 4.1.1.3). Die Substitution dieser Tryptophane gegen Argininreste aktivierte DcuS in effektorunabhängiger Form. Wie Abb. 36 zeigt, wurde die *dcuB-lacZ*-Expression ohne Fumarat in der Variante DcuS-W181R um das 2,3-fache und in der Variante DcuS-W185R um das 7,7-fache gesteigert. Dadurch sank der Faktor der Fumarat-abhängigen Stimulierung der Reportergenfusion von 22 im Wildtyp auf 11 (DcuS-W181R) bzw. 3,3 (DcuS-W185R). Je tiefer der substituierte Argininrest in der Membranhelix lokalisiert ist, desto stärker wird DcuS effektorunabhängig stimuliert.



**Abb. 36:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und die Varianten W181R und W185R. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS::Kan<sup>R</sup>*) mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

Ob der Austausch der Tryptophanreste durch Argininreste auch die Zugänglichkeit der zweiten Transmembranhelix ändert, sollte mit der Cysteinzugänglichkeitsstudie untersucht werden. In Einzelsysteinvarianten aus dem Bereich von TM2, die eine veränderte Zugänglichkeit durch Fumarat zeigten (siehe 4.1.1.3), wurden die Mutationen W181R bzw. W185R eingebracht. Abb. 37 zeigt die Ergebnisse im zugehörigen Western-Blot und die Abb. 38 und 39 stellen diese im Modell für W181R bzw. W185R dar.

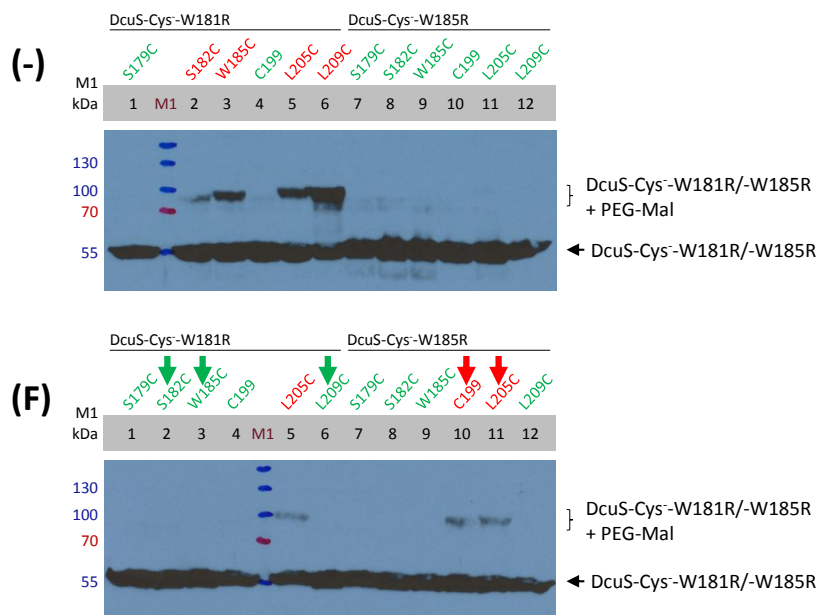
Für W181R waren ohne Effektor die Positionen 179 und 199 für NEM zugänglich; 182, 185, 205 und 209 waren unzugänglich. Fumarat machte die Positionen 182, 185 und 209 darüber hinaus zugänglich. Damit entsprach das Zugänglichkeitsmuster der Variante W181R im nicht-aktivierten Zustand dem durch L-Tartrat stimulierten Wildtyp (siehe Abb. 29). Die Mutation W181R und ein schwacher Effektor haben folglich den gleichen Einfluss auf die Translokation von TM2. In Anwesenheit des Effektors Fumarat waren die Zugänglichkeitsmuster der Variante W181R und des Wildtyps nahezu identisch, die Position 199 bildete hier die Ausnahme. Damit korrelierte die für die *dcuB-lacZ*-Expression beobachtete Stimulierung von DcuS-W181R auch mit der Cysteinzugänglichkeit, die sich an drei Positionen änderte.

Ohne Effektor entsprach DcuS-W185R zumindest teilweise dem Zugänglichkeitsmuster des durch Maleinat angeregten Wildtyps (179 und 182 waren für NEM zugänglich). Die Mutation W185R verhält sich daher wie ein mittel-starker Effektor auf die Trans-

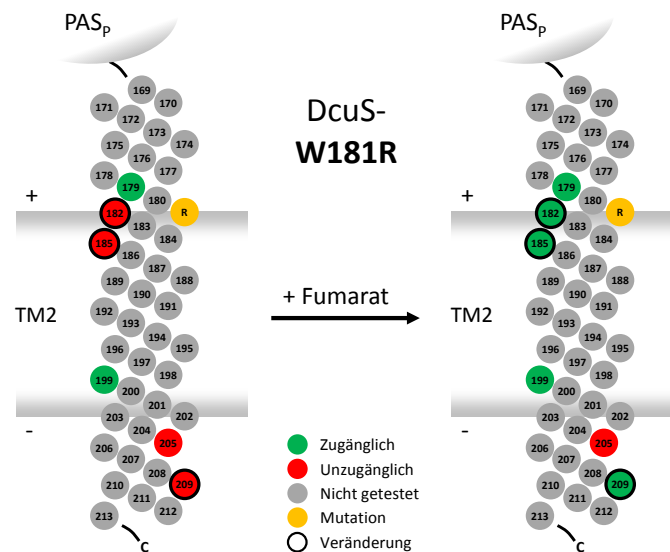
## 4 Ergebnisse

lokation von TM2. Mit Fumarat wurden die Positionen 199 und 205 unzugänglich, das resultierende Zugänglichkeitsmuster stimmte mit dem Wildtyp im vollen Umfang überein.

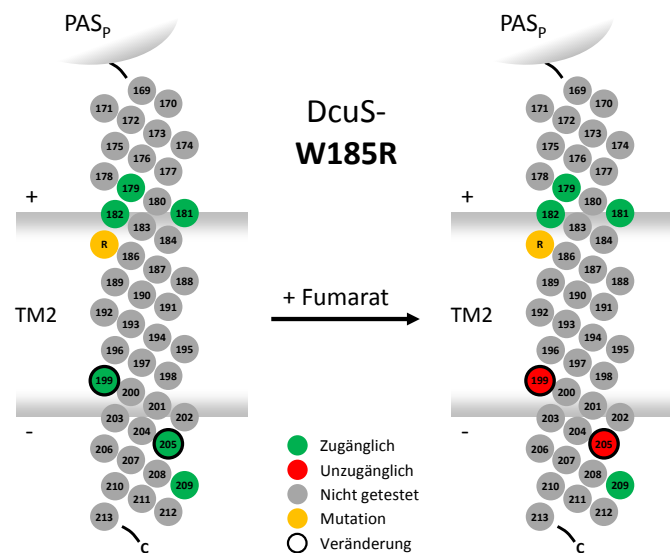
Die beschriebene Zunahme der effektorunabhängigen DcuS-Aktivierung mit einer fortschreitenden Tiefe des Argininrestes in der Transmembranhelix, wie sie für die *dcuB-lacZ*-Expression beobachtet wurde, zeigte sich somit in Teilen auch für die Cysteinzugänglichkeit. Nimmt man die Positionen auf periplasmatischer Seite als Maßstab und vergleicht sie mit der Zugänglichkeit des nicht-aktivierten Wildtyps, dann zeigte W181R mit der Position 179 eine weitere zugängliche Position und W185R zwei zusätzliche Positionen (179 und 182). Ein tiefer in die Transmembranhelix substituierter Argininrest transloziert TM2 stärker und steigert dadurch die effektorunabhängige DcuS-Aktivität.



**Abb. 37:** Cysteinzugänglichkeit in DcuS-W181R/DcuS-W185R und Veränderung durch Fumarat. Die Zugänglichkeit von 6 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen wurde in den Varianten DcuS-W181R und DcuS-W185R durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat, ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M1: PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder. 1-12: DcuS-Einzelsysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).



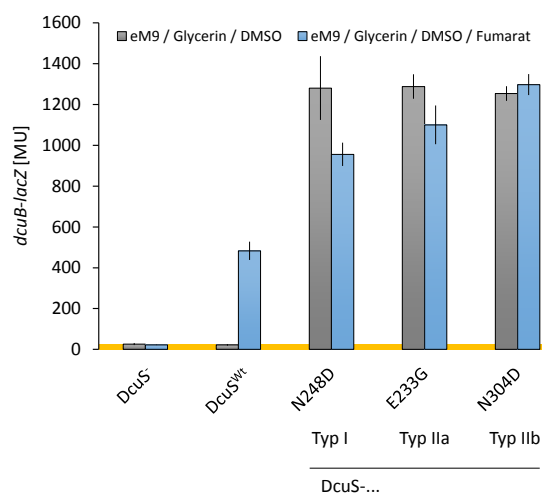
**Abb. 38:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-W181R und Veränderung durch Fumarat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 37, linke Blothälfte. Ohne Effektor zugänglich: 179 und 199. Ohne Effektor unzugänglich: 182, 185, 205 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 179, 182, 185, 199 und 209. Ohne Fumarat unzugänglich: 205. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 182, 185 und 209.



**Abb. 39:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-W185R und Veränderung durch Fumarat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 37, rechte Blothälfte. Ohne Effektor zugänglich: 179, 181, 182, 199, 205 und 209. Ohne Effektor unzugänglich: keine. Mit Fumarat zugänglich: 179, 181, 182 und 209. Ohne Fumarat unzugänglich: 199 und 205. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 199 und 205.

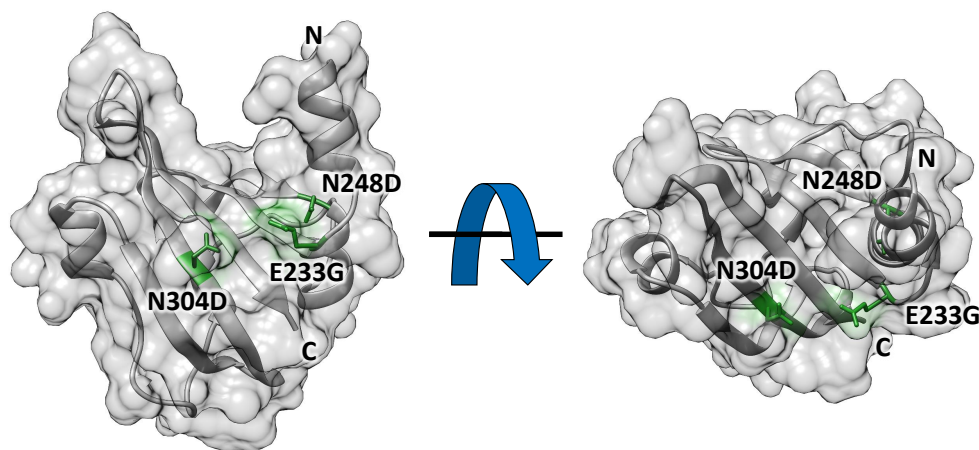
4.1.1.7 PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen bewirken rückläufig die Translokation von TM2

Die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS<sub>c</sub>) verbindet die zweite Transmembranhelix mit der Kinasedomäne in DcuS. Sie erstreckt sich über die Positionen 212 - 323 und besitzt die typische Faltung cytoplasmatischer PAS-Domänen: Ein zentrales fünfsträngiges  $\beta$ -Faltblattgerüst mit N-terminalen und zentralen  $\alpha$ -Helices (KNEUPER et al., 2010). PAS<sub>c</sub> dient der Signalweiterleitung zur Kinasedomäne (ETZKORN et al., 2008), siehe dazu auch Abschnitt 4.2, interagiert mit dem Co-Regulator DctA und dient dem Zusammenfluss der Signale von PAS<sub>p</sub> und DctA (WITAN et al., 2012b). Innerhalb von PAS<sub>c</sub> wurden zahlreiche ON-Mutationen gefunden, die den Sensor effektorunabhängig aktivieren. Die ON-Mutationen wurden anhand ihres Einflusses auf die DcuS-Homodimerisierung und die DcuS/DctA-Interaktion in drei Klassen unterteilt: Typ I, Typ IIa und Typ IIb. Typ I homodimerisiert und interagiert nicht. Typ II homodimerisiert, aber nur Typ IIb lässt die Interaktion zu DctA unberührt (MONZEL et al., 2013). Stellvertretend für die drei Klassen zeigt Abb. 40 die Reporterexpression für die DcuS-Varianten N248D (Typ I), E233G (Typ IIa) und N304D (Typ IIb). Alle Drei aktivierten DcuS effektorunabhängig, und Fumarat führte zu keiner weiteren Steigerung der *dcuB-lacZ*-Expression. Die Reporterexpression wurde 2- bis 2,7-fach stärker exprimiert als im aktivierten Wildtyp.



**Abb. 40:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und PAS<sub>c</sub>-ON-Varianten. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS*::Kan<sup>R</sup>) mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

Die Lage dieser drei ON-Mutationen E233G, N248D und N304D im Oberflächenstrukturmodell von PAS<sub>c</sub> ist in Abb. 41 dargestellt.



**Abb. 41:** Lage der PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen E233G, N248D und N304D im Oberflächenstrukturmodell. Die Modellierung der PAS<sub>c</sub> Struktur erfolgte durch den SWISS-MODEL Server mit PAS1 von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (2GJ3) als Vorlage (BIASINI et al., 2014).

Alle PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen bewirkten C-terminal die Stimulierung der Kinaseaktivität in DcuS. Ob durch die ON-Mutationen auch N-terminal die Translokation der zweiten Transmembranhelix verändert wird, sollte durch eine Cysteinzugänglichkeitsstudie überprüft werden. Hierzu wurden die Einzelcysteinvarianten entweder aller oder sieben ausgewählter Positionen im Bereich von TM2, die das Zugänglichkeitsmuster der gesamten Transmembranhelix repräsentieren, mit den drei exemplarischen ON-Mutationen aus PAS<sub>c</sub> kombiniert. Die Ergebnisse sind im Western-Blot und im Modell in den Abb. 42 - 47 dargestellt und werden an dieser Stelle zusammenfassend beschrieben.

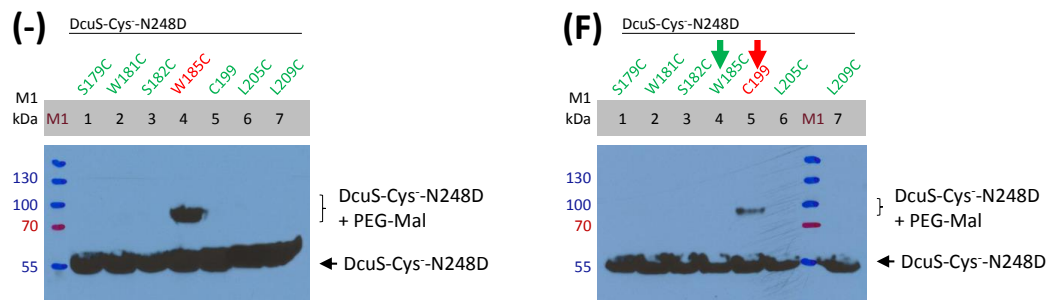
Die auffälligste Änderung im Zugänglichkeitsmuster wurde für N248D beobachtet. Im Gegensatz zum nicht-stimulierten Wildtyp waren die Reste 179, 182 und 209 für NEM bereits in Abwesenheit des Effektors zugänglich. Fumarat bewirkte den Zugänglichkeitsgewinn von 185 und den Zugänglichkeitsverlust an Position 199. Dieses Muster entsprach dem stimulierten Wildtyp mit Ausnahme der Position 205, die in N248D zugänglich war im Wildtyp aber unzugänglich ist. Entsprechend der effektorunabhängigen *dcuB-lacZ*-Expression ähnelte die Zugänglichkeit von DcuS-N248D dem Fumarat-stimulierten Wildtyp. Der Zugänglichkeitsgewinn durch Fumarat für Position 185 bei gleichzeitigem Verlust für Position 199 deuten dennoch auf eine Translokation von TM2 als Reakti-

on auf den Effektor hin. Diese Beobachtung aus der Cysteinzugänglichkeitsstudie steht dadurch im Widerspruch zur DcuS-Aktivität, die keine weitere Stimulierung durch Fumarat erfährt.

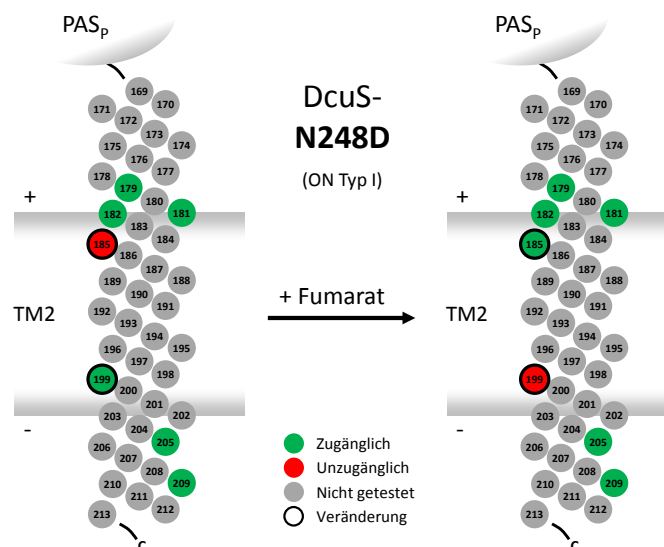
Ähnliches gilt auch für die ON-Variante DcuS-E233G. Ohne Effektor entsprach das Zugänglichkeitsmuster in dieser Variante der Zugänglichkeit des Wildtyps nach Aktivierung durch den mittel-starken Effektor Maleinat (siehe Abb. 27). Mit Fumarat erlangte E233G jedoch das Zugänglichkeitsmuster des Fumarat-aktivierten Wildtyps (siehe Abb. 14). Die Cysteinzugänglichkeit zeigte daher im Gegensatz zur Reporterexpression eine Reaktion auf den Stimulus Fumarat.

Entsprechendes galt auch für die Cysteinzugänglichkeit der dritten ON-Mutation N304D. Sie erlangte auf cytoplasmatischer Seite durch Verlust der Zugänglichkeit an Position 199 und Erwerb der Zugänglichkeit an Position 209 ein zum Fumarat-aktivierten Wildtyp identisches Zugänglichkeitsmuster. Diese Reaktion widersprach der fehlenden Stimulierung der Reporterexpression durch Fumarat.

Somit ähnelten sich die Zugänglichkeitsmuster aller  $PAS_c$ -ON-Varianten untereinander und entsprachen mit und ohne Fumarat weitgehend dem aktivierten Wildtyp. Diese Informationen zu den Veränderungen in der Position von TM2 lassen vermuten, dass  $PAS_c$ -ON-Mutationen rückläufig die Änderung der Cysteinzugänglichkeit von N-terminal gelegenen Positionen bewirken. Die Translokation von TM2 in ihren aktiven Zustand, hervorgerufen durch ON-Mutationen in  $PAS_c$ , korreliert mit der effektorunabhängigen Aktivität von DcuS. Das Zugänglichkeitsmuster von  $PAS_c$ -ON-Mutationen vom Typ II (E233G und N304D) ließ sich am Besten mit der Zugänglichkeit des Wildtyps vergleichen und bestätigt damit die Annahme, dass ON-Mutationen in  $PAS_c$  vom Typ II keine drastischen Strukturänderungen hervorrufen (MONZEL et al., 2013)

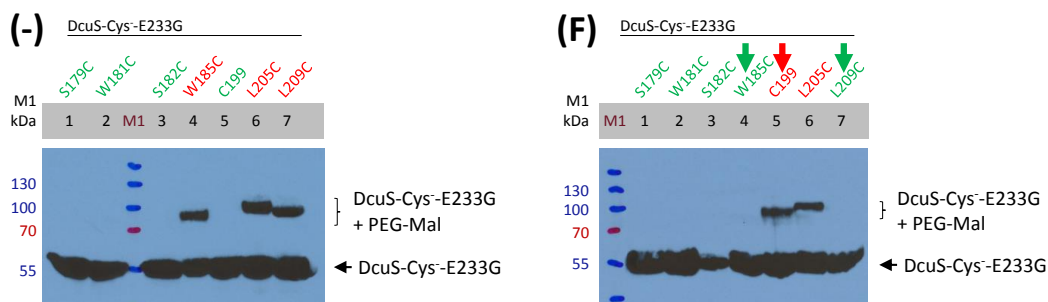


**Abb. 42:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-N248D und Veränderung durch Fumarat. Die Zugänglichkeit von 7 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen wurde in der PAS<sub>c</sub>-ON-Typ-I-Variante DcuS-N248D durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat, ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1-7: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).

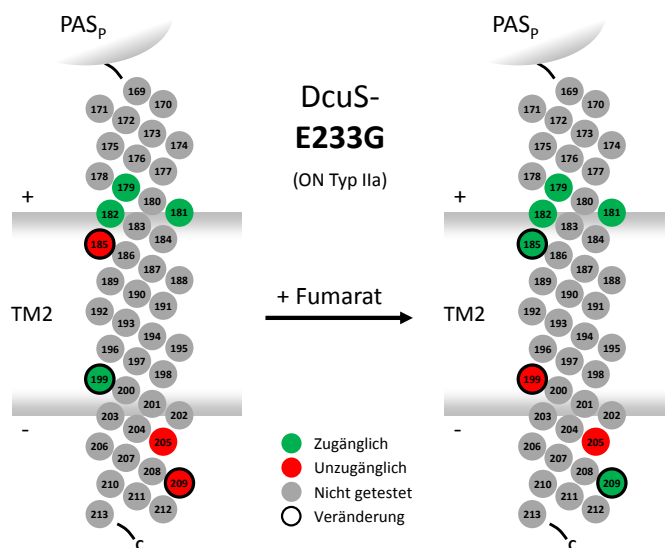


**Abb. 43:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-N248D und Veränderung durch Fumarat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 42. Ohne Effektor zugänglich: 179, 181, 182, 199, 205 und 209. Ohne Effektor unzugänglich: 185. Mit Fumarat zugänglich: 179, 181, 182, 185, 205 und 209. Ohne Fumarat unzugänglich: 199. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 185 und 199.

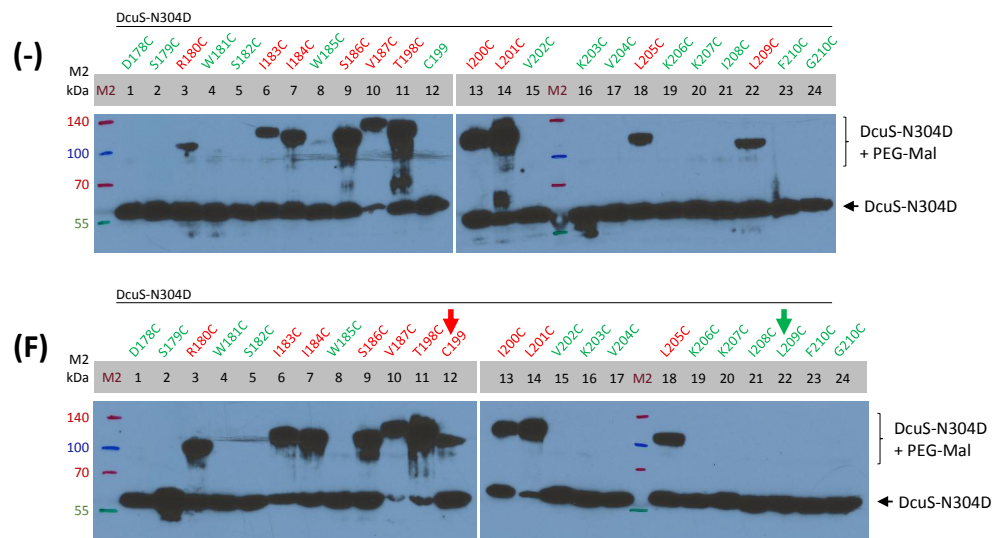
## 4 Ergebnisse



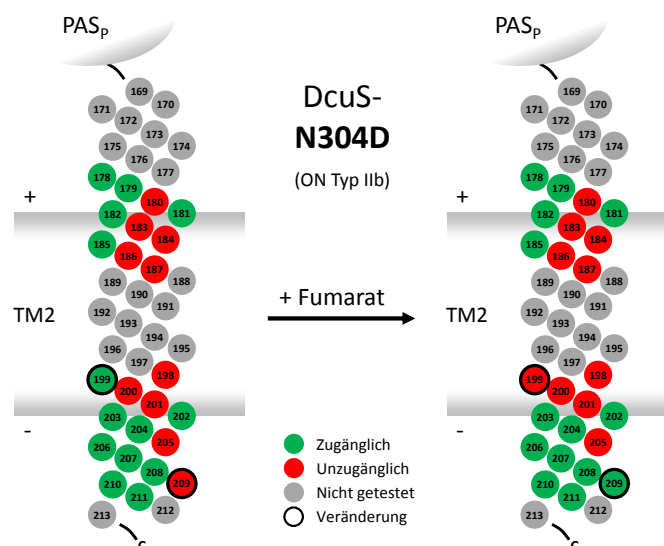
**Abb. 44:** Cystein zugänglichkeit in DcuS-E233G und Veränderung durch Fumarat. Die Zugänglichkeit von 7 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen wurde in der PAS<sub>c</sub>-ON-Typ-IIa-Variante DcuS-E233G durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat, ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. 1-7: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).



**Abb. 45:** Cystein zugänglichkeit in DcuS-E233G und Veränderung durch Fumarat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 44. Ohne Effektor zugänglich: 179, 181, 182 und 199. Ohne Effektor unzugänglich: 185, 205 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 179, 181, 182, 185 und 209. Ohne Fumarat unzugänglich: 199 und 205. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 185, 199 und 209.



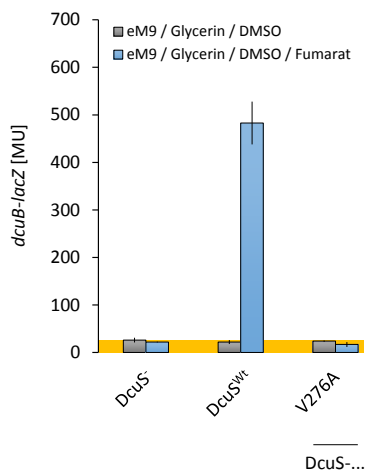
**Abb. 46:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-N304D und Veränderung durch Fumarat. Die Zugänglichkeit von 24 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen wurde in der PAS<sub>c</sub>-ON-Typ-IIb-Variante DcuS-N304D durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat, ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. 1-24: DcuS-Einzelcysteinvarianten wie angegeben (siehe Tab. 6).



**Abb. 47:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-N304D und Veränderung durch Fumarat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 46. Ohne Effektor zugänglich: 178, 179, 181, 182, 185, 199, 202 - 204, 206 - 208, 210 und 211. Ohne Effektor unzugänglich: 180, 183, 184, 186, 187, 198, 200, 201, 205 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 178, 179, 181, 182, 185, 202 - 204 und 206 - 211. Ohne Fumarat unzugänglich: 180, 183, 184, 186, 187, 198 - 201 und 205. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 199 und 209.

4.1.1.8 Eine  $PAS_c$ -OFF-Mutation hat keinen rückläufigen Effekt auf TM2

In  $PAS_c$  sind neben zahlreicher ON-Mutationen auch mehrere OFF-Mutationen bekannt (MONZEL et al., 2013). Diese inaktivieren den Sensor permanent, d.h. auch Effektoren bewirken keine Stimulierung der Reporterexpression. Analog zu den ON-Mutationen (siehe 4.1.1.7) sollte auch für eine OFF-Mutation aus  $PAS_c$  überprüft werden, welche Auswirkungen diese auf die Cysteinzugänglichkeit von TM2 hat. Exemplarisch wurde hierfür die OFF-Mutation V276A gewählt. Wie in Abb. 48 dargestellt verhindert diese die Aktivierung von DcuS, d.h. die Expression der Reporterfusion *dcuB-lacZ* bleibt mit und ohne Fumarat auf dem Niveau der Hintergrundexpression.

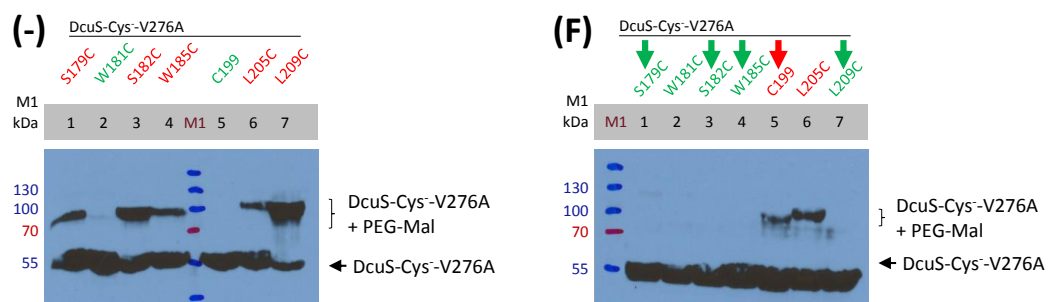


**Abb. 48:** Inhibierung der *dcuB*-Expression durch eine  $PAS_c$ -OFF-Mutation. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS::Kan<sup>R</sup>*) mit plasmidcodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. dessen Variante (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

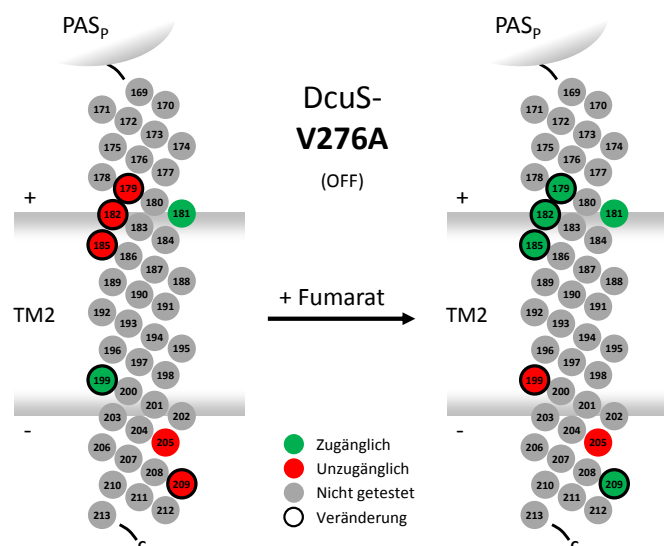
Die sieben ausgewählten Positionen im Bereich von TM2, die das Zugänglichkeitsmuster der gesamten Transmembranhelix repräsentieren, wurden mit der OFF-Mutation V276A kombiniert. Die Ergebnisse der Cysteinzugänglichkeit sind als Western-Blot und Modell in den Abb. 49 und 50 gezeigt.

Die Cysteinzugänglichkeiten für V276A waren mit denen des Wildtyps nahezu identisch (siehe Abb. 14). Einzige Ausnahme bildete die Position 205, die bereits ohne einen Effektor unzugänglich war. Im Gegensatz zur Reporterexpression hatte Fumarat somit einen deutlichen Effekt auf die Zugänglichkeit der getesteten Positionen. Das Ausmaß

der durch Fumarat hervorgerufenen Translokation von TM2 ähnelte der des Wildtyps. Während V276A C-terminal die Phosphorylierung in der Kinasedomäne verhindert, wird N-terminal der aktive Signalzustand (Translokation von TM2) eingenommen. Die OFF-Mutation in PAS<sub>c</sub> scheint demzufolge eher die Signalweiterleitung zu blockieren als die Sensitivität von DcuS für Fumarat aufzuheben.



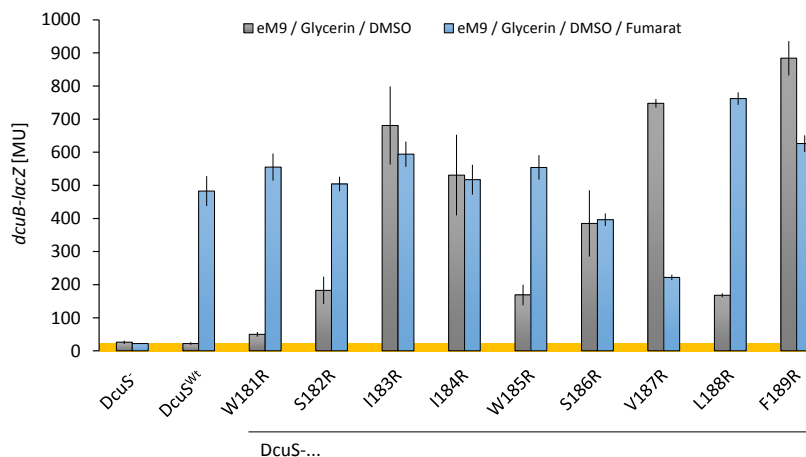
**Abb. 49:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-V276A und Veränderung durch Fumarat. Die Zugänglichkeit von 7 substituierten Cysteinen in TM2 und angrenzenden Bereichen wurde in der PAS<sub>c</sub>-OFF-Variante DcuS-V276A durch SCAM (siehe 3.6.4) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (F) von 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat, ermittelt. Unzugängliche Cysteinreste sind rot beschriftet, zugängliche Cysteinreste grün. Pfeile markieren Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.



**Abb. 50:** Cysteinenzugänglichkeit in DcuS-V276A und Veränderung durch Fumarat. Modellhafte Darstellung wie Abb. 12, entsprechend des SCAM Experiments in Abb. 49. Ohne Effektor zugänglich: 181 und 199. Ohne Effektor unzugänglich: 179, 182, 185, 205 und 209. Mit Fumarat zugänglich: 179, 181, 182, 185 und 209. Ohne Fumarat unzugänglich: 199 und 205. Positionen mit veränderter Zugänglichkeit: 179, 182, 185, 199 und 209.

#### 4.1.2 Substituierte Argininreste im periplasmanahen Teil von TM2 aktivieren DcuS effektorunabhängig

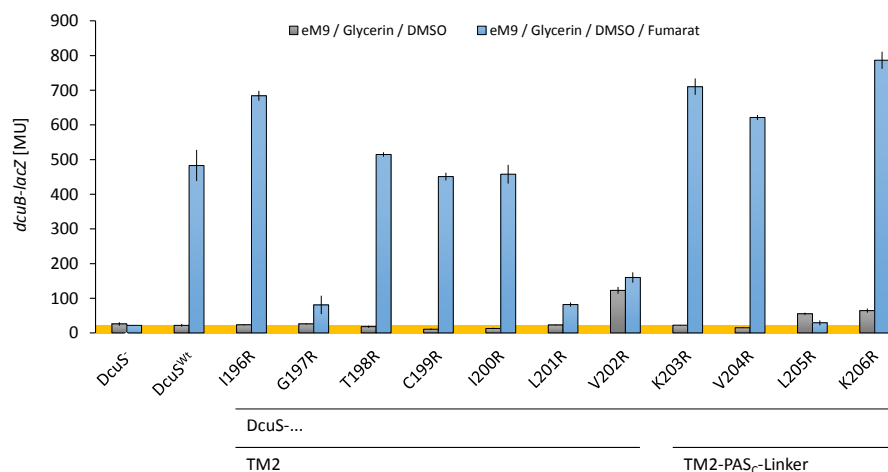
Wie bereits unter 4.1.1.6 beschrieben bevorzugen Argininreste in einer Transmembranhelix eine Lokalisierung im Bereich der polaren Kopfgruppen, d.h. außerhalb des lipophilen Kerns einer Cytoplasmamembran (ROUX, 2007; LI et al., 2013). Der dort beschriebene Austausch von zwei Resten der zweiten Transmembranhelix gegen Argininreste wurde auf den gesamten Bereich von 181 - 189 erweitert, d.h. an jeder dieser Positionen wurde ein Argininrest eingebaut. Die resultierenden Varianten DcuS-W181R - DcuS-F189R wurden hinsichtlich ihrer DcuS-Aktivität untersucht. Als Aktivitätsmaß für den Sensor kann die Expression eines durch das Zwei-Komponenten-System regulierten Genes dienen. Für DcuSR nutzt man das Gen *dcuB*, das für den anaeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Antiporter DcuB codiert und erzeugt eine Reporterfusion aus dessen Promotor und dem *lacZ*-Gen, das für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert. Es wurde daher der Einfluss der substituierten Argininvarianten auf die *dcuB-lacZ*-Expression untersucht und mit dem Wildtyp verglichen, Abb. 51 zeigt die Resultate.



**Abb. 51:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und Varianten mit substituierten Argininen im periplasmanahen Bereich von TM2. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS::Kan<sup>R</sup>*) mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

In allen Varianten wurde *dcuB-lacZ* effektorunabhängig exprimiert. Im Vergleich zum inaktiven Wildtyp war diese Expression um einen Faktor 2,3 - 40,2 stärker und erreichte so 10 - 183 % der Expression des aktivierten Wildtyps. Sie steigerte sich nicht kontinuierlich von Position zu Position, zeigte aber bei linearer Regression eine zunehmende Tendenz. Die Reporterexpression in Anwesenheit von Fumarat schwankte ebenfalls, jedoch deutlich schwächer und blieb tendenziell auf einem gleichbleibend hohem Level. Näherungsweise gilt demnach, je weiter C-terminal ein Argininrest in TM2 eingebaut wird, desto stärker wird DcuS effektorunabhängig aktiviert, die Fumarat-abhängige Aktivität bleibt davon jedoch weitestgehend unberührt. Diese Beobachtung entspricht der Annahme, die aus den Zusammenhängen zwischen der DcuS-Aktivität und der Cystein-zugänglichkeit für die Varianten W181R und W185R (siehe 4.1.1.6) gezogen wurde, dass mit fortschreitender Substitution eines Argininrestes, TM2 stärker transloziert wird.

Ob Argininreste auf cytoplasmatischer Seite der Transmembranhelix ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität von DcuS haben, sollte durch eine entsprechende Substitution der Reste 196 - 206 untersucht werden (Abb. 52).



**Abb. 52:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und Varianten mit substituierten Argininresten im cytoplasmannahen Bereich von TM2 und dem Linker zwischen TM2 und PAS<sub>c</sub>. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS*::Kan<sup>R</sup>) mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

Im Gegensatz zu den Substitutionen auf periplasmatischer Seite aktivierten Argininreste an den meisten Positionen DcuS nicht effektorunabhängig. Lediglich die Varianten DcuS-V202R, -L205R und -K206R stimulierten *dcuB-lacZ* ohne Einfluss eines Effektors (Faktoren 2,5 - 5,6). Diese Aktivierung war jedoch deutlich schwächer als in den periplasmatischen Argininvarianten. Darüber hinaus verringerte sich die Reporterexpression in Anwesenheit von Fumarat für die Varianten DcuS-G197R, -L201R, und -L205R auf 6 - 17 % des aktivierten Wildtyps.

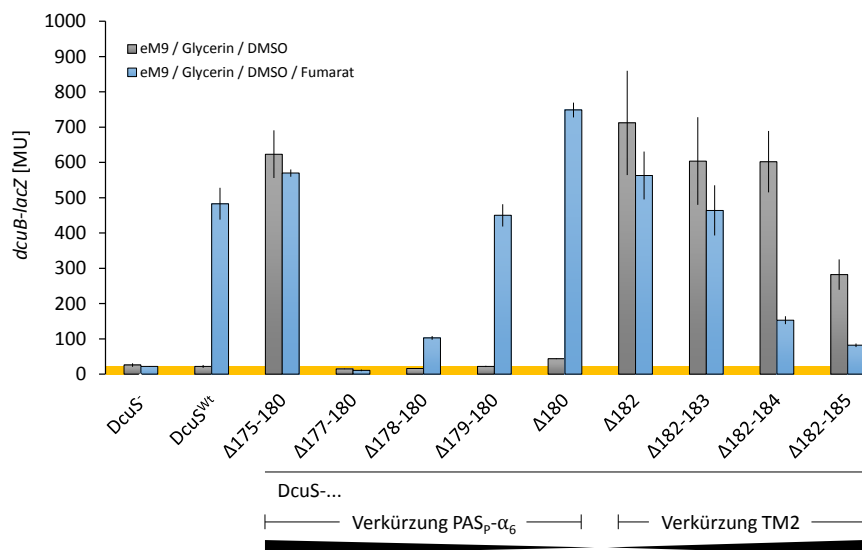
Die Substitution G197R könnte einen Teil des GxxxG-Motives und damit die Dimerisierungsfläche von TM2 betreffen (STEINMETZ, 2014). Im GxxxG-Motiv liegen bevorzugt Glycine auf einer gemeinsamen Seite einer Helix und erlauben dort die dichte Packung zweier Helices (RUSS und ENGELMAN, 2000). Störungen der Dimerisierungsfläche durch Austausch der Glycine im GxxxG-Motiv beeinträchtigen die Funktion von DcuS und führen zu einem ähnlichen Phänotyp wie G197R (STEINMETZ, 2010). Da L201R und L205R zueinander und zu G197 um vier Positionen verschoben sind, d.h. ebenfalls auf derselben Seite der Helix liegen, könnten für die schwache Aktivierung von DcuS durch Fumarat, ähnliche Gründe verantwortlich sein.

Substituierte Arginine im Übergangsbereich Membran/Cytoplasma verändern die Funktionalität von DcuS weniger drastisch als solche auf periplasmatischer Seite. Sie scheinen dort gut toleriert zu werden, 6 von 11 getesteten Mutationen waren still.

### 4.1.3 Verkürzungen von TM2 und assoziierter Abschnitte verändern die Aktivität von DcuS

Die Cystein zugänglichkeitsstudien und die Argininsubstitutionen legen eine longitudinale Translokation von TM2 in Richtung Periplasma nahe. Dieser Annahme zufolge würde bei der Aktivierung von DcuS durch einen Effektor PAS<sub>p</sub> den N-Terminus von TM2 ins Periplasma und dadurch den C-Terminus von TM2 in die Membran ziehen. Konsequenterweise sollten eine Verkürzung des PAS<sub>p</sub>-C-Terminus oder TM2-N-Terminus einen ähnlichen Zug auf den C-Terminus von TM2 ausüben und DcuS aktivieren.

Diese Annahme sollte durch Teildeletionen in DcuS überprüft werden, bei der eine oder mehrere Aminosäuren entfernt wurden, ohne den restlichen Sensor zu verändern. Abb. 53 zeigt die resultierenden Varianten mit ihrer jeweiligen *dcuB-lacZ*-Expression.



**Abb. 53:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und Varianten mit Teildeletionen in  $PAS_p-\alpha_6$  und TM2. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS::Kan<sup>R</sup>*) mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

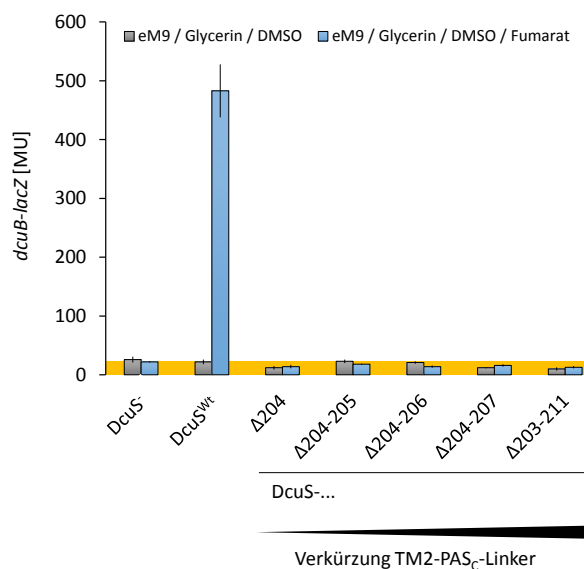
Von den Teildeletionen innerhalb von  $PAS_p-\alpha_6$  (Bereich von 175 bis 180) aktivierte die längste Deletion (175-180) DcuS effektorunabhängig maximal. Kleinere Verkürzungen zeigten eine reduzierte Fumarat-abhängige Stimulierung der Reportergenfusion, ohne die effektorunabhängige *dcuB-lacZ*-Expression zu beeinflussen. Je kleiner die Verkürzung, desto eher entsprach das Expressionsmuster dem Wildtyp.

Teildeletionen innerhalb von TM2 aktivierten DcuS immer effektorunabhängig und hatten stärkeren Einfluss auf die Stimulierbarkeit von *dcuB-lacZ* durch den Effektor. Diese sank mit zunehmender Verkürzung kontinuierlich und erreichte bei der Teildeletion von vier Aminosäuren (182-185) ein Niveau von 17 % des aktivierten Wildtyps.

In der Zusammenschau lassen die Deletionen innerhalb von TM2 die Interpretation zu, dass anstelle einer Aktivierung von DcuS durch das Herausziehen von TM2 aus der Membran, die Verkürzungen von  $PAS_p$  um bis zu vier Aminosäuren zur Inaktivierung des Sensors führen. Betrafen die Teildeletionen die zweite Transmembranhelix genügte bereits das Entfernen einer Aminosäure zur maximalen Aktivierung des Sensors. Eine Ausdehnung dieser Verkürzung führte zu einem Sensor mit reverssem Phänotyp, bei dem Fumarat einen inhibierenden Effekt hatte. Insgesamt scheint die strukturelle Störung durch Verkürzung der Helices  $PAS_p-\alpha_6$  und TM2 stark zu sein und erlaubt weder die

Einordnung in bisherige Ergebnisse noch das Ziehen von Schlussfolgerungen für die Signaltransduktion durch TM2.

Alternativ sollte eine Verkürzung des Linkers stattfinden, der TM2 und PAS<sub>c</sub> verbindet. Dazu wurde dieser N-terminal um 1 - 4 Aminosäuren verkürzt oder komplett entfernt. Wie Abb. 54 zeigt, hatten alle Verkürzungen und die Entfernung des Linkers die vollständige Inaktivierung von DcuS zur Folge. Strukturell scheint DcuS diese Veränderungen nicht zu tolerieren, eine funktionelle Ableitung ist daraus nicht möglich.



**Abb. 54:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und Varianten mit Teildeletionen im Linker zwischen TM2 und PAS<sub>c</sub>. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS*::Kan<sup>R</sup>) mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

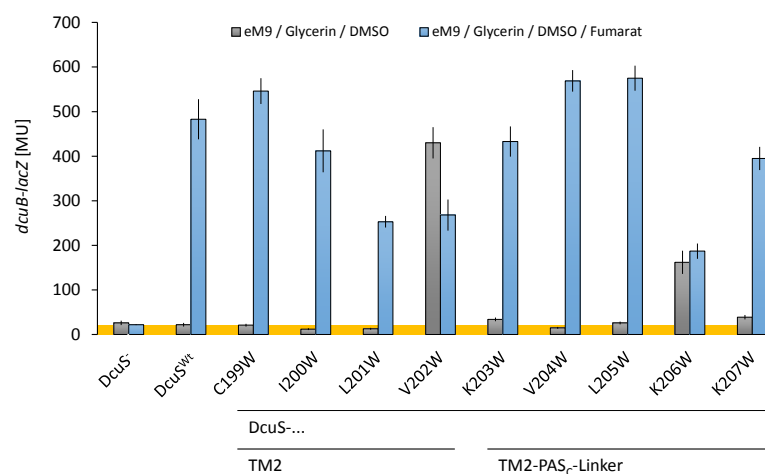
### 4.1.4 Die Rolle von Tryptophanresten in der Signaltransduktion durch TM2

Tryptophanreste sind statistisch doppelt so häufig in Membranproteinen wie in löslichen Proteinen anzutreffen (SCHIFFER et al., 1992). Man findet sie vermehrt in Transmembranhelices und dort speziell in den Übergangszonen zwischen lipophilem Kern und polaren Kopfgruppen, bevorzugt auf extra-cytoplasmatischer Seite (BAEZA-DELGADO et al., 2013). Diese Positionierung ist auf den amphiphilen Charakter des Tryptophans zurückzuführen. Der Indol-Ring richtet sich dort so aus, dass der polare Teil in Richtung

wässriger Phase und der hydrophobe Teil in Richtung lipophilem Membranzentrum zeigt (MACCALLUM et al., 2008; NORMAN und NYMEYER, 2006). Das gehäufte Auftreten und die bevorzugte Orientierung in der Membran führten zur Annahme, dass Tryptophanreste der richtigen Positionierung einer Helix in der Membran dienen (KILLIAN und VON HEIJNE, 2000; DE PLANQUE et al., 2003; SPARKS et al., 2014). Diese Funktion wurde bereits dazu genutzt Transmembranhelices zu verschieben und den Signalzustand des Aspartat-Chemorezeptors Tar aus *E. coli* zu verändern (DRAHEIM et al., 2006).

DcuS besitzt fünf Tryptophanreste, zwei davon im Bereich von TM2, beide an deren periplasmatischen Ende. Die Tryptophanreste W181 und W185 liegen auf einer gemeinsamen Seite der Helix. Die zugehörigen Positionen erwiesen sich in den Cysteinzugänglichkeitsstudien als die jeweils letzten zugänglichen, wenn man TM2 von  $PAS_p$  aus betrachtet: 181 im nicht-aktivierten Zustand, 185 in Anwesenheit von Fumarat (siehe 4.1.1.3). Der Austausch beider Reste gegen Arginin aktivierte DcuS effektorunabhängig und sorgte für eine Verschiebung von TM2 (siehe 4.1.1.6).

Ob eine Verschiebung von TM2 durch Tryptophanreste auf cytoplasmatischer Seite möglich ist, sollte durch die Substitution der Reste 199 - 207 gegen Tryptophhan getestet werden. Wie Abb. 55 zeigt, verhielten sich die meisten Tryptophhanvarianten im Induktionstest wildtypisch.



**Abb. 55:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und Varianten mit substituierten Tryptophanresten im cytoplasmannahen Bereich von TM2 und dem Linker zwischen TM2 und  $PAS_c$ . Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS::Kan<sup>R</sup>*) mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

Die Mutationen V202W und K206W verursachten dagegen den ON-Zustand von DcuS. Betrachtet man die Fumarat-stimulierte *dcuB-lacZ*-Expression, dann sank diese von 113 % des Wildtyps für C199W auf knapp 50 % für L201W und V202W um wieder auf 119 % für L205W anzusteigen. L201W und V202W bilden das vorhergesagte C-terminale Ende der Transmembranhelix 2. Denkbar wäre daher, dass die Tryptophane dort die Helix verankern und die Translokation von TM2 als Reaktion auf den Effektor erschweren. Alternativ könnte der sperrige Tryptophanrest die Dimerisierung von TM2 ähnlich stören wie ein Argininrest an den dortigen Positionen (siehe 4.1.2). Die effektorunabhängige *dcuB-lacZ*-Expression für die Varianten DcuS-V202W und -K206W können diese Annahmen nicht erklären.

### 4.1.5 Bewegung der Transmembranhelices im Dimer

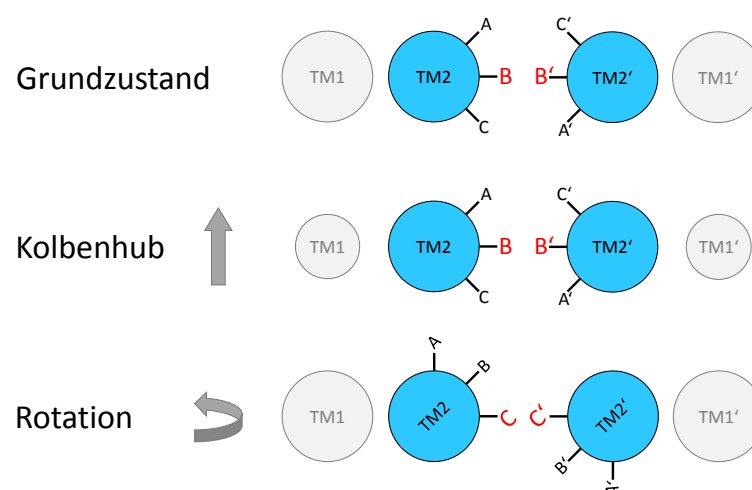
Die bisherigen Cystein zugänglichkeitsstudien und die Arginin- bzw. Tryptophanmutageneseexperimente, betrachteten immer nur den Zustand einer Transmembranhelix und ihrer angrenzenden Bereiche. DcuS liegt *in vivo* jedoch als Dimer oder höheres Oligomer vor, unabhängig vom Signalzustand (SCHEU et al., 2010b). Für die PAS<sub>c</sub>-Domäne und die zweite Transmembranhelix konnte eine Dimerisierung in isolierter Form gezeigt werden (MONZEL et al., 2013; STEINMETZ, 2014). Kinasedomänen von Sensor-Histidinkinasen liegen ebenfalls als Dimer vor (STOCK et al., 2000). Es sollte daher untersucht werden, wie sich die Translokation von TM2 im Dimer verhält. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein oxidatives Cystein-Crosslinking auf DcuS angewandt.

#### 4.1.5.1 Oxidatives Cystein-Crosslinking als Positionsmarker von Transmembranhelices

Beim oxidativen Cystein-Crosslinking bzw. Disulfid-Crosslinking werden zwei natürlich vorhandene oder genetisch eingebaute Cysteinreste zu einer Disulfidbrücke oxidiert (BASS et al., 2007). Diese Methode wird vielfach zur strukturellen Proteinanalyse eingesetzt, u.a. zur Bestimmung der Oligomerisierung (MILLIGAN und KOSHLAND, 1988), der strukturellen Dynamik und Flexibilität (FALKE und KOSHLAND, 1987), von Interaktionsflächen (PAKULA und SIMON, 1992), für die Fixierung von Signalzuständen (CHERVITZ und FALKE, 1995) oder zur Überprüfung der Homologie eines vorherge-

sagten Modells (LAI et al., 2006). Das oxidative Crosslinking wurde ebenfalls zur Detektion von Konformationsänderungen, die während der Signalweiterleitung durch die Transmembrandomäne auftreten, eingesetzt. Für den Galaktose/Ribose-Chemorezeptor Trg aus *Escherichia coli* wurde gezeigt, dass durch einen Effektor ausgelöste Bewegungen hauptsächlich innerhalb eines Monomers und weniger zwischen zwei Untereinheiten stattfinden und, dass die Bewegung der axialen Verschiebung einer Transmembranhelix relativ zur anderen entspricht. Durch Analyse der Crosslinking-Effizienz wurde die Stellung der Transmembranhelices zueinander getestet (LEE et al., 1995; HUGHSON und HAZELBAUER, 1996).

Cysteinreste können daher als Positions- und Lagemarker für die Stellung einer Transmembranhelix im Dimer verwendet werden. Abb. 56 vergleicht den Grundzustand des Sensors mit zwei möglichen Bewegungsalternativen der zweiten Transmembranhelix.



**Abb. 56:** Oxidatives Cystein-Crosslinking als Marker für Stellung und Lage von Transmembranhelices im Dimer. An der gegenüberliegenden Stellung der Reste B und B' im Dimer des Grundzustandes, ändert sich bei paralleler Verschiebung der Transmembranhelices TM2 und TM2' im Kolbenhubmodell nichts. Erfolgt hingegen eine Rotation der zweiten Transmembranhelices um ihre eigene Achse, dann entfernen sich die Reste B und B' während sich C und C' annähern. Eine veränderte Crosslinking-Effizienz zwischen B und B' bzw. C und C' lässt daher auf eine Rotation schließen.

Für TM2 sind drei Positionen angegeben und zur Unterscheidung der Monomere als A, B und C bzw. A', B' und C' bezeichnet. Im Grundzustand liegen sich B und B' am nächsten und könnten effektiv crosslinken, A und A' sowie C und C' sind hingegen jeweils weiter voneinander entfernt und crosslinken weniger stark. Beim Kolbenhub werden TM2 und TM2' jeweils relativ zu TM1 und TM1' verschoben, da dies aber

symmetrisch im Dimer geschieht bleibt die Stellung von TM2 und TM2' zueinander unverändert. Das bedeutet, dass auch im aktivierten Zustand B und B' stärker, A und A' sowie C und C' schwächer crosslinken. Das Crosslinking-Muster verändert sich nicht. Rotiert hingegen TM2 um die eigene Achse und um TM1, dann rotieren auch TM2 und TM2' umeinander und die Lage der Reste verändert sich. In Abb. 56 gelangen C und C' in räumliche Nähe, während sich B und B' entfernen, die Crosslinking-Effizienz B-B' würde verändert werden.

Ein ähnliches Crosslinking-Muster legt eine Kolbenhubbewegung nahe, ein modifiziertes Crosslinking-Muster gäbe Hinweise auf eine Rotation (oder eine andere nicht spiegel-symmetrische Bewegung).

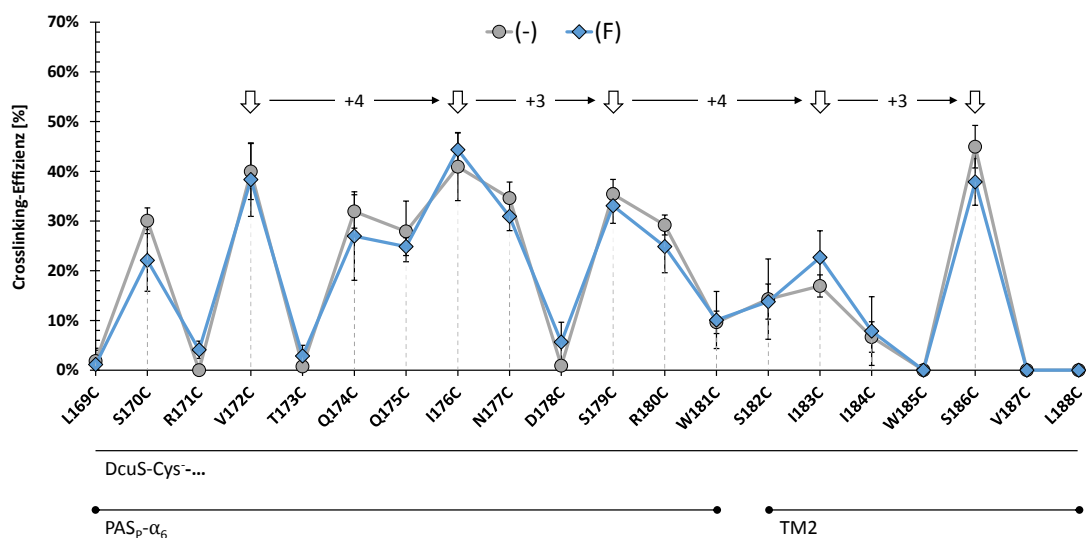
### 4.1.5.2 TM2 und periplasmatisch assoziierte Abschnitte bewegen sich parallel im Dimer

Für diese Untersuchungen wurden dieselben Einzylcysteinvarianten eingesetzt wie für die Cysteinzugänglichkeitsstudien. Es wurden ausschließlich solche mit Cysteinresten an Positionen in PAS<sub>p</sub> und dem periplasmanahen Teil von TM2 verwendet. Am Ende der Zucht (siehe 3.4) wurden die Cysteinreste in Gegenwart von Luftsauerstoff mit Hilfe des Katalysators Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)<sub>3</sub> oxidativ zu Disulfidbrücken gecrosslinkt (siehe 3.6.5). Die Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot. Die Bildung einer Disulfidbrücke wurde durch eine zusätzliche Bande im Western-Blot erkannt. Alle Western-Blot, die der Auswertung dienten, sind im Anhang gezeigt. Die Crosslinking-Effizienz wurde durch Bestimmung der Bandenintensitäten als Anteil von dimerem DcuS am gesamten DcuS ermittelt. Das Crosslinking wurde für alle 20 Einzylcysteinvarianten in dreifacher Bestimmung jeweils ohne Effektor und mit 50 mM Na<sub>2</sub>Fumarat durchgeführt um Mittelwert und Standardabweichung zu erhalten.

Abb. 57 gibt die Crosslinking-Effizienz in % beider Signalzustände an. Diese betrug für beide Zustände maximal 45 % und im Schnitt 18 %, für sieben Positionen wurde kein Crosslinking festgestellt. Im Mittel variierte die Crosslinking-Effizienz zwischen beiden Signalzuständen lediglich um 0,7 %. In Anwesenheit von Fumarat schwankte sie zwischen einer Abnahme um 8 % und einer Zunahme um 5,7 %, lag in 1/3 der Fälle bei unter einem Prozent. In keinem Fall war die Veränderung stärker als die Standardabweichung. Im Bereich der zweiten Transmembranhelix betrug die Crosslinking-Effizienz im Schnitt 11 %, wobei für Position 186 das stärkste Crosslinking mit 37 % ohne Fumarat

bzw. 45 % mit Fumarat gemessen wurde. Unmittelbar vor und hinter dieser Position, d.h. für 185, 187 und 188 wurde dagegen kein Crosslinking ermittelt.

Ein Periodizität der Crosslinking-Effizienz von drei bis vier Resten, wie sie für  $\alpha$ -Helices zu erwarten ist, wurde teilweise festgestellt. Die Positionen 172, 176, 179, 183 und 186 zeigten jeweils lokale Maxima (Pfeile in Abb. 57). Der Abstand dieser Positionen untereinander lässt sich mit 4-3-4-3 beschreiben, d.h. diese Positionen liegen alle auf einer gemeinsamen Seite der Helix.



**Abb. 57:** Oxidatives Cystein-Crosslinking für Cysteinreste in  $PAS_p-\alpha_6$  und TM2. Die entsprechenden Einzelcysteinvarianten wurden in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (F) von 50 mM  $Na_2Fumarat$  zunächst gezüchtet und anschließend unmittelbar mit  $Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin)_3$  oxidativ gecrosslinkt (siehe 3.6.5). Der Anteil an Crosslinking-Produkt am gesamten DcuS wurde in drei unabhängigen Ansätzen nach SDS-PAGE im Western-Blot mit der Software GelPro Analyzer<sup>TM</sup> durch Analyse der jeweiligen Bandenintensitäten bestimmt (zugehörige Western-Blots finden sich im Anhang). Die Pfeile geben lokale Maxima an, deren Abstand die Periodizität einer  $\alpha$ -Helix widerspiegelt (siehe Text).

Da sich die in Abb. 57 gezeigten Crosslinking-Muster beider Signalzustände nicht oder nur unwesentlich ändern, ist davon auszugehen, dass die Bindung eines Effektors eine spiegelsymmetrische Bewegung der beiden zweiten Transmembranhelices im Dimer auslöst. Die Spiegelsymmetrie spricht für einen Kolbenhub und gegen eine Rotations- oder Kippbewegung von TM2 und TM2' zueinander. Denkbar wäre solch eine Bewegung allenfalls mit einer sehr schwachen Ausprägung, die die Stellung der zweiten Transmembranhelices nicht wesentlich verändert. Die zeitaufgelöste Bestimmung der Crosslinking-Effizienz könnte die Bewegung feiner auflösen (LEE und HAZELBAUER, 1995).

### 4.2 Signaltransduktion durch die cytoplasmatische PAS-Domäne

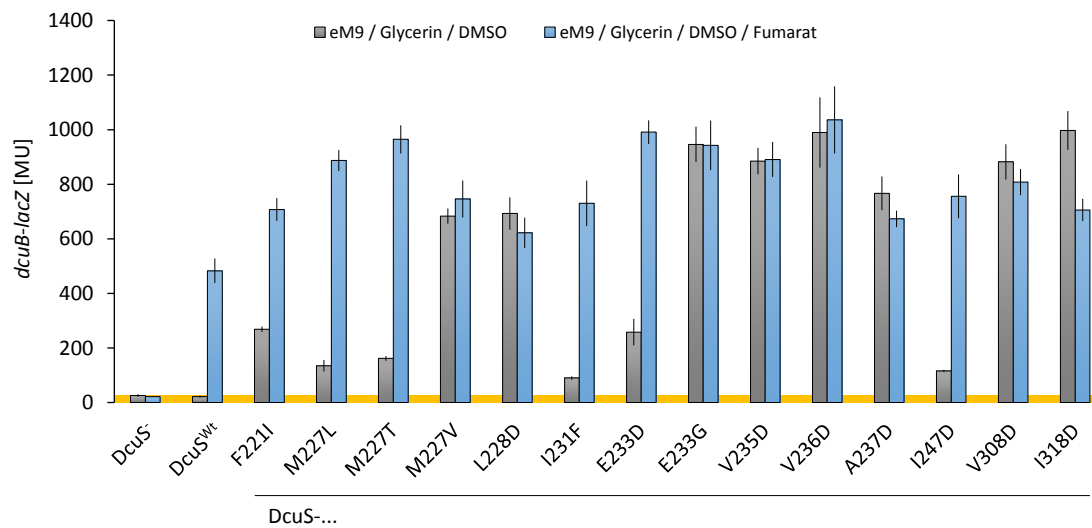
#### 4.2.1 Konzentration von ON-Mutationen in PAS<sub>c</sub>

Die cytoplasmatische PAS-Domäne (PAS<sub>c</sub>) verbindet die zweite Transmembranhelix mit der Kinasedomäne von DcuS. TM2 und PAS<sub>c</sub> sind über einen kurzen Linker (Positionen 203 - 211) voneinander getrennt. Als typische cytoplasmatische PAS-Domäne zeigt PAS<sub>c</sub> die charakteristische Faltung, bestehend aus einem zentralen fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblattgerüst, das von N-terminalen und zentralen  $\alpha$ -Helices flankiert bzw. unterbrochen ist (KNEUPER et al., 2010). In PAS<sub>c</sub> werden die Signale aus dem Periplasma, d.h. von PAS<sub>p</sub>, und dem Co-Regulator DctA kombiniert und verarbeitet und an die Kinasedomäne weitergeleitet um die Autophosphorylierung zu stimulieren. (ETZKORN et al., 2008; WITAN et al., 2012b).

Die Ergebnisse zur Untersuchung von PAS<sub>c</sub> sind in MONZEL et al. (2013) veröffentlicht und werden hier nur kurz beschrieben.

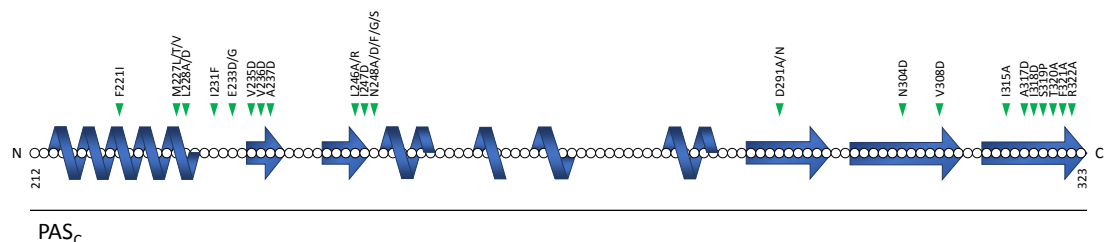
PAS<sub>c</sub> ist Gegenstand intensiver Forschung und wurde in der Vergangenheit insbesondere auf funktionelle Mutationen hin untersucht, die die Aktivität des Sensors verändern. Von DEGREIF-DÜNNWALD (2011) wurden bereits 17 ON-Mutationen in PAS<sub>c</sub> identifiziert, die z.T. in ETZKORN et al. (2008) beschrieben sind. ON-Mutationen aktivieren den Sensor effektorunabhängig, d.h. es kommt zur Expression der Reporterfusion *dcuB-lacZ* in Abwesenheit eines Effektors und dieser steigert die Expression nicht weiter oder nur noch schwach.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Suche nach ON-Mutationen in der cytoplasmatischen PAS-Domäne ausgedehnt und fand sowohl gerichtet als auch ungerichtet statt (siehe 3.5.6). Für die ungerichtete Mutagenese wurde die Methode der fehleranfälligen PCR ausgewählt und auf die gesamte PAS<sub>c</sub>-Domäne angewendet. Die gerichtete Mutagenese führte gezielte Austausche durch und orientierte sich am bisherigen Wissen aus den Arbeiten von DEGREIF-DÜNNWALD (2011) und ETZKORN et al. (2008) sowie aus Zusammenhängen zwischen Funktion und Struktur. Dadurch wurden recht effizient 14 weitere ON-Mutationen an 11 verschiedenen Positionen in PAS<sub>c</sub> gefunden. Abb. 58 zeigt den Phänotyp der neuen ON-Mutationen.



**Abb. 58:** Induktion der *dcuB*-Expression durch DcuS und neue PAS<sub>c</sub>-ON-Varianten. Zur Messung der *dcuB-lacZ* Expression wurde *E. coli* IMW260 (*dcuS::Kan<sup>R</sup>*) mit plasmidkodiertem *dcuS* (pMW181, DcuS<sup>Wt</sup>) bzw. dessen Varianten (siehe Tab. 4) komplementiert. Die anaerobe Zucht erfolgte wie in 3.4 beschrieben in eM9-Medium mit Glycerin und DMSO, ohne (grau) oder mit (blau) 20 mM Na<sub>2</sub>Fumarat. Der gelbe Bereich gibt die Hintergrundexpression des Insertionsstammes IMW260 wieder.

Die effektorunabhängige *dcuB-lacZ*-Expression wurde gegenüber dem nicht-aktivierten Wildtyp um Faktoren zwischen 4,1 und 45,3 gesteigert und erlangte dadurch eine Expressionsstärke von 19 - 206 % des stimulierten Wildtyps. Die Expression der Reporterfusion in Anwesenheit von Fumarat wurde durch die ON-Varianten um das 1,3 - 2,1-fache gesteigert. Abb. 59 gibt die Lage der neuen ON-Mutationen an und kombiniert sie mit dem bisherigen Kenntnisstand.

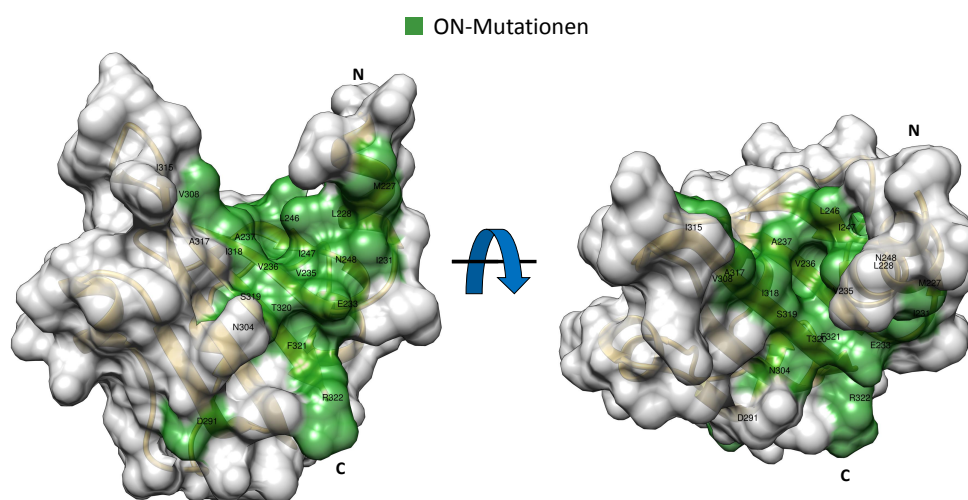


**Abb. 59:** Übersicht über ON-Mutationen in PAS<sub>c</sub> von DcuS. Die Abbildung stellt schematisch die Sekundärstruktur der PAS<sub>c</sub>-Domäne von DcuS dar. Grüne Pfeile geben die Lage von ON-Mutationen wieder.

Aus Abb. 59 ist zu erkennen, dass sich die ON-Mutationen gleichmäßig auf den N- und C-Terminus aufteilen und dort konzentrieren. Diese Regionen umfassen den PAS-Kern

und das  $\beta$ -Faltblattgerüst. Die Struktur von PAS<sub>c</sub> wurde durch ETZKORN et al. (2008) mittels Festphasen-NMR mit niedriger Auflösung bestimmt. Daher sollte ein Strukturmodell von PAS<sub>c</sub> erstellt werden. Die Modellierung wurde durch den SWISS-MODEL Server umgesetzt (BIASINI et al., 2014). Als Strukturtemplate diente PAS1 von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (KEY et al., 2007). NifL ist dort an der sauerstoff-abhängigen Expressionsregulierung von Genen der Stickstofffixierung beteiligt (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004). Zwar sind Sequenzidentität und -ähnlichkeit zwischen PAS<sub>c</sub> von DcuS und PAS1 von NifL mit 11- bzw 16 % nicht sonderlich hoch, PAS-Domänen weisen aber generell bei hoher struktureller Analogie nur geringe Homologien auf Sequenzebene auf (MÖGLICH et al., 2009).

Es wurde ein Modell mit hoher Qualität (siehe Anhang) erzeugt, das in Abb. 60, in Frontalansicht links und mit Blick von der Membran auf PAS<sub>c</sub> rechts, gezeigt ist. Die zu den ON-Mutationen gehörigen Positionen wurden im Modell grün eingezeichnet. Deutlich sichtbar ist die Konzentration aller Positionen auf eine kleine Fläche. Diese Fläche erstreckt sich vom Boden und den Rändern einer V-förmigen Tasche, die durch die N-terminale Helix  $\alpha_1$  und einen Ausläufer des  $\beta$ -Faltblattgerüsts gebildet wird, auf dem kürzesten Weg bis zum C-Terminus von PAS<sub>c</sub>. Einzige Ausnahme bildet die Position 291 (ON-Mutation: D291N), die distal-lateral und ohne Verbindung zu dieser Fläche liegt.



**Abb. 60:** Lage der PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen im Oberflächenstrukturmodell. Die Modellierung der PAS<sub>c</sub> Struktur erfolgte durch den SWISS-MODEL Server mit PAS1 von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (2GJ3) als Vorlage (BIASINI et al., 2014). Grün: ON-Mutationen in PAS<sub>c</sub>.

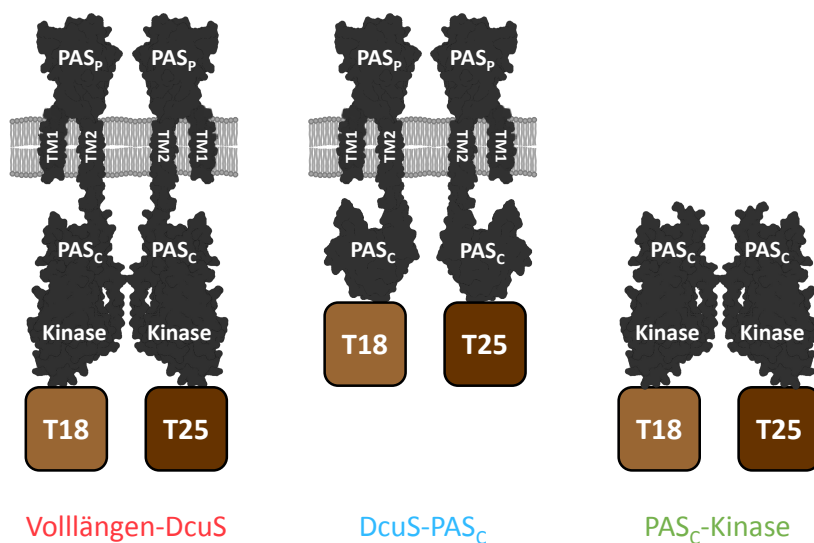
#### 4.2.2 Klassifizierung von PAS<sub>c</sub>-ON-Varianten anhand ihrer DcuS-Homodimerisierung

Durch FRET-Analyse, chemisches Crosslinking und BACTH (siehe unten) wurde nachgewiesen, dass die Sensor-Histidinkinase DcuS unabhängig vom Signalzustand als Homodimer oder höheres Homo-Oligomer in der Cytoplasmamembran besteht (SCHEU et al., 2010b, 2012). Die Existenz einer Interaktionsstelle konnte für die zweite Transmembranhelix mit dem GALLEX-System bestätigt werden (STEINMETZ, 2014). Ein direkter Nachweis der Dimerisierung der cytoplasmatischen PAS-Domäne fehlt. Eine verkürzte Version von DcuS, der die Kinasedomäne fehlt (DcuS-PAS<sub>c</sub>), und ein Konstrukt aus den beiden cytoplasmatischen Domänen (PAS<sub>c</sub>-Kinase) homodimerisierte (MONZEL et al., 2013). PAS Domänen werden häufig als Dimer gefunden und fördern die Dimerisierung des gesamten Proteins (MÖGLICH et al., 2009). Es wird daher angenommen, dass auch PAS<sub>c</sub> von DcuS homodimerisiert und eine entscheidende Funktion in der Dimerisierung des Sensors spielt. Von ETZKORN et al. (2008) wurde darüber hinaus vermutet, dass ON-Mutationen in PAS<sub>c</sub> ihren Aktivitätszustand auf DcuS durch Reduktion der lokalen Dimerstabilität vermitteln.

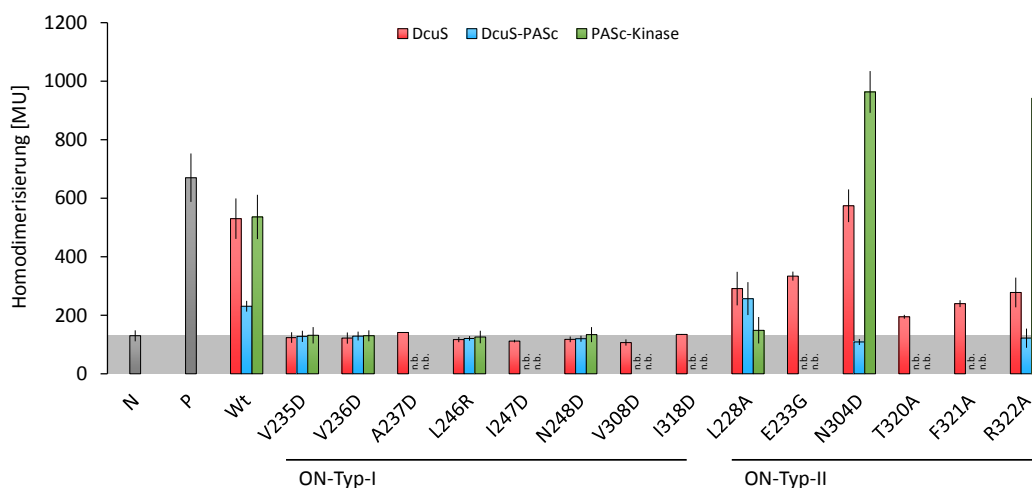
Für einige der in Abb. 59 gezeigten ON-Mutationen wurde die Homodimerisierung getestet, um diese Hypothese zu überprüfen. Für die Untersuchungen wurde das Bacterial Two-Hybrid (BACTH) System gewählt. Bei diesem werden die zu untersuchenden Proteine an die Fragmente T18 und T25 genetisch fusioniert. T18 und T25 bilden, wenn sie durch die Testproteine in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, eine funktionelle Adenylatcyclase. Durch Bildung von cAMP wird die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase stimuliert. Die Interaktion der Testproteine kann durch Analyse dieses Reporters erkannt und quantifiziert werden (siehe 3.6.1 für Details).

Die zu untersuchenden ON-Mutationen wurden in verschiedenen Konstrukten hinsichtlich ihrer Homodimerisierung überprüft. Die verwendeten Konstrukte sind in Abb. 61 dargestellt. Dabei handelte es sich zum einen um das membranständige DcuS (Volllängen-DcuS) als auch um das verkürzte Konstrukt, dem die Kinasedomäne fehlt (DcuS-PAS<sub>c</sub>) sowie das lösliche Konstrukt aus den cytoplasmatischen Domänen (PAS<sub>c</sub>-Kinase).

Abb. 62 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.



**Abb. 61:** Konstrukte von DcuS zur Messung der Homodimerisierung im BACTH-System. Volllängen-DcuS (pMW426; pMW429) und DcuS-PAS<sub>c</sub> (pMW950; pMW951) sind in die Membran integriert, PAS<sub>c</sub>-Kinase (pMW1075; pMW1076) liegt löslich im Cytoplasma vor. T18 und T25 sind die funktionalen Domänen der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis*, deren Funktion bei Interaktion der Fusionsproteine wiederhergestellt wird (Details siehe 3.6.1).



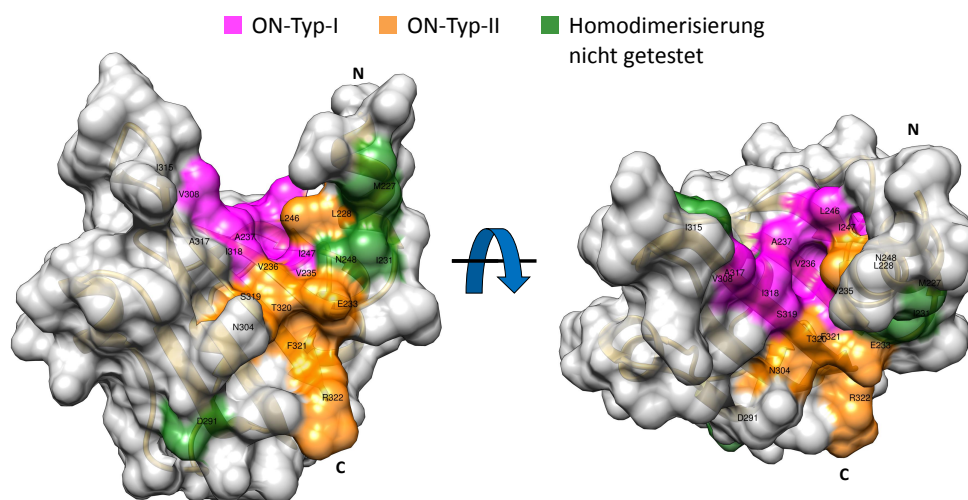
**Abb. 62:** Homodimerisierung von PAS<sub>c</sub>-ON-Varianten. Die Messung erfolgte mit dem BACTH-System (siehe 3.6.1). *E. coli* BTH101 wurde dazu mit Plasmidpaaren cotransformiert (siehe Tab 5). Diese codierten die T18- bzw. T25-Fusionen von Volllängen-DcuS (DcuS, N-terminal), eine um die Kinasedomäne verkürzte Variante (DcuS-PAS<sub>c</sub>, C-terminal) sowie ein aus den cytoplasmatischen Domänen bestehendes Konstrukt (PAS<sub>c</sub>-Kinase, C-terminal). P: Positivkontrolle T18-Zip/T25-Zip. N: Negativkontrolle T18-Zip/T25-DcuS. Der graue Bereich gibt die durch die Negativkontrolle definierte Hintergrundaktivität an, dessen Überschreitung als Interaktion zwischen den T18- und T25-Fusionsproteinen gewertet wurde. n.b.: nicht bestimmt

Als Positivkontrolle einer Interaktion im BACTH diene die Kombination T18-Zip und T25-Zip. Dabei handelt es sich um zwei Fragmente eines Leucinzippers, die eine starke Interaktion aufweisen. Für die Negativkontrolle wurde T18-Zip mit dem membranständigen DcuS (T25-DcuS) kombiniert, sie legte den Schwellenwert fest, dessen Überschreitung als Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen gewertet wurde.

Der Wildtyp dimerisierte in allen drei Konstrukten, in DcuS-PAS<sub>c</sub> schwächer als in DcuS und PAS<sub>c</sub>-Kinase. Die ON-Mutationen wurden entsprechend ihres Einflusses auf die Interaktion in zwei Klassen unterteilt. Für ON-Typ-I wurde keine Homodimerisierung für keines der drei Konstrukte festgestellt. Dabei wurde durch Western-Blot überprüft, dass die zugehörigen Proteine in vergleichbaren Mengen gebildet wurden (MONZEL et al., 2013). In diese Klasse fallen die ON-Mutationen V235D, V236D, A237D, L246R, I247D, N248D, V308D und I318D. Die zweite Klasse, ON-Typ-II, homodimerisierte, wenn auch z.T. deutlich schwächer als der Wildtyp oder nicht in allen drei Konstrukten. Zu ihr gehören L228A, E233G, N304D, T320A, F321A und R322A.

ON-Typ-I-Mutationen stören die Homodimerisierung, haben folglich einen starken strukturellen Effekt. Sie entsprechen der Annahme von ETZKORN et al. (2008), dass die effektorunabhängige Aktivierung von DcuS durch PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen in der reduzierten Dimerisierung begründet ist. Der Verlust der Homodimerisierung, wie er im BACTH-Test beobachtet wurde, steht im Widerspruch zu der Beobachtung von SCHEU et al. (2010b), dass DcuS im aktiven und inaktiven Zustand ein Dimer ist. Außerdem funktioniert die Kinase, die im allgemeinen *in trans* autophosphoryliert, als Dimer (GAO und STOCK, 2009). ON-Typ-II-Mutationen homodimerisieren ähnlich wie der Wildtyp, die Aktivierung des Sensors ist daher nicht zwangsläufig an den Verlust oder die Verminderung der Dimerisierung gekoppelt. Beide Klassen haben einen unterschiedlichen strukturellen Effekt im BACTH-Test auf DcuS, trotzdem ist die fehlende Homodimerisierung von Typ-I eher auf sterische Aspekte der Fusionsproteine, die im BACTH-System eine Rolle spielen können (siehe 3.6.1), zurückzuführen.

Markiert man die Aminosäurereste der Typ-I- und Typ-II-ON-Mutationen farblich im Strukturmodell, spiegelt sich die Klassifizierung in einer räumlichen Gruppierung wider (Abb. 63). ON-Typ-I, d.h. solche ON-Mutationen mit Dimerisierungsverlust, konzentrieren sich am Boden und den Seiten der V-förmigen Tasche (magenta). ON-Typ-II sind bevorzugt an der Verlängerung dieser Tasche zum C-Terminus von PAS<sub>c</sub> lokalisiert (orange). Die gesamte Region ist wichtig für den Funktionszustand des Sensors und die Tasche spielt wahrscheinlich eine besondere Rolle in der Dimerisierung von PAS<sub>c</sub>.



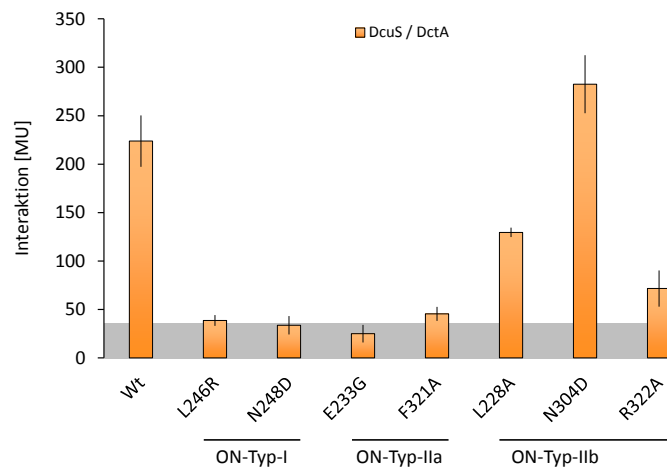
**Abb. 63:** Klassifizierung und Lage der PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen im Oberflächenstrukturmodell. Die Klassifizierung erfolgte auf Grundlage der Homodimerisierung in Vollängen-DcuS (siehe Abb. 62). Die Modellierung der PAS<sub>c</sub> Struktur erfolgte durch den SWISS-MODEL Server mit PAS1 von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (2GJ3) als Vorlage (BIASINI et al., 2014). Grün: ON-Mutationen in PAS<sub>c</sub>. Magenta: ON-Typ-I. Orange: ON-Typ-II.

#### 4.2.3 Subgruppierung von PAS<sub>c</sub>-ON-Varianten entsprechend ihrer Interaktion zwischen Sensor DcuS und Co-Regulator DctA

Die Sensor-Histidinkinase DcuS homodimerisiert nicht nur, sondern ist auch Bestandteil eines Sensorkomplexes. Dieser besteht neben dem C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Sensor DcuS auch aus einem der beiden C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA oder DcuB (KLEEFELD et al., 2009; WITAN et al., 2012a; STEINMETZ et al., 2014). Die Transporter sind im Gegensatz zu früheren Annahmen keine Co-Sensoren, d.h. sie sind nicht an der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Detektion beteiligt, sondern arbeiten als Co-Regulatoren und dienen dazu, den Sensor in seinen sensorischen Funktionszustand zu versetzen (STEINMETZ et al., 2014). Eine direkte Protein-Protein-Interaktion wurde für die Vollängen-Proteine DctA und DcuS beschrieben und wurde auch für die regulatorisch wichtige C-terminale Helix des Transporters mit der cytoplasmatischen PAS-Domäne des Sensors nachgewiesen (WITAN et al., 2012a; MONZEL et al., 2013). PAS<sub>c</sub> integriert die Signaleingänge von PAS<sub>p</sub> und DctA und leitet sie an die Kinasedomäne weiter (WITAN et al., 2012b).

Ob ON-Mutationen auch die Interaktion zwischen DctA und DcuS beeinflussen, sollte ebenfalls mit dem BACTH-System getestet werden. Dazu wurden exemplarisch zwei ON-Typ-I-Mutationen und fünf ON-Typ-II-Mutationen in T18-DcuS überprüft. Aus Abb. 64 wird ersichtlich, dass die beiden ON-Typ-I-Mutationen (L246R, N248D) die

deutliche Interaktion des Wildtyps auf das Hintergrundniveau senkten. Unter den ON-Mutationen vom Typ-II war das Bild uneinheitlich. E233G und F321A hatten den Interaktionsverlust zur Folge; L228A, N304D und R322A beeinflussten die Interaktion zwischen DctA und DcuS, hoben sie jedoch nicht auf.



**Abb. 64:** Interaktion der PAS<sub>c</sub>-ON-Varianten in Vollängen-DcuS mit dem Co-Regulator DctA. Die Messung erfolgte mit dem BACTH-System (siehe 3.6.1). *E. coli* BTH101 wurde dazu mit Plasmidpaaren cotransformiert (siehe Tab 5). Diese codierten für die genannten Varianten von T18-DcuS bzw. T25-DctA. Der graue Bereich gibt die durch die Negativkontrolle (nicht gezeigt) definierte Hintergrundaktivität an, dessen Überschreitung als Interaktion zwischen den T18- und T25-Fusionsproteinen gewertet wurde.

ON-Mutationen vom Typ-I verändern oder reduzieren somit im BACTH-Test sowohl die Homodimerisierung des Sensors als auch dessen Interaktion mit dem Transporter. ON-Typ-II-Mutationen können subgruppiert werden. DcuS-Varianten des Typ-IIa homodimerisieren, interagieren aber nicht mehr mit DctA. Solche Varianten vom Typ-IIb hingegen lassen die Homodimerisierung ebenso wie die DcuS/DctA-Interaktion unberührt. Letztere entsprechen dadurch am ehesten der wildtypischen Situation, bei der ein Effektor weder die Dimerisierung des Sensors noch seine Interaktion zum Co-Regulator aufheben (SCHEU et al., 2010b; WITAN et al., 2012a; MONZEL et al., 2013).

## 5 Diskussion

In *Escherichia coli* dient das Zweikomponentensystem DcuSR zur Regulation des aeroben und anaeroben C<sub>4</sub>-Dicarboxylatstoffwechsels. DcuSR arbeitet gemeinsam mit den C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransportern DctA bzw. DcuB, die als Co-Regulatoren einen Sensor-komplex mit der Sensor-Histidinkinase DcuS bilden und diese in den rezeptiven Zustand versetzen. In DcuS dient die Effektorbindung als Anstoß einer Signalkaskade, die über den Responseregulator DcuR verläuft und die Expression regulierter Gene steuert (ZIENTZ et al., 1998; STEINMETZ et al., 2014).

Die Effektorbindung in PAS<sub>p</sub> von DcuS stellt das Initiationsereignis einer intramolekularen Signaltransduktion dar, die mit der Autophosphorylierung der Kinasedomäne abschließt (JANAUSCH et al., 2002b). Input und Output, d.h. Sensor- und Effektordomäne (oder PAS<sub>p</sub> und Kinasedomäne), sind durch die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische PAS-Domäne topologisch voneinander getrennt. Eine Funktion dieser Domänen als Signalüberträger ist deshalb sehr wahrscheinlich. Die strukturellen Veränderungen die der Signaltransduktion zu Grunde liegen waren jedoch unbekannt und wurden in dieser Arbeit analysiert.

### 5.1 Signaltransduktion durch die Transmembrandomäne

Die Transmembrandomäne von DcuS besteht aus den beiden Transmembranhelices 1 und 2 (TM1 und TM2), die laut Vorhersage (UniProt #P0AEC8) die Aminosäurereste 21 - 42 bzw. 182 - 202 umfassen. Beide TM-Helices wurden *in vivo* charakterisiert, da zum einen die Kristallisation für membranständige Sensorkinasen bisher nicht möglich war und zum anderen kein geeignetes *in vitro* System zur Untersuchung von DcuS zur Verfügung stand. Darüberhinaus sind *in vivo* Studien vorteilhaft, da sie das zu analysierende Protein nicht aus seinem natürlichen Kontext herauslösen und in künstliche Umgebungen einbringen, die sich verändernd auf die Eigenschaften des Proteins auswirken könnten. Dies gilt insbesondere für Membranproteine im Allgemeinen, da hier Lipid-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen (SMITH, 2012), und für DcuS im Speziellen, da die Ausbildung des Sensorkomplexes mit den Transportern kritisch für dessen Funktionalität ist (WITAN et al., 2012a; STEINMETZ et al., 2014).

Für die *in vivo* Charakterisierung wurde die Methode der Cysteinzugänglichkeit (SCAM)

gewählt (BOGDANOV et al., 2005). Sie bietet drei entscheidende Vorteile. Erstens ist sie leicht zu implementieren, da die Substitution gegen Cysteine durch gerichtete Mutagenese erfolgt. Zweitens greift sie mit kleinstmöglichem Maß ins Protein ein, da Cysteine natürlich vorkommen und unabhängig von der Umgebung gut toleriert werden, aber sich trotzdem chemisch von allen anderen proteinogenen Aminosäuren unterscheiden (POPOT und SARASTE, 1995; MACCALLUM et al., 2008). Und drittens bietet sie eine verhältnismäßig hohe Auflösung, da einzelne Reste analysiert werden können.

Die Vorversuche zeigten, dass DcuS prinzipiell durch SCAM untersucht werden kann. Weder die cysteinfreie Variante DcuS-Cys<sup>-</sup> noch eine der 60 darauf basierenden Einzylcysteinvarianten veränderte die Funktionalität von DcuS gegenüber dem Wildtyp, d.h. die Fumarat-abhängige Stimulierung der Reporterexpression *dcuB-lacZ* (SCHEU et al. (2012); Abb. 8 und Tab. 12). Diese Cysteinreste wurden in DcuS spezifisch durch NEM und PEG-Mal markiert und ließen sich hinsichtlich ihrer Wassereexposition als zugänglich oder unzugänglich differenzieren. SCAM erlaubte daher eine Klassifizierung der Positionen im Hinblick auf ihre Lage innerhalb oder außerhalb der Membran bzw. des Proteininneren.

### 5.1.1 TM2 ist der Signalträger in der Transmembrandomäne

Die Zugänglichkeiten von der Wasser- oder Membranphase von 22 Positionen rund um N- und C-Terminus von TM1 korrelierten sehr gut mit der Vorhersage (Abb. 12; UniProt #P0AEC8). Anhand der SCAM Daten lässt sich die Lage von TM1 auf die Positionen 20 - 40 festlegen, was der vorhergesagten Ausdehnung von 21 - 41 in der Länge voll entspricht und lediglich einer Abweichung um einen Rest gleichkommt. In Anwesenheit von Fumarat wurden die Grenzen von TM1 nicht verschoben und es wurden lediglich zwei Cysteinreste (L17C und I39C) zugänglich. Beide Cysteinreste liegen an unterschiedlichen Enden der Helix, weshalb keine gerichtete Verschiebung in die eine oder die andere Richtung ursächlich für den Zugänglichkeitsgewinn auf beiden Seiten sein kann.

Auch für die zweite Transmembranhelix korrelierten SCAM-Daten und Vorhersage sehr gut (Abb. 14; UniProt #P0AEC8). Dem Zugänglichkeitsmuster der 38 untersuchten Cysteinreste zufolge, erstreckt sich TM2 von 182 - 201, d.h. während der N-Terminus der Vorhersage entspricht, endet TM2 laut SCAM eine Position eher. Im Gegensatz zu TM1 hatte Fumarat nicht nur einen deutlichen sondern auch einen gerichteten Effekt auf die Cysteinzugänglichkeit, die sich an sieben Positionen veränderte. Um die

Membrangrenzen herum wurden auf periplasmatischer Seite Cysteinreste zugänglich, auf cytoplasmatischer Seite hingegen unzugänglich.

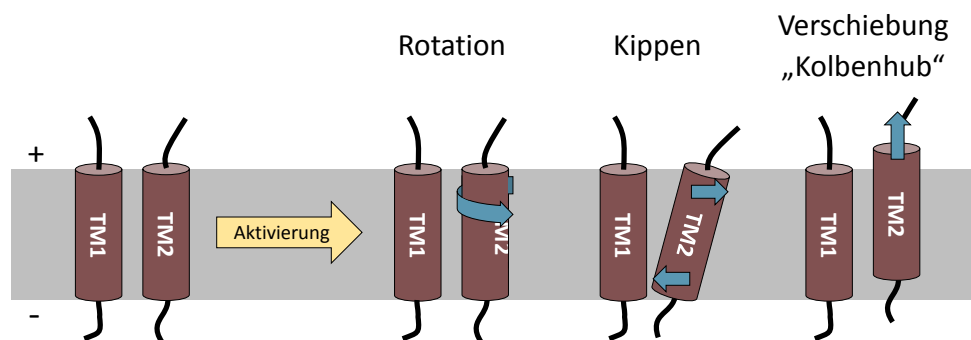
Während TM1 unter Einfluss des Effektors nur geringe Änderungen ohne klare Richtung zeigte, waren die Änderungen für TM2 ausgeprägt und gerichtet. Die Konformations- oder Positionsänderung von TM2 muss demnach maßgeblich mit der Signaltransduktion durch DcuS verknüpft sein, während TM1 von geringerer Bedeutung ist. Dieses Verhältnis passt zur Lage der beiden Transmembranhelices in DcuS, da TM1 N-terminal vor der Effektorbindestelle liegt und keine Domänen verbindet, während TM2 sich unmittelbar an  $PAS_p$  anschließt und diese über  $PAS_c$  an die Kinasedomäne anbindet, d.h. Input und Output des Sensors verknüpft (KNEUPER et al., 2005). Einen in dieser Hinsicht ähnlichen Aufbau besitzen auch der Aspartat-Chemorezeptor Tar und die Sensor-Histidinkinasen NarX und TorS. Bei diesen sind die Transmembranhelices 1 und 2 an die N- bzw. C-terminale  $\alpha$ -Helix der Sensordomäne geknüpft. Für alle drei Sensoren zeigten Strukturuntersuchungen der Sensordomänen, dass die C-terminale  $\alpha$ -Helix verschoben wird, während sich die Lage der N-terminalen  $\alpha$ -Helix nicht ändert (FALKE und ERBSE, 2009). In der Folge bewegt sich in diesen Sensoren TM2 als Reaktion auf den Reiz, wie für Tar mittels Cystein-Crosslinking direkt gezeigt werden konnte (LEE et al., 1995).

DcuS kann auf drei unabhängigen Wegen aktiviert werden, neben der Effektorbindung auch durch Deletion des Co-Regulators DctA und das Einbringen von ON-Mutationen z.B. in  $PAS_c$  (WITAN et al., 2012a; MONZEL et al., 2013). Verglichen mit dem Fumarat-stimulierten Wildtyp, führten die Abwesenheit von DctA und das Vorhandensein von  $PAS_c$ -ON-Mutationen zu identischen (Transporter) bzw. sehr ähnlichen (ON-Mutationen) Zugänglichkeitsmustern (Abb. 18, 43, 45 und 47). Unabhängig davon, ob DcuS N-terminal (in  $PAS_p$  durch Effektorbindung) oder C-terminal (in  $PAS_c$  durch  $\Delta$ DctA oder ON-Mutationen) zu TM2 aktiviert wird, wird in allen Fällen eine ähnliche Relokalisierung/Verschiebung von TM2 durchgeführt. Das bedeutet, dass die für die Stimulierung mit Fumarat verzeichnete Veränderung der Cysteinzugänglichkeit von TM2, eindeutig mit dem aktiven Signalzustand der Sensorkinase DcuS verknüpft ist.

Von STEINMETZ et al. (2014) wurde bereits auf Basis der Reporterexpression postuliert, dass DcuS die intrinsische Eigenschaft besitzt solange den ON-Zustand einzunehmen, wie kein DctA zur Bildung des Sensorkomplexes zur Verfügung steht. Diese Aussage konnte durch die vorliegenden Experimente auf strukturnaher Ebene bestätigt werden.

### 5.1.2 Eine Kolbenhubbewegung von TM2 in Richtung Periplasma trägt das Signal über die Membran

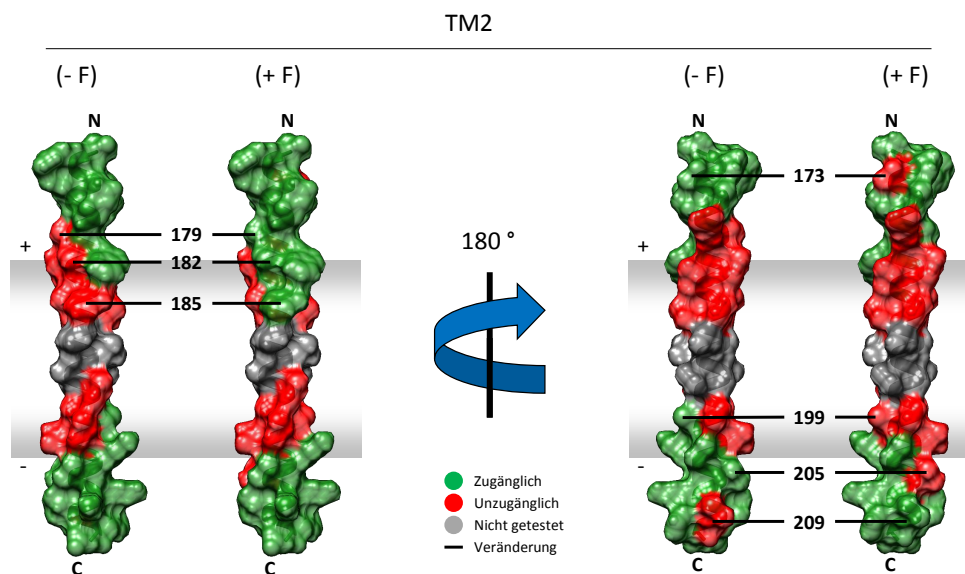
Es sind verschiedene Konformationsänderungen denkbar, die die Grundlage der Signaltransduktion durch TM2 bilden könnten. Ein Assoziations-/Dissoziationsmechanismus, d.h. eine Verschiebung der Membranhelices parallel zur Membranoberfläche ist unwahrscheinlich, da TM2 durch ein sogenanntes SmallxxxSmall-Motiv eine Dimerisierungsfläche bereitstellt und der Verlust der Dimerisierung an dieser Stelle zur Schwächung der DcuS-Aktivität führt (STEINMETZ, 2014). Alternativ besteht die Möglichkeit einer Rotation, um die eigene Achse oder senkrecht zur Membranoberfläche (= Kippen), oder einer Verschiebung parallel zur eigenen Längsachse (= Kolbenhub). Abb. 65 illustriert diese drei Möglichkeiten grafisch.



**Abb. 65:** Bewegungsmodelle von TM2 in der Signaltransduktion. Grundlegende Formen einer Bewegung von TM2 als Grundlage der Signaltransduktion über die Membran. Aktivierung: Effektor,  $\Delta$ DctA, ON-Mutationen. Rotation: Rotation von TM2 um die eigene Längsachse. Kippen: Rotation von TM2 senkrecht zur Membranoberfläche. Verschiebung: Axiale Bewegung von TM2 senkrecht zur Membranoberfläche. Ähnliche Modelle zur Signaltransduktion über die Membran wurden bereits für Rezeptoren der Chemotaxis vorgeschlagen (OTTEMANN et al., 1999).

Die drei Modelle hätten unterschiedliche Auswirkungen auf die Zugänglichkeitsveränderungen. Die Rotation sollte keine Reste aus der Membran in die wässrige Phase oder umgekehrt verlagern, oder nur in minimalem Umfang. Die Kippbewegung würde Veränderungen auf beiden Seiten der Membran auslösen, wobei sich auf jeder Membranseite Zu- und Abnahme der Zugänglichkeit ausgleichen sollten, da mit dem Eindringen der einen Helixoberfläche, das Austreten der gegenüberliegenden Helixoberfläche verbunden ist. Der Kolbenhub bewirkt ebenfalls Veränderungen auf beiden Membranseiten, wobei diese gegenläufig sind und in einer Netto Zu- oder Abnahme bestehen.

Abb. 66 zeigt das Cystein zugänglichkeitmuster für die zweite Transmembranhelix, dargestellt im Strukturmodell (*ab initio* Modellierung durch den QUARK Server; XU und ZHANG (2012)). Die Zugänglichkeitszunahme auf periplasmatischer Seite betrifft eine Seite der Helix und erfolgt in geringem Ausmaß lateral, zum größten Teil aber in Richtung Membraninneres, was auch durch die Verschiebung des letzten zugänglichen Rests von 181 nach 185 deutlich wird. Analog erfolgt auf cytoplasmatischer Seite eine Abnahme der Zugänglichkeit vorwiegend weg vom Membraninneren und der letzte unzugängliche Rest wird von 201 nach 205 verschoben. Es wurden demzufolge gegenläufige Änderungen der Zugänglichkeit auf beiden Membranseiten festgestellt. Diese Beobachtung lässt sich, wie oben beschrieben, durch eine Kolbenhubbewegung der zweiten Transmembranhelix in Richtung Periplasma erklären.



**Abb. 66:** Cystein zugänglichkeit und Veränderung durch Fumarat: TM2 im Strukturmodell. Darstellung von TM2 als *ab initio* Modellierung durch den QUARK Server (XU und ZHANG, 2012) und ihre ungefähre Lage in der Membran. Entsprechend der SCAM Experimente sind zugängliche Positionen grün und unzugängliche rot gefärbt, nicht untersuchte Positionen sind grau hinterlegt. Schwarze Striche zeigen die Positionen, an denen es zu Veränderungen in der Zugänglichkeit durch den Effektor kam.

Axiale Verschiebungen der zweiten Transmembranhelices wurden auch für den Chemozeptor Tar und die Sensorkinase NarX beschrieben bzw. vorgeschlagen (BAKER et al., 2006; CHEUNG und HENDRICKSON, 2009). Während die Stimulierung in der Sensordomäne in NarX die Aufwärtsbewegung von TM2 in Richtung Periplasma auslösen soll,

kommt es in Tar zur Abwärtsbewegung ins Cytoplasma. Mit der entgegengesetzten Bewegung sind allerdings auch gegenläufige Antworten der Kinase auf den Reiz verbunden. In Tar kommt es durch den Lockstoff Aspartat zur Inhibierung der assoziierten Sensor kinase CheA, während die Kinasedomäne in NarX durch Nitratbindung aktiviert wird (NINFA et al., 1991; CAVICCHIOLI et al., 1996). Da auch in DcuS die Effektorbindung die Autophosphorylierung stimuliert (JANAUSCH et al., 2002b), scheint sich möglicherweise der Aufwärtskolbenhub im Allgemeinen aktivierend und der Abwärtskolbenhub inhibierend auf die Kinasedomäne auszuwirken.

Unterstützt wird die Annahme von den Ergebnissen des Cystein-Crosslinkings zwischen den Monomeren des DcuS-Dimers. Dabei wurde die Periodizität einer durchgehenden Helix PAS<sub>p</sub>-α<sub>6</sub>/TM2 am Übergang Periplasma/Membran wiedergegeben, wie sie bereits für den Chemorezeptor Tar beschrieben wurde (HUGHSON und HAZELBAUER, 1996) und allgemein für Sensor kinasen dieses Typs angenommen wird (KNEUPER et al., 2010). Die Dimerisierungsfläche wird von hydrophoben und kleinen polaren Resten gebildet, wobei im Periplasma eher hydrophobe Reste beteiligt sind. Extrapoliert man die ermittelte Dimerisierungsfläche (172  $\xrightarrow{+4}$  176  $\xrightarrow{+3}$  179  $\xrightarrow{+4}$  183  $\xrightarrow{+3}$  186) in Richtung C-Terminus von TM2, so gelangt man zu den Resten G190 und G194, die das SmallxxxSmall Motiv in TM2 bilden und die dortige Dimerisierungsfläche formen (STEINMETZ, 2014). Eine durchgehende Dimerisierungsfläche in PAS<sub>p</sub>-α<sub>6</sub> und TM2 ist daher wahrscheinlich. Was die Crosslinking Effizienz in diesem Bereich betrifft wurden, im Gegensatz zur Cysteinzugänglichkeit, keine Änderungen zwischen beiden Signalzuständen festgestellt. Die Dimerisierungsfläche bleibt, unabhängig von den oben beschriebenen Konformationsänderungen im Bereich von TM2, offensichtlich unverändert erhalten. Diese Daten bestätigen die eingangs erwähnten Dimerisierungsexperimente von STEINMETZ (2014), wonach eine ständige Dimerisierung für die Funktionalität von DcuS wichtig ist. Darüberhinaus legen sie eine parallele Verschiebung von TM2 und TM2' im Dimer nahe und schließen eine größere Rotation aus, da diese die Kontaktfläche verändern würde. Kleinere Rotationsbeteiligungen, die zusätzlich zum Kolbenhub stattfinden, lassen sich jedoch nicht vollständig ausschließen.

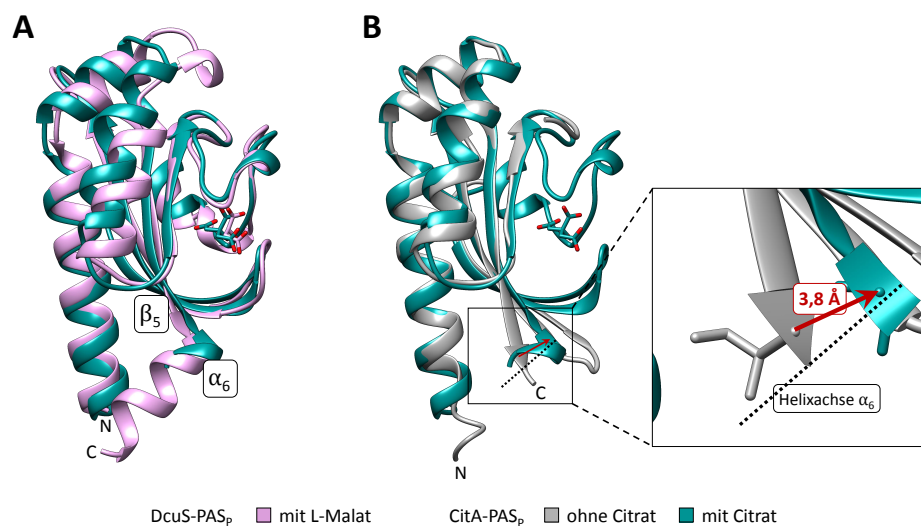
Unabhängig von Cysteinzugänglichkeit oder -Crosslinking lieferten Argininvarianten weitere Hinweise auf eine Längsverschiebung. Einbau, Stabilität und Ausrichtung einer Transmembranhelix werden durch die Eigenschaften ihrer Aminosäuren bestimmt (WHITE und VON HEIJNE, 2008). Ist das hydrophile Arginin Teil einer Transmembranhelix, dann findet man es bevorzugt außerhalb des hydrophoben Kerns, nahe der

wässrigen Phase (KYTE und DOOLITTLE, 1982; ROUX, 2007). Aufgrund dieser räumlichen Prävalenz, können Argininsubstitutionen in einer bestehenden Transmembranhelix, diese in ihrer Lage verändern. In DcuS aktivierten Argininsubstitutionen in der periplasmanahen Hälfte von TM2 den Sensor effektorunabhängig umso stärker, je weiter C-Terminal der Austausch erfolgte. Erklären lässt sich dies damit, dass TM2 für einen weiter C-terminal liegenden Argininrest stärker ins Periplasma verschoben werden muss um diesen aus der ungünstigen hydrophoben Umgebung ins wässrige Milieu zu befördern. Diese Verschiebung als Folge einer Argininsubstitution konnte für die Varianten W181R und W185R anhand der Cystein zugänglichkeit nachgewiesen werden. Korrespondierend zur DcuS-Aktivität überführte der C-terminale Argininrest mehr Reste in die wässrige (zugängliche) Phase als der N-terminale Argininrest. Die Verschiebung von TM2 ins Periplasma führt nach dem Kolbenhubmodell so zur Aktivierung von DcuS. Eine Rotation um die eigene Achse würde hingegen die Stellung des Argininrests zur hydrophoben Umgebung nicht ändern und keine Zugänglichkeitsänderungen bewirken. Eine Rotation um die Querachse, d.h. ein Kippen, ist mit Bezug auf die Auswirkungen von Argininsubstitutionen auf gegenüberliegender Membranseite unwahrscheinlich. Im Falle eines Kippens müssten die Effekte auf beiden Membranseiten ähnlich sein, da die Symmetrieachse dieser Bewegung in der Mitte der Membran liegt (siehe auch Abb. 65). Argininreste in der cytoplasmatischen Hälfte von TM2 haben hingegen an vielen Stellen keinen Effekt auf die DcuS-Aktivität. Das heißt, dass die positive Ladung der Arginine toleriert wird, ebenso wie die positive Ladung von 1-2 Lysinresten im Linker zwischen TM2 und PAS<sub>c</sub> toleriert werden muss, die bei der vermuteten Kolbenhubbewegung in Richtung Periplasma in die Membran gezogen werden.

### 5.1.3 Die Amplitude des Kolbenhubs

Wie oben beschrieben erfolgte die Translokation des letzten zugänglichen bzw. unzugänglichen Restes zwischen beiden Signalzuständen, auf beiden Seiten der Membran in Richtung C-Terminus. Diese Positionsänderungen von 181 nach 185 nahe des Periplasmas bzw. 201 nach 205 nahe des Cytoplasmas betreffen darüberhinaus die gleiche Zahl von vier Resten. Vier Reste entsprechen dem 1,1-fachen einer Helixumdrehung oder 6 Å. Umgekehrt lässt sich daraus ableiten, dass TM2 um eben diese Distanz in Richtung Periplasma axial verschoben werden muss um die beobachteten Veränderungen der Cystein zugänglichkeit in Richtung C-Terminus auszulösen.

Damit sich TM2 ins Periplasma bewegen kann, bedarf es dem Zug durch  $PAS_p$ . DcuS- $PAS_p$  wurde lediglich in Anwesenheit eines Effektors kristallisiert, ein direkter Strukturvergleich zwischen beiden Signalzuständen ist daher nicht möglich. Allerdings wurde die verwandte Sensor kinase CitA aus *Klebsiella pneumoniae* sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Citrat kristallisiert (SEVVANA et al., 2008). Die periplasmatischen Sensordomänen beider Proteine sind sich sehr ähnlich. Dies wird aus der Überlagerung der Kristallstrukturen von DcuS- $PAS_p$  und CitA $_{Kp}$ - $PAS_p$  deutlich (Needleman-Wunsch Algorithmus; Matrix BLOSUM-62) wie er in Abb. 67A dargestellt ist. Bei einer Sequenzidentität von 24 % beträgt die strukturelle Abweichung (RMSD; root mean square deviation) lediglich 1,128 Å. Diese Übereinstimmung erlaubt Rückschlüsse aus dem Strukturvergleich in CitA $_{Kp}$  auf mögliche Konformationsänderungen in DcuS. Der Vergleich der Citrat-freien und -gebunden Struktur (Abb. 67B) zeigt als Reaktion auf die Effektorbindung eine gerichtete Bewegung des C-Terminus. Diese verschiebt den Übergang  $\beta_5/\alpha_6$  um 3,8 Å annähernd parallel zur Helixachse von  $\alpha_6$  in Richtung Bindestelle, was einer Bewegung weg von der Membranoberfläche gleichkommt.



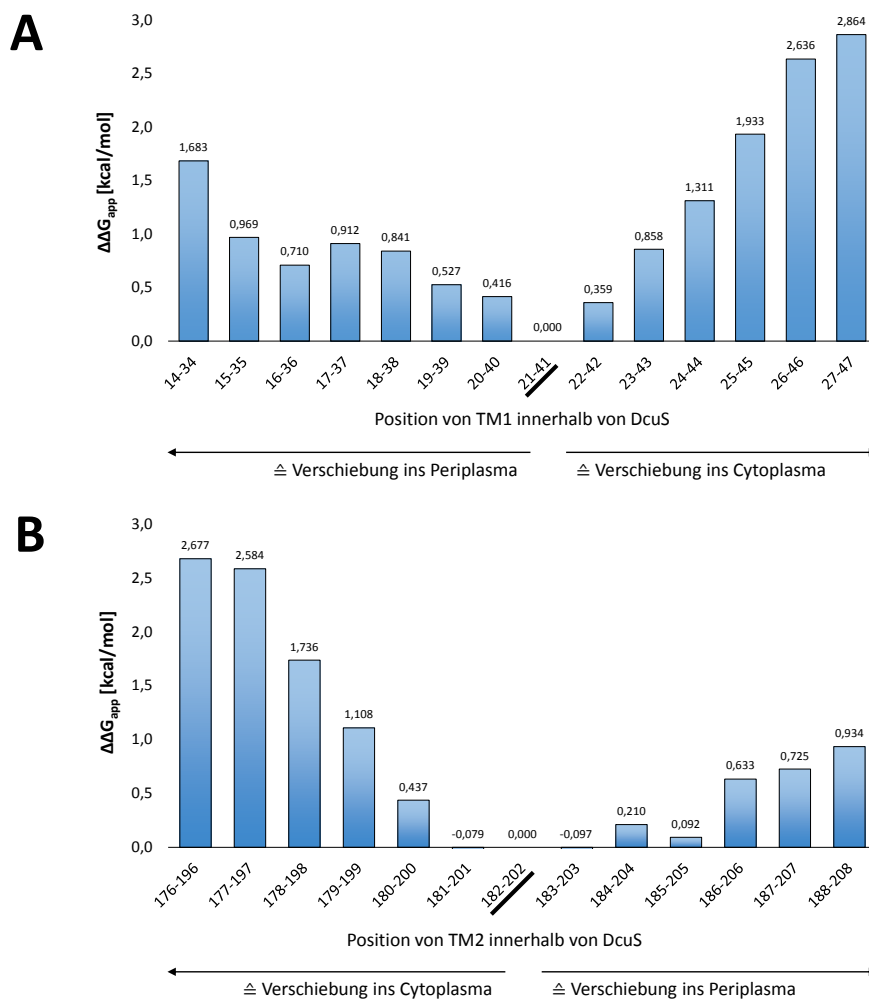
**Abb. 67:** Strukturvergleich DcuS- $PAS_p$  mit CitA $_{Kp}$ - $PAS_p$  und effektorinduzierte Strukturveränderungen in CitA $_{Kp}$ - $PAS_p$ . Die Strukturüberlagerungen wurden mithilfe der MatchMaker Funktion der Software Chimera durchgeführt (Version 1.8; Algorithmus: Needleman-Wunsch. Matrix: BLOSSUM-62; PETERSEN et al. (2004)). A: Strukturüberlagerung der periplasmatischen Domänen von DcuS (#3BY8; rosa) und CitA $_{Kp}$  (#2J80; grün) in ihrer Effektor-gebundenen Form. B: Strukturüberlagerung von CitA $_{Kp}$ - $PAS_p$  ohne (#2V9A; grau) und mit (grün) Citrat. Der C-Terminus ist vergrößert dargestellt. Der rote Pfeil stellt die Verschiebung zwischen den C $\alpha$ -Atomen des Rests I129 dar. Die schwarze Linie entspricht der Helixachse von  $\alpha_6$ .

Überträgt man diese gemessene Distanz auf DcuS, dann würde die Konformationsänderung in PAS<sub>p</sub> die zweite Transmembranhelix um etwa 4 Å aus der Membran herausziehen, im Gegensatz zu der durch die Cysteinzugänglichkeitsstudie ermittelten Verschiebung um 6 Å. Berücksichtigt man jedoch zum einen die deutlich geringere Auflösung der SCAM-Experimente und zum anderen die Tatsache, dass der Wert für PAS<sub>p</sub> nur indirekt ermittelt wurde, kann von einer guten Übereinstimmung ausgegangen werden. Für andere Sensoren, für die ein Kolbenhub in der transmembranen Signaltransduktion beschrieben wurde, lag die ermittelte Amplitude z.T. deutlich niedriger (FALKE und ERBSE, 2009). Für den Aspart-Chemorezeptor Tar wurde für die Amplitude durch Strukturvergleich, Cystein-Crosslinking und EPR-Spektroskopie ein Wert von 1,6 Å bestimmt (CHERVITZ und FALKE, 1996; HUGHSON und HAZELBAUER, 1996; OTTEMANN et al., 1999). Abgeleitet aus den Kristallstrukturen der Sensordomänen von NarX und TorS die beide Signalzustände darstellen, wurden die axialen Verschiebungen näherungsweise auf 1 Å bzw. 3 Å bestimmt (CHEUNG und HENDRICKSON, 2008; MOORE und HENDRICKSON, 2009). TorS, das eine größere Auslenkung des Kolbenhubs im Vergleich zu NarX und Tar zeigen soll, bindet im Gegensatz zu diesen den Effektor nicht direkt, sondern indirekt über das Bindeprotein TorT (BARAQUET et al., 2006). Der Sensor TorS bildet daher einen Sensorkomplex mit TorT. Da auch DcuS mit einem C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter (alternativ DctA oder DcuB) einen Sensorkomplex bildet (KLEEFELD et al., 2009; WITAN et al., 2012a), ist ebenfalls ein größerer Kolbenhub denkbar.

Eine derartige Kolbenhubbewegung ist, wie jede andere Konformationsänderung im Protein, gleichbedeutend mit einer Verschiebung des Gleichgewichtszustands. In einem Sensor liefert die Bindung des Effektors freie Energie zur Verschiebung dieses Gleichgewichts. In einem Sensorkomplex können darüberhinaus dritte Proteine etwa durch eine veränderte Interaktion einen zusätzlichen Beitrag liefern. Eine Abschätzung welche Energie für Konformationsänderungen in DcuS zur Verfügung steht ist für die Effektorbindung nur sehr schwierig (GUMBART et al., 2013) und für den Beitrag seitens der C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter gar nicht möglich, da Details zur Interaktionsschnittstelle unbekannt sind. Typischerweise liefert die Bindung kleiner Liganden  $\Delta\Delta G$ -Werte von 3 - 15  $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$  (MÖGLICH et al., 2009). Konkrete Messungen existieren z.B. für einen pflanzlichen Photosensor, bei dem die Bindung eines Photons etwa 3,8  $\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$  an freier Energie für konformationelle Änderungen bereitstellt (YAO et al., 2008). Besser abschätzen lässt sich jedoch in umgekehrter Richtung wie viel freie Energie benötigt

wird um eine Transmembranhelix in der Membran zu verschieben. HESSA et al. (2005) haben dazu experimentell die Insertion verschiedenster Polypeptide in die Membran des endoplasmatischen Retikulums durch das Sec61-Translokation Komplex bestimmt. Darauf basierend wurde der  $\Delta G$ -prediction Server entwickelt, der anhand einer vorgegebenen Aminosäuresequenz die apparente freie Energie ( $\Delta G_{app}$ ) der Insertion dieser (mutmaßlichen) Transmembranhelix in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums durch das Sec61-Translokation Komplex vorhersagt (HESSA et al., 2007). Negative Werte sprechen für eine favorisierte Insertion in die Membran, während positive Werte die Insertion nicht ausschließen, aber auf zusätzliche stabilisierende Faktoren hinweisen. Diese Kalkulation wurde auf die erste und zweite Transmembranhelix von DcuS angewendet. Dazu wurden 21-Reste-lange Aminosäuresequenzen benutzt, die gleichbedeutend mit unterschiedlichen Positionen von TM1 bzw. TM2 innerhalb der Membran sind. Die durch den  $\Delta G$ -prediction Server berechneten Werte wurden jeweils mit der vorhergesagten Lage für TM1 (21 - 41) bzw. TM2 (182 - 202) verglichen, um Änderungswerte ( $\Delta\Delta G_{app}$ ) zu erhalten. Der Betrag  $\Delta\Delta G_{app}$  kann so als Anhaltspunkt für die benötigte freie Energie der zugehörigen Verschiebung dienen.

Abb. 68 stellt die Änderung der freien Energie für ein potientielles Verschieben von TM1 und TM2, jeweils in beide Richtungen, dar. Für die erste Transmembranhelix zeigt sich in Abb. 68A eine sehr gute Korrelation der Insertion zur vorhergesagten Lage und, dass Verschiebungen in beide Richtungen endergonisch sind. Betrachtet man die vorhergesagte freie Energie als Wahrscheinlichkeit einer Insertion, dann sinkt diese bereits ab einem Rest um mindestens 21 %. Für TM2 korrelieren Insertionsberechnung und Vorhersage ebenfalls sehr gut. Im Gegensatz zu TM1 ist die Verschiebung von TM2 um einen Rest in beide Richtungen schwach exergonisch. Auch bei einer Verschiebung um drei Reste in Richtung Periplasma sinkt die oben definierte Insertionswahrscheinlichkeit nur um 11 %. Nimmt man die Lage 181 - 201 als Ausgangsposition, dann ist sogar eine Verschiebung um vier Reste ins Periplasma ohne Weiteres möglich. Größere Verschiebungen in dieselbe Richtung sind allerdings wieder stark endergonisch. Diese Berechnungen zeigen, dass aus energetischer Sicht erstens ein Kolbenhub ins Periplasma möglich ist und zweitens die Amplitude drei bis vier Reste umfassen kann. Drei bis vier Reste entsprechen einer Verschiebung um 4,5 - 6 Å, was den durch Strukturvergleich (in CitA) und der Cysteinzugänglichkeitsstudie ermittelten Werten sehr nahe kommt.



**Abb. 68:** Veränderung der apparenten freien Energie der Insertion beider Transmembranhelices für verschiedene Positionen in DcuS gegenüber ihrem Grundzustand. Die Berechnung der apparenten freien Energie der Insertion eines Oligopeptids in die Membran ( $\Delta G_{app}$ ) erfolgte über den  $\Delta G$ -prediction server v1.0 (HESSA et al., 2007), basierend auf den für die jeweilige Position zugehörigen Aminosäuresequenzen von DcuS. A:  $\Delta\Delta G_{app}$  für verschiedene Positionen von TM1 gegenüber ihrer vorhergesagten Lage (unterstrichen). B:  $\Delta\Delta G_{app}$  für verschiedene Positionen von TM2 gegenüber ihrer vorhergesagten Lage (unterstrichen).

Allerdings gilt es diese Vorhersagen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf DcuS kritisch zu hinterfragen. Erstens, die Daten, die Grundlage der Berechnung sind, wurden experimentell in einem eukaryotischen System erhoben. Dort erfolgt die Insertion von Polypeptiden co-translational in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), während dieser Einbau in Prokaryoten direkt in die Cytoplasmamembran erfolgt. Beide Membranen unterscheiden sich in ihrer Lipidzusammensetzung. Während die ER-

Membran zu 50-60 % aus Phosphatidylcholin besteht, ist in der Cytoplasmamembran von *E. coli* Phosphatidylethanolamin mit 70-80 % Hauptbestandteil (DAVISON und WILLS, 1974; DOWHAN, 1997). Da die Lipidkomposition Translokation, Topologie und Stabilität von Membranproteinen beeinflusst (SCHNEITER und TOULMAY, 2007), könnte die Insertion in *E. coli* von den Berechnungen abweichen. Zweitens, in Eukaryoten und Prokaryoten arbeiten unterschiedliche Maschinerien an der Insertion/Translokation von Membranproteinen. Die Experimente von HESSA et al. (2005) wurde mit dem eukaryotischen Sec61-Translokation durchgeführt, während in *E. coli* das SecYEG-Translokation arbeitet (MANTING und DRIESSEN, 2000). Beide Systeme sind homolog zueinander (RAPPOPORT, 2007), weshalb grundlegende Unterschiede in der Insertionswahrscheinlichkeit nicht unbedingt vorhanden sein müssen, aber auch nicht auszuschließen sind. Drittens, berücksichtigt die Vorhersage der apparenten freien Energie der Insertion nicht die Aminosäuren, die bei einer Verschiebung aus der Membran in die wässrige Phase gelangen. Bei einer Verschiebung um 3-4 Reste in DcuS sind darunter zwei hydrophobe Isoleucinreste an den Position 183 und 184. Berechnungen von WIMLEY und WHITE (1996) zufolge ist die Überführung eines Isoleucinrestes aus der Membran ins Wasser mit  $0,31 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$  endergonisch. Die Energieaufwendung könnte in DcuS allerdings geringer sein, da entsprechend des Cystein-Crosslinkings zumindest I183 Teil der Dimerisierungsfläche ist. Im DcuS-Dimer würden sich die Isoleucinreste in TM2 und TM2' gegenüberliegen und gegenseitig von der wässrigen Phase abschirmen. Viertens, die Änderung der freien Energie  $\Delta\Delta G_{app}$  wie sie in Abb. 68 dargestellt ist, wurde anhand zweier voneinander unabhängiger Insertionsvorhersagen berechnet, die die beiden Endpunkte des Kolbenhubs repräsentieren. Die Verschiebung ist aber ein dynamischer und kontinuierlicher Prozess, dessen Eigenschaften nicht in die Berechnung Einfluss gefunden haben. Auf der anderen Seite wurde kürzlich eine sehr gute Korrelation zwischen der SecYEG-vermittelten Insertion von  $\alpha$ -Helices in die bakterielle Membran und der Sec61-vermittelten Insertion ins ER gezeigt (OJEMALM et al., 2013). Das heißt, trotz all dieser Bedenken bezüglich der Anwendbarkeit des  $\Delta G$ -prediction Servers auf die Energetik einer Kolbenhubbewegung von TM2 in DcuS, vermittelt die Vorhersage zweifellos eine gute Annäherung an die tatsächlichen energetischen Aspekte und zeigt, dass eine ausgedehnte Kolbenhubbewegung von mehreren Å möglich ist.

### 5.1.4 Tryptophanreste bestimmen die Auslenkung der Kolbenhubbewegung

Verfolgt man die Cystein zugänglichkeit in der zweiten Transmembranhelix von ihrem N-Terminus Rest für Rest, dann wechselte durch das Aktivieren des Sensors der letzte zugängliche Rest von Position 181 zu Position 185. An beiden Positionen befindet sich im Wildtyp ein Tryptophanrest. Definiert man den letzten zugänglichen Rest als Übergangsgrenze zur Transmembranhelix, dann wird diese Grenze in beiden Signalzuständen durch einen Tryptophanrest gebildet. Auch der Austausch jeweils eines dieser beiden Reste gegen ein Arginin aktivierte DcuS, wobei der Austausch an Position 185 die gleiche Zugänglichkeit herstellte wie der Effektor Fumarat. Am cytoplasmatischen Ende von TM2 sind in DcuS hingegen keine Tryptophanreste vorhanden. Das Einbringen von Tryptophanen in diesen Bereich hatte an zwei Positionen eine Veränderung der DcuS-Aktivität zur Folge. Diese beiden Reste 202 und 206 sind wie 181 und 185 um vier Reste gegeneinander versetzt und so wie 181 im Periplasma die Grenze zu TM2 bildet, so bildet 202 die Grenze zum Cytoplasma.

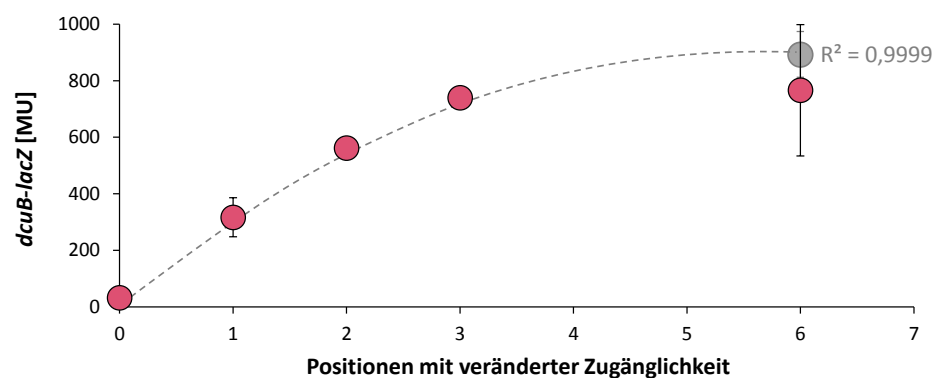
Tryptophanreste sind typisch für Transmembranhelices wo sie statistisch bevorzugt auf extra-cytoplasmatischer Seite in der Übergangszone lipophiler Kern/polare Kopfgruppen auftreten (BAEZA-DELGADO et al., 2013). Der amphiphile Charakter und die Aromatizität ( $\pi$ -Elektronenstruktur) sorgen für die dortige Orientierung und das große Volumen und die Steifheit des Indolrings erlauben nur wenig Bewegungsfreiheit, weshalb Tryptophanreste für die Ausrichtung und Verankerung von Transmembranhelices mitverantwortlich sein sollen (SCHIFFER et al., 1992; KILLIAN und VON HEIJNE, 2000; DE PLANQUE et al., 2003; NORMAN und NYMEYER, 2006; MACCALLUM et al., 2008; SPARKS et al., 2014). *In vitro* wurde durch das Repositionieren eines Tryptophanrestes ein Poly-Leucin Peptid vertikal zur Membran verschoben (BRAUN und VON HEIJNE, 1999). Tryptophanreste spielen ebenfalls eine richtige Rolle im Aspartat-Chemorezeptor Tar, wo ihr Austausch oder ihre Repositionierung den Signalzustand ändert (DRAHEIM et al., 2005, 2006).

Eine Beteiligung an der Signaltransduktion durch DcuS ist daher denkbar. Die beiden Tryptophanreste auf periplasmatischer Seite könnten jeweils einen der beiden Signalzustände stabil positionieren und dadurch die Auslenkung des Kolbenhubs begrenzen.

### 5.1.5 Die Amplitude der Kolbenhubbewegung bestimmt die Stärke der DcuS-Aktivierung

DcuS besitzt ein breites Substratspektrum, je nach Substrat fällt die Expression der Reporterfusion unterschiedlich stark aus (KNEUPER et al., 2005; KRÄMER, 2008; WÖRNER, 2013). Da das Ausmaß der Phosphorylierung von DcuS auch *in vitro* vom jeweiligen Effektor abhängt (JANAUSCH, 2001) und DcuS die sensorische Einheit im Sensorkomplex mit DctA bildet (STEINMETZ et al., 2014), muss die Antwortstärke des Sensors mit internen Konformationsänderungen im Zusammenhang stehen.

Vor diesem Hintergrund wurde die Cysteinzugänglichkeit rund um TM2 in Gegenwart mehrerer Effektoren untersucht. Die resultierenden Zugänglichkeitsmuster unterschieden sich in der Zahl an Positionen, die zwischen beiden Signalzuständen eine veränderte Zugänglichkeit aufwiesen. Die Stärke eines Effektors entspricht der durch ihn ausgelösten Reporterexpression. Das Ausmaß der Zugänglichkeitsänderung oder Repositio- nierung nimmt mit steigender Effektorstärke über den gesamten Bereich kontinuierlich zu (siehe Abb. 69). Klammert man *dcuB-lacZ*-Expression und Cysteinzugänglichkeits- veränderung, die durch Succinat verursacht wurden, aus, da Succinat in der anaeroben Atmung durch *E. coli* nicht genutzt wird (UNDEN und KLEEFELD, 2004), dann folgt der Zusammenhang zwischen Effektorstärke und der Anzahl von Positionen mit einer veränderten Zugänglichkeit einer Sättigungskurve (graue Linie in Abb. 69).



**Abb. 69:** Korrelation zwischen DcuS-Aktivierung und Positionen mit einer veränderten Zugänglichkeit durch verschiedene Effektoren. Darstellung wie in Abb. 21, aber mit vertauschten Achsen. Der graue Punkt gibt die *dcuB-lacZ*-Expression bei Ausklammerung von Succinat an. Die graue Linie spiegelt die polynomische Regression unter dieser Voraussetzung wieder; das Bestimmtheitsmaß der Regression ist als  $R^2$ -Wert angegeben. Succinat wurde deshalb ausgeklammert, da Succinat in der anaeroben Atmung durch *E. coli* nicht genutzt wird (UNDEN und KLEEFELD, 2004) und die Messung der *dcuB-lacZ*-Expression während der anaeroben Atmung erfolgte.

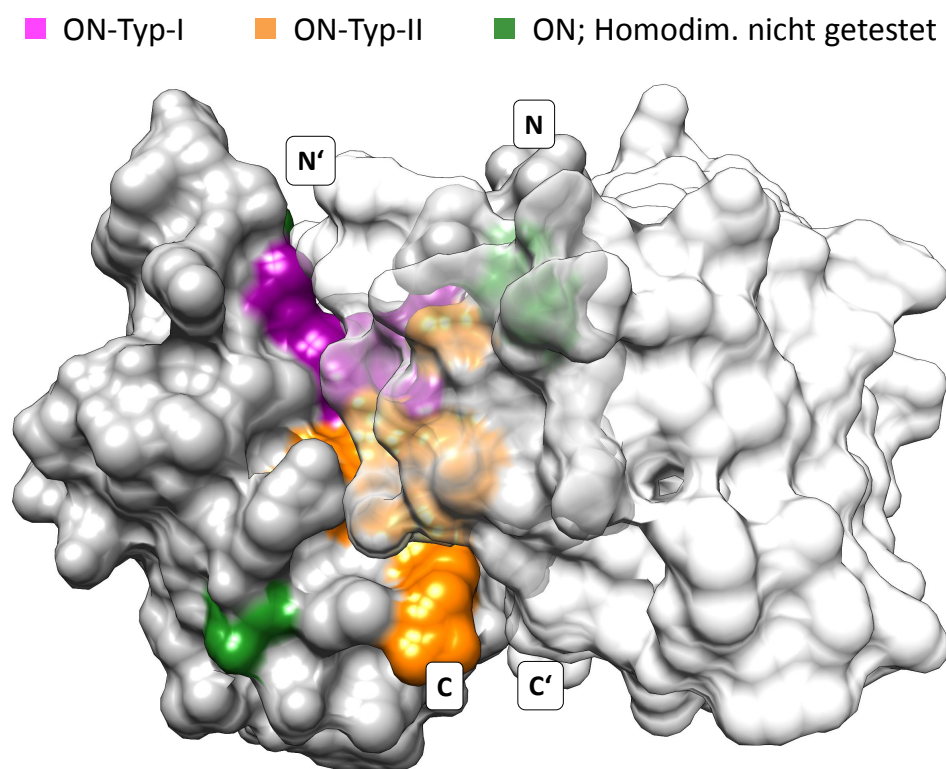
Wie bereits erwähnt, bildet die Änderung der Cysteinzugänglichkeit Konformationsänderungen im Membranbereich ab und diese Konformationsänderungen bestehen für TM2 in einem Kolbenhub. Betrachtet man daher die Anzahl von Positionen mit veränderter Cysteinzugänglichkeit als Maß für die Konformationsänderung und diese wiederum als Amplitude des Kolbenhubs, dann korrelieren diese Parameter mit der Effektorstärke. Es lässt sich schlussfolgern, dass der Effektor die Amplitude der Kolbenhubbewegung und diese wiederum die Stärke der DcuS-Aktivierung und dadurch die Expression regulierter Gene bestimmt.

Das erscheint physiologisch sinnvoll, da unter anaeroben Bedingungen neben Fumarat auch L-Malat bevorzugtes Substrat für *E. coli* ist, weshalb die Fumarase B, die L-Malat zum Elektronenakzeptor Fumarat dehydratisiert, gemeinsam mit dem C<sub>4</sub>-Dicarboxylattransporter DcuB codiert ist. Der Metabolismus von L-Tartrat und Citrat mündet zwar in der Fumaratreduktion als terminalem Schritt und benötigt daher neben Co-Substraten auch die Fumaratreduktase. Es werden aber darüberhinaus weitere Enzyme und vor allem andere Transporter (TtdT, CitT) benötigt, deren Expression von eigenen Sensorsystemen (CitAB, TtdR) reguliert wird (POS et al., 1998; KASPAR und BOTT, 2002; KIM und UNDEN, 2007; YAMAMOTO et al., 2008; KIM et al., 2009). Eine geringere DcuS-Aktivierung durch L-Tartrat und Citrat gegenüber Fumarat und L-Malat ist somit für *E. coli* ressourcenschonend.

### 5.2 Signaltransduktion durch PAS<sub>c</sub>

Nachdem TM2 das Signal intramolekular in Form einer Kolbenhubbewegung über die Membran getragen hat, gelangt es zur cytoplasmatischen PAS-Domäne, ehe es die Kinasedomäne erreicht. Diese ist dabei mit TM2 über einen kurzen Linker aus neun Aminosäuren verbunden und erstreckt sich über die Positionen 212 - 323. Im Sensorkomplex ist PAS<sub>c</sub> wichtig für die Wechselwirkung mit dem Co-Regulator DctA. Beide Signale, Anwesenheit von Effektoren und Präsenz des Transporters, werden vermutlich hier integriert und an die Kinasedomäne weitergeleitet (WITAN et al., 2012b). Die PAS<sub>c</sub>-Domäne allgemein und insbesondere die N-terminale  $\alpha$ -Helix weisen eine hohe Plastizität auf, die im Zusammenhang mit der Signaltransduktion stehen könnte (ETZKORN et al., 2008). Zur weiteren Charakterisierung dieser Struktur-Funktions-Zusammenhänge wurde die durch DEGREIF-DÜNNWALD (2011) begonnene Suche nach Funktionsmutationen, die

im Signaltransfer verändert sind, fortgesetzt. Zusätzlich zu den zuvor bekannten 17 ON-Mutationen an 11 Positionen in DcuS wurden 14 weitere ON-Mutationen an 10 neuen Positionen identifiziert. Demnach führte die Mutation an rund jeder fünften Position in  $PAS_c$  zur effektorunabhängigen Aktivierung des Sensors. Die ON-Mutationen sind jedoch nicht gleichmäßig im Protein verteilt, sondern konzentrieren sich auf N- und C-Terminus, d.h. dort wo  $PAS_c$  das Signal von TM2 empfängt bzw. an die Kinasedomäne übergibt. Strukturell ist die räumliche Akkumulierung von ON-Mutationen noch ausgeprägter, wie an einem auf NifL-PAS1 aus *Azotobacter vinelandii* basierenden Strukturmodell ersichtlich wird (siehe Abb. 70 und Abb. 63 für die Ansicht im Monomer).



**Abb. 70:** Klassifizierung und Lage der  $PAS_c$ -ON-Mutationen im dimeren Oberflächenstrukturmodell. Die Klassifizierung erfolgte auf Grundlage der Homodimerisierung in Vollängen-DcuS (siehe Abb. 62). Die Modellierung der  $PAS_c$ -Struktur erfolgte durch den SWISS-MODEL Server mit PAS1 von NifL aus *Azotobacter vinelandii* (#2GJ3) als Vorlage (KEY et al., 2007; BIASINI et al., 2014). Grün: ON-Mutationen in  $PAS_c$  ohne weitere Charakterisierung. Magenta: ON-Typ-I. Orange: ON-Typ-II. Der Farbcode wurde nur auf ein Monomer ( $N \Rightarrow C$ ) angewendet, während das andere Monomer ( $N' \Rightarrow C'$ ) transparent dargestellt ist.

In der Struktur nehmen die Positionen von PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen, die 20 % aller modellierten Reste ausmachen, 14 % der Oberfläche (869 Å<sup>2</sup>) ein, d.h. sie drängen sich dicht auf einem abgegrenzten Bereich. Diese Fläche erstreckt sich vom Boden und den Rändern einer V-förmigen Tasche, die durch die N-terminale Helix  $\alpha$ 1 und die Verbindung zwischen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 gebildet wird, zum C-Terminus von PAS<sub>c</sub>.

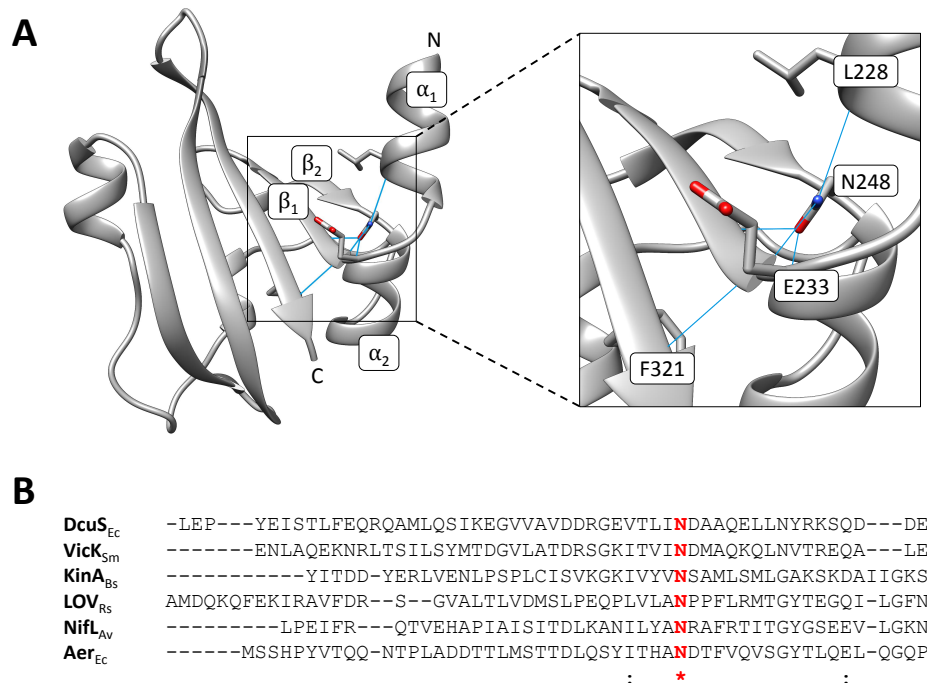
Die PAS<sub>c</sub>-ON-Mutationen wurden anhand ihres Einflusses auf die Homodimerisierung von DcuS und die Interaktion mit dem Co-Regulator DctA in zwei bzw. drei Gruppen eingeteilt: (a) ON-Typ-I mit Verlust von Homodimerisierung und Interaktion sowie (b) ON-Typ-II mit bestehender Homodimerisierung und Verlust (ON-Typ-IIa) bzw. (c) Erhalt (ON-Typ-IIb) der Interaktion zu DctA. Entsprechend ihres Phänotyps clustern die beiden Typen I und II in klar abgegrenzten Flächen, ON-Typ-I in der V-förmigen Tasche und ON-Typ-II in der Verbindung der Tasche zum C-Terminus (siehe Abb. 70). Daraus können drei Annahmen abgeleitet werden: (I) Die strukturelle Integrität der Tasche ist für die Homodimerisierung wichtig, (II) Homodimerisierung in PAS<sub>c</sub> und DcuS-Funktion stehen im Zusammenhang und (III), die DcuS-Aktivierung setzt nicht den Verlust der Homodimerisierung bzw. DctA-Interaktion voraus.

Bei ON-Mutationen vom Typ-I handelt es sich meist um Substitutionen einer hydrophoben gegen eine polare/geladene Aminosäure. Hydrophobe Wechselwirkungen in der Tasche könnten folglich die Dimerisierung von PAS<sub>c</sub> fördern und die Dimerisierung eine wichtige Funktion in der Aktivitätskontrolle des Sensors spielen. Die Bedeutung von hydrophoben Resten in PAS-Domänen für Funktion und Interaktion konnte bereits für andere Proteine gezeigt werden. In den PAS-Domänen von NifL<sub>Av</sub>, KinA aus *Bacillus subtilis*, VicK aus *Streptococcus mutans*, FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* und RsLOV aus *Rhodobacter sphaeroides* kommt es ebenfalls zur Bildung einer hydrophoben Tasche im Bereich von  $\beta$ -Faltblatt und N-terminaler  $\alpha$ -Helix, die mit der Dimerisierung verknüpft ist (KEY et al., 2007; LEE et al., 2008; AYERS und MOFFAT, 2008; WANG et al., 2013; CONRAD et al., 2013). Dieser Bereich kann auch für die Heterodimerisierung von PAS-Domänen sorgen, die typischerweise in Eukaryoten zu finden ist, z.B. in Säugern zwischen HIF-2 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) und ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) die mit der zellulären Antwort auf Sauerstoff-Verfügbarkeit verbunden sind (ERBEL et al., 2003). Für RsLOV wurde die Stimulus-induzierte Auflösung der Dimerisierung der PAS-Domäne und für HIF-2 $\alpha$ /ARNT ein Zusammenhang zwischen Integrität der hydrophoben Tasche und der Proteinfunktion gezeigt (CONRAD et al., 2013; ERBEL et al., 2003). Für NifL<sub>Av</sub> wurde eine direkte Verbindung zwischen

der Signalaufnahme in PAS1, einer geschwächten Dimerisierung von PAS2 und einem veränderten Signalzustand gezeigt (SLAVNY et al., 2010). Der direkte Bezug von PAS-Dimerisierung und Kinaseaktivität konnte für KinA<sub>Bs</sub> nachgewiesen werden (LEE et al., 2008). Für Aer, den Sensor der Aerotaxis, wurde die gleiche Ansammlung von Funktionsmutationen im Bereich der N-terminalen Helix und des  $\beta$ -Faltblatts beschrieben und mit der Aktivität des Sensors verknüpft (CAMPBELL et al., 2010).

DcuS existiert in der Zelle, unabhängig von Effektoren, als Dimer oder höheres Oligomer, was für den Sensor im Ganzen, verkürzte Konstrukte und einzelne Domänen hier durch BACTH-Tests und Cystein-Crosslinking und bereits zuvor durch BACTH- und GALLEX-Tests, FRET-Analysen und chemisches Crosslinking gezeigt wurde (SCHEU et al., 2010b; MONZEL et al., 2013; STEINMETZ, 2014). Die Dimerisierung des Sensors ist funktionell wichtig, was sich an der fehlenden *in vitro* Phosphorylierung von gereinigtem, aber nicht rekonstituiertem DcuS zeigt (JANAUSCH et al., 2002b). Es ist daher davon auszugehen, dass der Verlust der Homodimerisierung in den BACTH-Tests für ON-Typ-I-Mutationen sterisch bedingt ist und eher einer strukturellen Störung als einem Dimerisierungsverlust im gesamten Protein entspricht. Der Kontext aus hydrophober Tasche, Dimerisierung und Aktivitätskontrolle gilt eher für die einzelne Domäne PAS<sub>c</sub> als für den gesamten Sensor. Dazu passen die Ergebnisse von Gelfiltrationen, wonach die Kinase-stimulierende Mutation Y29A in PAS-A von KinA<sub>Bs</sub> zwar zur Monomerisierung der isolierten PAS-Domäne führt, die Dimerisierung des gesamten Proteins aber nicht verändert (LEE et al., 2008).

Eine besondere Stellung in PAS<sub>c</sub> nimmt der Rest N248 ein, der unabhängig von Polarität, Ladung oder Größe empfindlich auf Substitutionen reagiert. Als einziger Rest mit ON-Typ-I-Mutationen hat er keinen Anteil an der kritischen Dimerisierungsoberfläche, da er im inneren des Proteins verborgen ist. Die Seitenkette von N248 bildet insgesamt vier Wasserstoffbrücken zum Rückgrat der Reste L228, E233, V235 und A251 aus und verknüpft dadurch in einmaliger Weise mehrere Sekundärstrukturen der Domäne, bestehend aus den  $\alpha$ -Helices  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  sowie den  $\beta$ -Strängen  $\beta_1$  und  $\beta_2$ . Dadurch werden über das Rückgrat an den Resten L228, E233 und F321, wo ebenfalls ON-Mutationen erzeugt wurden, über drei H-Brücken und 10 Å N- und C-Terminus, d.h. Signaleingang und -ausgang der Domäne verknüpft (Abb. 71A). Der Rest N248 ist in den meisten der oben genannten Proteine konserviert (Abb. 71B) und könnte eine wichtige Scharnierfunktion in der Übersetzung des Signals vom Kolbenhub in eine lokale Schwächung der Dimerisierung übernehmen.



**Abb. 71:** Bedeutung von N248 in PAS<sub>c</sub>: Struktur und Alignment. A: Lage der Reste L228, N248, E233 und F321 in PAS<sub>c</sub>. Wasserstoffbrücken der beteiligten Reste in als blaue Linien dargestellt. B: Alignment von PAS-Domänen von DcuS, VicK aus *Streptococcus mutans*, KinA aus *Bacillus subtilis*, LOV aus *Rhodobacter sphaeroides*, NifL aus *Azotobacter vinelandii* und Aer aus *Escherichia coli*. N248 aus DcuS und seine homologen Reste in den anderen Proteinen sind rot markiert.

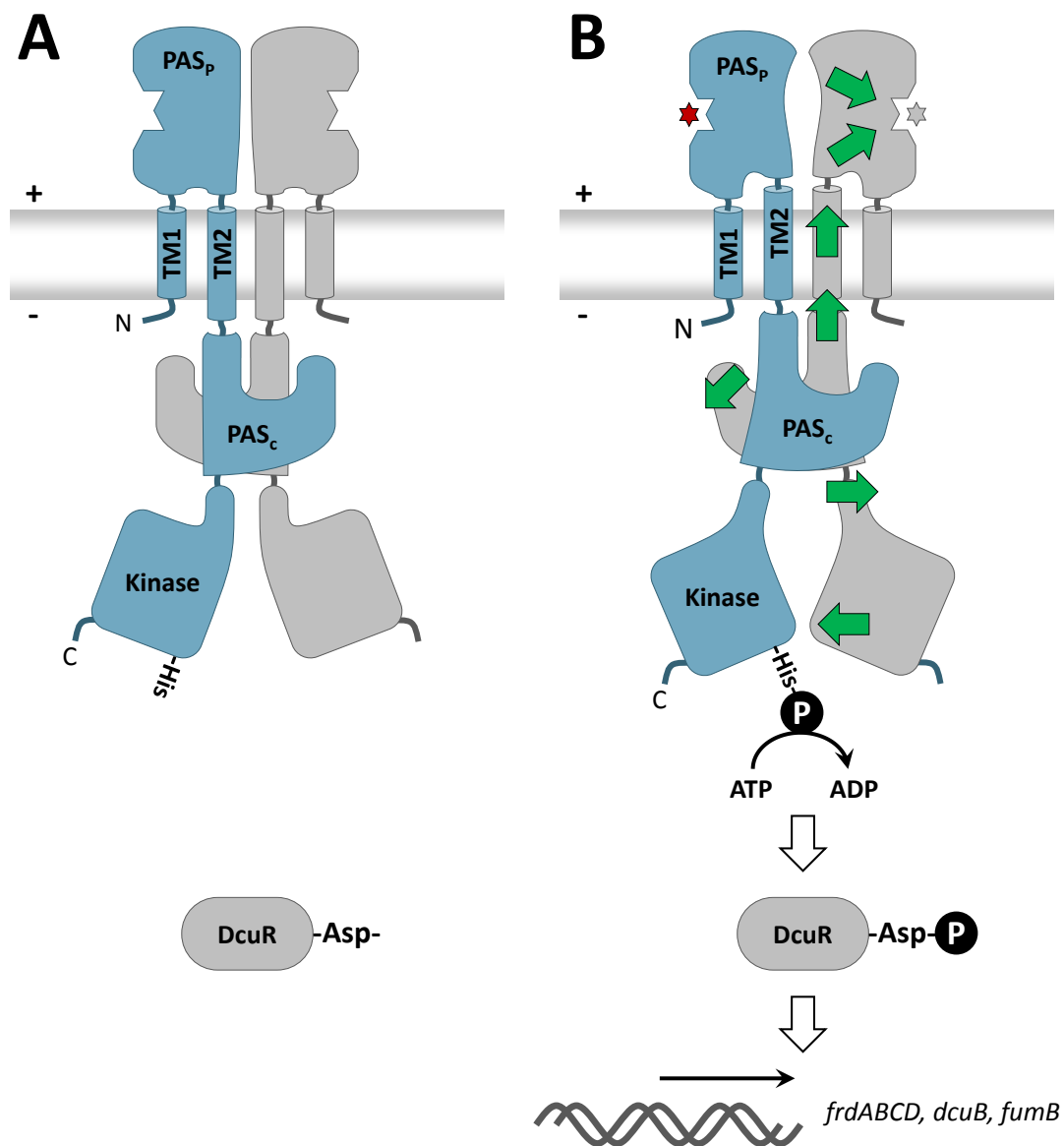
Die meisten ON-Mutationen hatten den vollständigen Verlust der Interaktion zwischen DcuS und DctA zur Folge. Mit L228A, N304D und R322A gab es jedoch auch ON-Mutationen (Typ-IIb), die sowohl die Homodimerisierung des Sensors als auch die Interaktion zum Co-Regulator unberührt ließen. Ein Interaktionsverlust kann demnach nicht Voraussetzung für die Sensoraktivierung sein. Wahrscheinlicher ist es, dass die fehlende Interaktion von ON-Typ-I- und -IIa-Mutationen im BACTH-Test auf sterische Aspekte des BACTH-Systems zurückzuführen ist und eher eine Störung (nicht aber den Verlust) der Interaktion widerspiegelt. Dafür spricht, dass Fumarat in den wildtypischen Proteinen DcuS und DctA keine Auflösung der Interaktion im BACTH-Test verursacht (MONZEL et al., 2013) und, dass Varianten von DcuB, die im Sensorkomplex regulatorisch inaktiv sind, ebenfalls mit DcuS interagieren (Monzel, unveröffentlicht). Da Deletionen von DctA und DcuB jedoch DcuS aktivieren, muss die veränderte Interaktion zwischen Transporter und Sensor strukturell einem Interaktionsverlust entsprechen.

### 5.3 Modell der intramolekularen Signaltransduktion in DcuS

Die Ergebnisse dieser Arbeit können mit dem bisherigen Kenntnisstand zu einem neuen Funktions- und Arbeitsmodell von DcuS zusammengeführt werden (Abb. 72).

In der periplasmatischen PAS-Domäne werden Fumarat oder L-Malat, als bevorzugte C<sub>4</sub>-Dicarboxylate, in der Substratbindestelle gebunden (KNEUPER et al., 2005). Teile des  $\beta$ -Faltblattgerüsts ziehen sich zusammen und bilden eine kompaktere Struktur um den gebundenen Liganden herum, darunter auch der C-terminale  $\beta$ -Strang  $\beta_5$ . Dieser zieht die C-terminale  $\alpha$ -Helix  $\alpha_6$  entlang ihrer Längsachse zum Inneren der Bindetasche hin, d.h. weg von der Membran. PAS<sub>p</sub>- $\alpha_6$  und TM2 bilden eine durchgehende Helix, weshalb TM2 der Bewegung von  $\alpha_6$  folgt und aus der Membran heraus ins Periplasma verschoben wird. Diese kolbenhubförmige Bewegung hat eine Dimension von ca. 4 - 6 Å, ist mit dem Wechsel des verankernden Tryptophanrests von Position 181 zu 185 verbunden und findet für die Helices TM2 und TM2' des Dimeres parallel statt. Der Kolbenhubbewegung folgen vermutlich auch der cytoplasmatische Linker, der sich an TM2 anschließt, sowie die N-terminale  $\alpha$ -Helix von PAS<sub>c</sub>. Dort wird voraussichtlich am Rest N248 als Scharniergelenk der Domäne, die axiale Bewegung in eine veränderte quaternäre Struktur von PAS<sub>c</sub> umgesetzt, die mit einer geschwächten oder veränderten Dimerisierung verbunden ist.

Die Aktivierung der Autophosphorylierung in der Kinasedomäne von Sensor-Histidinkinase soll ebenfalls mit partiellen Destabilisierungen der Quartärstruktur verbunden sein (MARINA et al., 2005; DAGO et al., 2012; SZURMANT und HOCH, 2013). Die Strukturanalyse von DesK aus *Bacillus subtilis* und HK853 aus *Thermotoga maritima* zeigte, dass eine zahnradförmige Drehung der  $\alpha$ -Helices des Vier-Helix-Bündels in der Dimerisierungseinheit (DHp), für die passende Ausrichtung der katalytischen Einheit der Domäne zum Histidinrest sorgt (CASINO et al., 2009; ALBANESI et al., 2009; STEWART, 2010). In VicK aus *Streptococcus mutans* sorgt wiederum eine Biegung der  $\alpha$ -Helices für die Aktivierung der Autokinase (WANG et al., 2013). Welche Konformationsänderungen in DcuS genau stattfinden, lässt sich daher nicht sagen, allerdings wirkt PAS<sub>c</sub> als Silencer der Kinase, d.h. die inaktive PAS<sub>c</sub>-Domäne verhindert den Übergang der Kinase in ihren aktiven Zustand (MONZEL et al., 2013). Am Übergang von PAS<sub>c</sub> zur Kinasedomäne könnte eine weitere Übersetzung des Signals stattfinden. Die beschriebene intramolekulare Signaltransduktion sorgt schließlich dafür, dass DcuS autophosphoryliert wird und mit der Signalkaskade über DcuR die Regulation des Stoffwechsels stattfindet.



**Abb. 72:** Modell der intramolekularen Signaltransduktion in DcuS. Beschriftung und Autophosphorylierung sind nur für eines der beiden Monomere gezeigt, während im zweiten Monomer die ermittelten und abgeleiteten Bewegungen als grüne Pfeile dargestellt sind. A: Im inaktiven Zustand von DcuS sorgen die Konformationen von PAS<sub>p</sub>, TM2 und PAS<sub>c</sub> dafür, dass die Kinasedomäne nicht autophosphoryliert werden kann. B: Die Aktivierung von DcuS durch Bindung eines Effektors (roter Stern) führt dazu, dass sich das  $\beta$ -Faltblattgerüst um den Liganden herum zusammenzieht und die C-terminale  $\alpha$ -Helix angehoben wird. Dieser Bewegung folgt TM2 als Kolbenhub ins Periplasma. Die anschließende PAS<sub>c</sub>-Domäne setzt die axiale Verschiebung in eine geänderte Quartärstruktur um, was letztlich die Kinasedomäne aktiviert und die Autophosphorylierung auslöst. Ein Phosphotransfer aktiviert den Responseregulator DcuR, der seinerseits die Expression regulierter Gene (*frdABCD, dcuB, fumB*) kontrolliert. Die weiteren Aktivierungsmöglichkeiten, d.h. Deletion des Transporters und ON-Mutationen sind nicht eingezeichnet, rufen aber die selben bzw. ähnliche Konformationsänderungen hervor.

## 6 Literatur

### Literatur

- ABO-AMER, ALY E., J. MUNN, K. JACKSON, M. AKTAS, P. GOLBY, D. J. KELLY und S. C. ANDREWS (2004). *DNA interaction and phosphotransfer of the C4-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 186(6):1879–1889.
- ADLER, J. (1975). *Chemotaxis in bacteria*. Annual Review of Biochemistry, 44:341–356.
- ALBANESI, DANIELA, M. MARTÍN, F. TRAJTENBERG, M. C. MANSILLA, A. HAOUZ, P. M. ALZARI, D. DE MENDOZA und A. BUSCHIAZZO (2009). *Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(38):16185–16190.
- ALLOCATI, NERINO, M. MASULLI, M. F. ALEXEYEV und C. DI ILIO (2013). *Escherichia coli in Europe: An Overview*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10(12):6235–6254.
- ANANTHARAMAN, V. und L. ARAVIND (2000). *Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors*. Trends in Biochemical Sciences, 25(11):535–537.
- APPLEMAN, J. ALEX und V. STEWART (2003). *Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the Escherichia coli nitrate sensor NarX*. Journal of Bacteriology, 185(1):89–97.
- ARAVIND, L. und C. P. PONTING (1999). *The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins*. FEMS microbiology letters, 176(1):111–116.
- AYERS, REBECCA A. und K. MOFFAT (2008). *Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains*. Biochemistry, 47(46):12078–12086.
- BADER, MARTIN W., S. SANOWAR, M. E. DALEY, A. R. SCHNEIDER, U. CHO, W. XU, R. E. KLEVIT, H. LE MOUAL und S. I. MILLER (2005). *Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase*. Cell, 122(3):461–472.

- BAEZA-DELGADO, CARLOS, M. A. MARTI-RENOM und I. MINGARRO (2013). *Structure-based statistical analysis of transmembrane helices*. European biophysics journal: EBJ, 42(2-3):199–207.
- BAIKALOV, I., I. SCHRÖDER, M. KACZOR-GRZESKOWIAK, K. GRZESKOWIAK, R. P. GUNSALUS und R. E. DICKERSON (1996). *Structure of the Escherichia coli response regulator NarL*. Biochemistry, 35(34):11053–11061.
- BAKER, MELINDA D., P. M. WOLANIN und J. B. STOCK (2006). *Signal transduction in bacterial chemotaxis*. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 28(1):9–22.
- BARAQUET, CLAUDINE, L. THÉRAULAZ, M. GUIRAL, D. LAFITTE, V. MÉJEAN und C. JOURLIN-CASTELLI (2006). *TorT, a member of a new periplasmic binding protein family, triggers induction of the Tor respiratory system upon trimethylamine N-oxide electron-acceptor binding in Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 281(50):38189–38199.
- BASS, RANDAL B., S. L. BUTLER, S. A. CHERVITZ, S. L. GLOOR und J. J. FALKE (2007). *Use of Site-Directed Cysteine and Disulfide Chemistry to Probe Protein Structure and Dynamics: Applications to Soluble and Transmembrane Receptors of Bacterial Chemotaxis*. Methods in enzymology, 423:25–51.
- BASSLER, B. L., M. WRIGHT und M. R. SILVERMAN (1994). *Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in Vibrio harveyi: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway*. Molecular Microbiology, 13(2):273–286.
- BAUER, JULIA, M. J. FRITSCH, T. PALMER und G. UNDEN (2011). *Topology and accessibility of the transmembrane helices and the sensory site in the bifunctional transporter DcuB of Escherichia coli*. Biochemistry, 50(26):5925–5938.
- BECKER, S., G. HOLIGHAUS, T. GABRIELCZYK und G. UNDEN (1996). *O<sub>2</sub> as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 178(15):4515–4521.
- BEINERT, H. und P. KILEY (1996). *Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters?*. FEBS letters, 382(1-2):218–219; discussion 220–221.

- BIASINI, MARCO, S. BIENERT, A. WATERHOUSE, K. ARNOLD, G. STUDER, T. SCHMIDT, F. KIEFER, T. G. CASSARINO, M. BERTONI, L. BORDOLI und T. SCHWEDE (2014). *SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information*. Nucleic Acids Research, 42(Web Server issue):W252–258.
- BOGDANOV, MIKHAIL, W. ZHANG, J. XIE und W. DOWHAN (2005). *Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM(TM)): Application to lipid-specific membrane protein topogenesis*. Methods (San Diego, Calif.), 36(2):148–171.
- BORGSTAHL, G. E., D. R. WILLIAMS und E. D. GETZOFF (1995). *1.4 A structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore*. Biochemistry, 34(19):6278–6287.
- BOURRET, R. B., K. A. BORKOVICH und M. I. SIMON (1991). *Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes*. Annual Review of Biochemistry, 60:401–441.
- BRAUN, P. und G. VON HEIJNE (1999). *The aromatic residues Trp and Phe have different effects on the positioning of a transmembrane helix in the microsomal membrane*. Biochemistry, 38(30):9778–9782.
- BUENO, EMILIO, S. MESA, E. J. BEDMAR, D. J. RICHARDSON und M. J. DELGADO (2012). *Bacterial Adaptation of Respiration from Oxic to Microoxic and Anoxic Conditions: Redox Control*. Antioxidants & Redox Signaling, 16(8):819–852.
- BUSCH, ANDREAS, M.-E. GUAZZARONI, J. LACAL, J. L. RAMOS und T. KRELL (2009). *The Sensor Kinase TodS Operates by a Multiple Step Phosphorelay Mechanism Involving Two Autokinase Domains*. The Journal of Biological Chemistry, 284(16):10353–10360.
- BUSCH, ANDREAS, J. LACAL, A. MARTOS, J. L. RAMOS und T. KRELL (2007). *Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(34):13774–13779.
- CADWELL, R. C. und G. F. JOYCE (1992). *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. PCR methods and applications, 2(1):28–33.

- CAMPBELL, ASHARIE J., K. J. WATTS, M. S. JOHNSON und B. L. TAYLOR (2010). *Gain-of-function mutations cluster in distinct regions associated with the signalling pathway in the PAS domain of the aerotaxis receptor, Aer*. *Molecular Microbiology*, 77(3):575–586.
- CARD, PAUL B., P. J. A. ERBEL und K. H. GARDNER (2005). *Structural basis of ARNT PAS-B dimerization: use of a common beta-sheet interface for hetero- and homodimerization*. *Journal of Molecular Biology*, 353(3):664–677.
- CASINO, PATRICIA, V. RUBIO und A. MARINA (2009). *Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction*. *Cell*, 139(2):325–336.
- CAVICCHIOLI, R., R. C. CHIANG, L. V. KALMAN und R. P. GUNSALUS (1996). *Role of the periplasmic domain of the Escherichia coli NarX sensor-transmitter protein in nitrate-dependent signal transduction and gene regulation*. *Molecular Microbiology*, 21(5):901–911.
- CHEN, XIN, S. SCHAUDER, N. POTIER, A. VAN DORSSELAER, I. PELCZER, B. L. BASSLER und F. M. HUGHSON (2002). *Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron*. *Nature*, 415(6871):545–549.
- CHERVITZ, S. A. und J. J. FALKE (1995). *Lock on/off disulfides identify the transmembrane signaling helix of the aspartate receptor*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(41):24043–24053.
- CHERVITZ, S. A. und J. J. FALKE (1996). *Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6):2545–2550.
- CHEUNG, JONAH und W. A. HENDRICKSON (2008). *Crystal Structures of C4-Dicarboxylate Ligand Complexes with Sensor Domains of Histidine Kinases DcuS and DctB*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(44):30256–30265.
- CHEUNG, JONAH und W. A. HENDRICKSON (2009). *Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX*. *Structure (London, England: 1993)*, 17(2):190–201.

- COCK, PETER J. A. und D. E. WHITWORTH (2007). *Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions*. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11):2355–2357.
- CONRAD, KAREN S., A. M. BILWES und B. R. CRANE (2013). *Light-Induced Subunit Dissociation by a LOV domain Photoreceptor from Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*, 52(2):378–391.
- CROSSON, SEAN, S. RAJAGOPAL und K. MOFFAT (2003). *The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains*. *Biochemistry*, 42(1):2–10.
- DAGO, ANGEL E., A. SCHUG, A. PROCACCINI, J. A. HOCH, M. WEIGT und H. SZURMANT (2012). *Structural basis of histidine kinase autophosphorylation deduced by integrating genomics, molecular dynamics, and mutagenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26):E1733–E1742.
- DAVIES, S. J., P. GOLBY, D. OMRANI, S. A. BROAD, V. L. HARRINGTON, J. R. GUEST, D. J. KELLY und S. C. ANDREWS (1999). *Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(18):5624–5635.
- DAVISON, S. C. und E. D. WILLS (1974). *Studies on the lipid composition of the rat liver endoplasmic reticulum after induction with phenobarbitone and 20-methylcholanthrene*. *The Biochemical Journal*, 140(3):461–468.
- DEGREIF-DÜNNWALD, PIA (2011). *PAS<sub>c</sub> als signaltransduzierende Domäne des Sensorproteins DcuS von Escherichia coli* .. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([urn:nbn:de:hebis:77-28844](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-28844)).
- DJORDJEVIC, SNEZANA, P. N. GOUDREAU, Q. XU, A. M. STOCK und A. H. WEST (1998). *Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4):1381–1386.
- DOWHAN, W. (1997). *Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?*. *Annual Review of Biochemistry*, 66:199–232.

- DRAHEIM, ROGER R., A. F. BORMANS, R.-Z. LAI und M. D. MANSON (2005). *Tryptophan residues flanking the second transmembrane helix (TM2) set the signaling state of the Tar chemoreceptor*. *Biochemistry*, 44(4):1268–1277.
- DRAHEIM, ROGER R., A. F. BORMANS, R.-Z. LAI und M. D. MANSON (2006). *Tuning a bacterial chemoreceptor with protein-membrane interactions*. *Biochemistry*, 45(49):14655–14664.
- EISENBACH, M. (1996). *Control of bacterial chemotaxis*. *Molecular Microbiology*, 20(5):903–910.
- ENGEL, P., R. KRÄMER und G. UNDEN (1992). *Anaerobic fumarate transport in Escherichia coli by an fnr-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system*. *Journal of Bacteriology*, 174(17):5533–5539.
- ENGEL, P., R. KRÄMER und G. UNDEN (1994). *Transport of C<sub>4</sub>-dicarboxylates by anaerobically grown Escherichia coli. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 222(2):605–614.
- ERBEL, PAUL J. A., P. B. CARD, O. KARAKUZU, R. K. BRUICK und K. H. GARDNER (2003). *Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26):15504–15509.
- ESCHERICH, THEODOR (1886). *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*. Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart.
- ETZKORN, MANUEL, H. KNEUPER, P. DÜNNWALD, V. VIJAYAN, J. KRÄMER, C. GRIESINGER, S. BECKER, G. UNDEN und M. BALDUS (2008). *Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(10):1031–1039.
- FALKE, J. J., A. F. DERNBURG, D. A. STERNBERG, N. ZALKIN, D. L. MILLIGAN und D. E. KOSHLAND (1988). *Structure of a bacterial sensory receptor. A site-directed sulfhydryl study*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(29):14850–14858.
- FALKE, J. J. und D. E. KOSHLAND (1987). *Global flexibility in a sensory receptor: a site-directed cross-linking approach*. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4822):1596–1600.

- FALKE, JOSEPH J. und A. H. ERBSE (2009). *The Piston Rises Again*. Structure (London, England : 1993), 17(9):1149–1151.
- FALKE, JOSEPH J. und G. L. HAZELBAUER (2001). *Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors*. Trends in biochemical sciences, 26(4):257–265.
- FINN, ROBERT D., J. MISTRY, B. SCHUSTER-BÖCKLER, S. GRIFFITHS-JONES, V. HOLLICH, T. LASSMANN, S. MOXON, M. MARSHALL, A. KHANNA, R. DURBIN, S. R. EDDY, E. L. L. SONNHAMMER und A. BATEMAN (2006). *Pfam: clans, web tools and services*. Nucleic Acids Research, 34(Database issue):D247–251.
- FUCHS, GEORG, Hrsg. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*, Bd. 8., vollst. überarb. und erw. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- GALPERIN, M. Y., A. N. NIKOLSKAYA und E. V. KOONIN (2001). *Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems*. FEMS microbiology letters, 203(1):11–21.
- GAO, RONG und A. M. STOCK (2009). *Biological insights from structures of two-component proteins*. Annual Review of Microbiology, 63:133–154.
- GILLES-GONZALEZ, M. A. und G. GONZALEZ (1993). *Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of Rhizobium meliloti*. The Journal of Biological Chemistry, 268(22):16293–16297.
- GOH, EE-BEEN, P. J. BLEDSOE, L.-L. CHEN, P. GYANESHWAR, V. STEWART und M. M. IGO (2005). *Hierarchical Control of Anaerobic Gene Expression in Escherichia coli K-12: the Nitrate-Responsive NarX-NarL Regulatory System Represses Synthesis of the Fumarate-Responsive DcuS-DcuR Regulatory System*. Journal of Bacteriology, 187(14):4890–4899.
- GOLBY, P., S. DAVIES, D. J. KELLY, J. R. GUEST und S. C. ANDREWS (1999). *Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C<sub>4</sub>-dicarboxylates in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 181(4):1238–1248.
- GOLBY, P., D. J. KELLY, J. R. GUEST und S. C. ANDREWS (1998). *Transcriptional regulation and organization of the dcuA and dcuB genes, encoding homologous*

- anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transporters in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 180(24):6586–6596.
- GREBE, T. W. und J. B. STOCK (1999). *The histidine protein kinase superfamily*. Advances in Microbial Physiology, 41:139–227.
- GRIFFITH, KEVIN L. und R. E. WOLF (2002). *Measuring beta-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 290(1):397–402.
- GROSS, R., B. ARICÒ und R. RAPPUOLI (1989). *Families of bacterial signal-transducing proteins*. Molecular Microbiology, 3(11):1661–1667.
- GUMBART, JAMES C., B. ROUX und C. CHIPOT (2013). *Standard binding free energies from computer simulations: What is the best strategy?*. Journal of chemical theory and computation, 9(1):794–802.
- GUNSALUS, R P (1992). *Control of electron flow in Escherichia coli: coordinated transcription of respiratory pathway genes..* Journal of Bacteriology, 174(22):7069–7074.
- GUTOWSKI, S. J. und H. ROSENBERG (1975). *Succinate uptake and related proton movements in Escherichia coli K12*. The Biochemical Journal, 152(3):647–654.
- HARRISON, S. C. (1991). *A structural taxonomy of DNA-binding domains*. Nature, 353(6346):715–719.
- HEDIN, LINNEA E., K. ILLERGÅRD und A. ELOFSSON (2011). *An introduction to membrane proteins*. Journal of Proteome Research, 10(8):3324–3331.
- HEFTI, MARCO H., K.-J. FRANÇOIS, S. C. DE VRIES, R. DIXON und J. VERVOORT (2004). *The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction*. European journal of biochemistry / FEBS, 271(6):1198–1208.
- HESSA, TARA, H. KIM, K. BIHLMAIER, C. LUNDIN, J. BOEKEL, H. ANDERSSON, I. NILSSON, S. H. WHITE und G. VON HEIJNE (2005). *Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon*. Nature, 433(7024):377–381.
- HESSA, TARA, N. M. MEINDL-BEINKER, A. BERNSEL, H. KIM, Y. SATO, M. LERCH-BADER, I. NILSSON, S. H. WHITE und G. VON HEIJNE (2007). *Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon*. Nature, 450(7172):1026–1030.

- HO, Y. S., L. M. BURDEN und J. H. HURLEY (2000). *Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor*. The EMBO journal, 19(20):5288–5299.
- HOFFMAN, E. C., H. REYES, F. F. CHU, F. SANDER, L. H. CONLEY, B. A. BROOKS und O. HANKINSON (1991). *Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor*. Science (New York, N.Y.), 252(5008):954–958.
- HUGHSON, A. G. und G. L. HAZELBAUER (1996). *Detecting the conformational change of transmembrane signaling in a bacterial chemoreceptor by measuring effects on disulfide cross-linking in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(21):11546–11551.
- JANAUSCH, I. G., O. B. KIM und G. UNDEN (2001). *DctA- and Dcu-independent transport of succinate in Escherichia coli: contribution of diffusion and of alternative carriers*. Archives of Microbiology, 176(3):224–230.
- JANAUSCH, I. G., E. ZIENTZ, Q. H. TRAN, A. KRÖGER und G. UNDEN (2002a). *C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1553(1-2):39–56.
- JANAUSCH, INGO G. (2001). *Rekonstitution des Fumaratsensors DcuS in Liposomen und Transport von Fumarat und Succinat in Escherichia coli*. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([urn:nbn:de:hebis:77-2654](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-2654)).
- JANAUSCH, INGO G., I. GARCIA-MORENO, D. LEHNEN, Y. ZEUNER und G. UNDEN (2004). *Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of Escherichia coli*. Microbiology (Reading, England), 150(Pt 4):877–883.
- JANAUSCH, INGO G., I. GARCIA-MORENO und G. UNDEN (2002b). *Function of DcuS from Escherichia coli as a fumarate-stimulated histidine protein kinase in vitro*. The Journal of Biological Chemistry, 277(42):39809–39814.
- JANAUSCH, NULL und N. UNDEN (1999). *The dcuD (former yhcL) gene product of escherichia coli as a member of the DcuC family of C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers: lack of evident expression*. Archives of Microbiology, 172(4):219–226.

- JIANG, PENG und A. J. NINFA (1999). *Regulation of Autophosphorylation of Escherichia coli Nitrogen Regulator II by the PII Signal Transduction Protein*. Journal of Bacteriology, 181(6):1906–1911.
- JOURLIN, C., A. BENGRINE, M. CHIPPAUX und V. MÉJEAN (1996). *An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 20(6):1297–1306.
- KAPER, JAMES B., J. P. NATARO und H. L. MOBLEY (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. Nature Reviews. Microbiology, 2(2):123–140.
- KARIMOVA, G., J. PIDOUX, A. ULLMANN und D. LADANT (1998). *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(10):5752–5756.
- KARIMOVA, GOUZEL, N. DAUTIN und D. LADANT (2005). *Interaction network among Escherichia coli membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis*. Journal of Bacteriology, 187(7):2233–2243.
- KARINOU, ELENI, E. L. R. COMPTON, M. MOREL und A. JAVELLE (2013). *The Escherichia coli SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter*. Molecular Microbiology, 87(3):623–640.
- KARLIN, A. und M. H. AKABAS (1998). *Substituted-cysteine accessibility method*. Methods in Enzymology, 293:123–145.
- KASPAR, S., R. PEROZZO, S. REINELT, M. MEYER, K. PFISTER, L. SCAPOZZA und M. BOTT (1999). *The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor*. Molecular Microbiology, 33(4):858–872.
- KASPAR, SIBYLLE und M. BOTT (2002). *The sensor kinase CitA (DpiB) of Escherichia coli functions as a high-affinity citrate receptor*. Archives of Microbiology, 177(4):313–321.
- KAY, W. W. und H. L. KORNBERG (1971). *The uptake of C4-dicarboxylic acids by Escherichia coli*. European journal of biochemistry / FEBS, 18(2):274–281.
- KENNEY, L. J. (1997). *Kinase activity of EnvZ, an osmoregulatory signal transducing protein of Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 346(2):303–311.

- KEOHAVONG, P. und W. G. THILLY (1989). *Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86(23):9253–9257.
- KEY, JASON, M. HEFTI, E. B. PURCELL und K. MOFFAT (2007). *Structure of the redox sensor domain of Azotobacter vinelandii NifL at atomic resolution: signaling, dimerization, and mechanism*. Biochemistry, 46(12):3614–3623.
- KILLIAN, J. A. und G. VON HEIJNE (2000). *How proteins adapt to a membrane-water interface*. Trends in Biochemical Sciences, 25(9):429–434.
- KIM, OK BIN, S. LUX und G. UNDEN (2007). *Anaerobic growth of Escherichia coli on D-tartrate depends on the fumarate carrier DcuB and fumarase, rather than the L-tartrate carrier TtdT and L-tartrate dehydratase*. Archives of Microbiology, 188(6):583–589.
- KIM, OK BIN, J. REIMANN, H. LUKAS, U. SCHUMACHER, J. GRIMPO, P. DÜNNWALD und G. UNDEN (2009). *Regulation of tartrate metabolism by TtdR and relation to the DcuS-DcuR-regulated C4-dicarboxylate metabolism of Escherichia coli*. Microbiology (Reading, England), 155(Pt 11):3632–3640.
- KIM, OK BIN und G. UNDEN (2007). *The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 189(5):1597–1603.
- KLEEFELD, ALEXANDRA (2006). *Der Carrier DcuB als zweiter Sensor des Zweikomponentensystems DcuSR in Escherichia coli ..* Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([urn:nbn:de:hebis:77-11665](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-11665)).
- KLEEFELD, ALEXANDRA, B. ACKERMANN, J. BAUER, J. KRÄMER und G. UNDEN (2009). *The fumarate/succinate antiporter DcuB of Escherichia coli is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression*. The Journal of Biological Chemistry, 284(1):265–275.
- KNEUPER, H., P. D. SCHEU, M. ETZKORN, M. SEVVANA, P. DÜNNWALD, S. BECKER, M. BALDUS, C. GRIESINGER und G. UNDEN (2010). *Sensing Ligands by Periplasmic Sensing Histidine Kinases with Sensory PAS Domains*. In: SPIRO, S. und R. DIXON,

- Hrsg.: *Sensory Mechanisms in Bacteria*, Kap. 2. Caister Academic Press, Norfolk.  
Horizon Press.
- KNEUPER, HOLGER (2005). *Struktur- und Funktionsuntersuchungen des C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Sensors DcuS von Escherichia coli* .. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([urn:nbn:de:hebis:77-8888](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-8888)).
- KNEUPER, HOLGER, I. G. JANASCH, V. VIJAYAN, M. ZWECKSTETTER, V. BOCK, C. GRIESINGER und G. UNDEN (2005). *The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21):20596–20603.
- KRELL, TINO, J. LACAL, A. BUSCH, H. SILVA-JIMÉNEZ, M.-E. GUAZZARONI und J. L. RAMOS (2010). *Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals*. *Annual Review of Microbiology*, 64:539–559.
- KRÄMER, J., J. D. FISCHER, E. ZIENTZ, V. VIJAYAN, C. GRIESINGER, A. LUPAS und G. UNDEN (2007). *Citrate sensing by the C<sub>4</sub>-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of Escherichia coli: binding site and conversion of DcuS to a C<sub>4</sub>-dicarboxylate- or citrate-specific sensor*. *Journal of Bacteriology*, 189(11):4290–4298.
- KRÄMER, JENS (2008). *Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat- und Citratsensor DcuS aus Escherichia coli - Signalerkennung und Regulation*.. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([urn:nbn:de:hebis:77-16453](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-16453)).
- KWON, O., D. GEORGELLIS und E. C. LIN (2000). *Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(13):3858–3862.
- KYTE, J. und R. F. DOOLITTLE (1982). *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105–132.
- LACAL, JESÚS, A. BUSCH, M.-E. GUAZZARONI, T. KRELL und J. L. RAMOS (2006). *The TodS-TodT two-component regulatory system recognizes a wide range of effectors and works with DNA-bending proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21):8191–8196.

- LAEMMLI, U. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227(5259):680–685.
- LAI, WING-CHEUNG, M. L. PEACH, T. P. LYBRAND und G. L. HAZELBAUER (2006). *Diagnostic cross-linking of paired cysteine pairs demonstrates homologous structures for two chemoreceptor domains with low sequence identity*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 15(1):94–101.
- LAU, P. C., Y. WANG, A. PATEL, D. LABBÉ, H. BERGERON, R. BROUSSEAU, Y. KONISHI und M. RAWLINGS (1997). *A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4):1453–1458.
- LEE, ANGELA I., A. DELGADO und R. P. GUNSALUS (1999). *Signal-Dependent Phosphorylation of the Membrane-Bound NarX Two-Component Sensor-Transmitter Protein of Escherichia coli: Nitrate Elicits a Superior Anion Ligand Response Compared to Nitrite*. *Journal of Bacteriology*, 181(17):5309–5316.
- LEE, G. F. und G. L. HAZELBAUER (1995). *Quantitative approaches to utilizing mutational analysis and disulfide crosslinking for modeling a transmembrane domain*. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(6):1100–1107.
- LEE, G. F., M. R. LEBERT, A. A. LILLY und G. L. HAZELBAUER (1995). *Transmembrane signaling characterized in bacterial chemoreceptors by using sulfhydryl cross-linking in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8):3391–3395.
- LEE, JAMES, D. R. TOMCHICK, C. A. BRAUTIGAM, M. MACHUIS, R. KORT, K. J. HELLINGWERF und K. H. GARDNER (2008). *Changes at the KinA PAS-A dimerization interface influence histidine kinase function*. *Biochemistry*, 47(13):4051–4064.
- LEMMIN, THOMAS, C. S. SOTO, G. CLINTHORNE, W. F. DEGRADO und M. DAL PERARO (2013). *Assembly of the Transmembrane Domain of E. coli PhoQ Histidine Kinase: Implications for Signal Transduction from Molecular Simulations*. *PLoS Computational Biology*, 9(1).
- LEWIS, R. J., J. A. BRANNIGAN, K. MUCHOVÁ, I. BARÁK und A. J. WILKINSON (1999). *Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein*. *Journal of Molecular Biology*, 294(1):9–15.

- LI, LIBO, I. VOROBYOV und T. W. ALLEN (2013). *The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes*. The Journal of Physical Chemistry. B, 117(40):11906–11920.
- LITTLE, RICHARD, P. SLAVNY und R. DIXON (2012). *Influence of PAS domain flanking regions on oligomerisation and redox signalling by NifL*. PloS One, 7(10):e46651.
- LOIS, A. F., M. WEINSTEIN, G. S. DITTA und D. R. HELINSKI (1993). *Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of Rhizobium meliloti are coordinately regulated by oxygen*. The Journal of Biological Chemistry, 268(6):4370–4375.
- LUKAT, G. S., A. M. STOCK und J. B. STOCK (1990). *Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis*. Biochemistry, 29(23):5436–5442.
- MACCALLUM, JUSTIN L., W. F. D. BENNETT und D. P. TIELEMAN (2008). *Distribution of Amino Acids in a Lipid Bilayer from Computer Simulations*. Biophysical Journal, 94(9):3393–3404.
- MANTING, E. H. und A. J. DRIESSEN (2000). *Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine*. Molecular Microbiology, 37(2):226–238.
- MARINA, ALBERTO, C. D. WALDBURGER und W. A. HENDRICKSON (2005). *Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein*. The EMBO journal, 24(24):4247–4259.
- MARTINEZ-ARGUDO, ISABEL, R. LITTLE, N. SHEARER, P. JOHNSON und R. DIXON (2004). *The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals*. Journal of Bacteriology, 186(3):601–610.
- MASCHER, THORSTEN (2013). *Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  factors*. Current Opinion in Microbiology, 16(2):148–155.
- MASCHER, THORSTEN, J. D. HELMANN und G. UNDEN (2006). *Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(4):910–938.

- MASCHER, THORSTEN, N. G. MARGULIS, T. WANG, R. W. YE und J. D. HELMANN (2003). *Cell wall stress responses in Bacillus subtilis: the regulatory network of the bacitracin stimulon*. *Molecular Microbiology*, 50(5):1591–1604.
- MELO, F. und E. FEYTMANS (1998). *Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy*. *Journal of Molecular Biology*, 277(5):1141–1152.
- MÖGLICH, ANDREAS, R. A. AYERS und K. MOFFAT (2010). *Addition at the molecular level: signal integration in designed Per-ARNT-Sim receptor proteins*. *Journal of Molecular Biology*, 400(3):477–486.
- MÖGLICH, ANDREAS und K. MOFFAT (2007). *Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA*. *Journal of Molecular Biology*, 373(1):112–126.
- MILLER, AARON S. und J. J. FALKE (2004). *Side chains at the membrane-water interface modulate the signaling state of a transmembrane receptor*. *Biochemistry*, 43(7):1763–1770.
- MILLER, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MILLIGAN, D. L. und D. E. KOSHLAND (1988). *Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(13):6268–6275.
- MIROUX, B. und J. E. WALKER (1996). *Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels*. *Journal of Molecular Biology*, 260(3):289–298.
- MIZUNO, T. (1997). *Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of Escherichia coli*. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 4(2):161–168.
- MÜLLER, MIRIAM (2007). *Funktionskomplementierung des Fumaratsensors DcuS von Escherichia coli durch Hybriddimere*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- MÖGLICH, ANDREAS, R. A. AYERS und K. MOFFAT (2009). *Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains*. Structure (London, England: 1993), 17(10):1282–1294.
- MOLNAR, KATHLEEN S., M. BONOMI, R. PELLARIN, G. D. CLINTHORNE, G. GONZALEZ, S. D. GOLDBERG, M. GOULIAN, A. SALI und W. F. DEGRADO (2014). *Cys-Scanning Disulfide Crosslinking and Bayesian Modeling Probe the Transmembrane Signaling Mechanism of the Histidine Kinase, PhoQ*. Structure (London, England: 1993), 22(9):1239–1251.
- MONZEL, CHRISTIAN, P. DEGREIF-DÜNNWALD, C. GRÖPPER, C. GRIESINGER und G. UNDEN (2013). *The cytoplasmic PASC domain of the sensor kinase DcuS of Escherichia coli: role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction*. MicrobiologyOpen, 2(6):912–927.
- MOORE, JASON O. und W. A. HENDRICKSON (2009). *Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS*. Structure (London, England: 1993), 17(9):1195–1204.
- MOORE, JASON O. und W. A. HENDRICKSON (2012). *An asymmetry-to-symmetry switch in signal transmission by the histidine kinase receptor for TMAO*. Structure (London, England: 1993), 20(4):729–741.
- NAMBU, J. R., J. O. LEWIS, K. A. WHARTON und S. T. CREWS (1991). *The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development*. Cell, 67(6):1157–1167.
- NEIDITCH, MATTHEW B., M. J. FEDERLE, A. J. POMPEANI, R. C. KELLY, D. L. SWEM, P. D. JEFFREY, B. L. BASSLER und F. M. HUGHSON (2006). *Ligand-Induced Asymmetry in Histidine Sensor Kinase Complex Regulates Quorum Sensing*. Cell, 126(6):1095–1108.
- NINFA, A. J. und B. MAGASANIK (1986). *Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(16):5909–5913.

- NINFA, E. G., A. STOCK, S. MOWBRAY und J. STOCK (1991). *Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components*. The Journal of Biological Chemistry, 266(15):9764–9770.
- NIXON, B T, C. W. RONSON und F. M. AUSUBEL (1986). *Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(20):7850–7854.
- NORMAN, KRISTEN E. und H. NYMEYER (2006). *Indole Localization in Lipid Membranes Revealed by Molecular Simulation*. Biophysical Journal, 91(6):2046–2054.
- OHLSEN, K. L., J. K. GRIMSLEY und J. A. HOCH (1994). *Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(5):1756–1760.
- OJEMALM, KARIN, S. C. BOTELHO, C. STÜDLE und G. VON HEIJNE (2013). *Quantitative analysis of SecYEG-mediated insertion of transmembrane  $\alpha$ -helices into the bacterial inner membrane*. Journal of Molecular Biology, 425(15):2813–2822.
- OTTEMANN, K. M., W. XIAO, Y. K. SHIN und D. E. KOSHLAND (1999). *A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor*. Science (New York, N.Y.), 285(5434):1751–1754.
- OYAMADA, TOMOYA, K. YOKOYAMA, M. MORINAGA, M. SUZUKI und K. MAKINO (2007). *Expression of Escherichia coli DcuS-R two-component regulatory system is regulated by the secondary internal promoter which is activated by CRP-cAMP*. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 45(3):234–240.
- PAKULA, A A und M. I. SIMON (1992). *Determination of transmembrane protein structure by disulfide cross-linking: the Escherichia coli Tar receptor.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(9):4144–4148.
- PAPPALARDO, LUCIA, I. G. JANAUSCH, V. VIJAYAN, E. ZIENTZ, J. JUNKER, W. PETTI, M. ZWECKSTETTER, G. UNDEN und C. GRIESINGER (2003). *The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry, 278(40):39185–39188.

- PARKINSON, JOHN S. (2010). *Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases*. Annual Review of Microbiology, 64:101–122.
- PEÑA-SANDOVAL, GABRIELA R. und D. GEORGELLIS (2010). *The ArcB sensor kinase of Escherichia coli autophosphorylates by an intramolecular reaction*. Journal of Bacteriology, 192(6):1735–1739.
- PEREGO, M., C. HANSTEIN, K. M. WELSH, T. DJAVAKHISHVILI, P. GLASER und J. A. HOCH (1994). *Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in B. subtilis*. Cell, 79(6):1047–1055.
- PETTERSEN, ERIC F., T. D. GODDARD, C. C. HUANG, G. S. COUCH, D. M. GREENBLATT, E. C. MENG und T. E. FERRIN (2004). *UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis*. Journal of Computational Chemistry, 25(13):1605–1612.
- PLANQUE, MAURITS R. R. DE, B. B. BONEV, J. A. A. DEMMERS, D. V. GREATHOUSE, R. E. KOEPPE, F. SEPAROVIC, A. WATTS und J. A. KILLIAN (2003). *Interfacial anchor properties of tryptophan residues in transmembrane peptides can dominate over hydrophobic matching effects in peptide-lipid interactions*. Biochemistry, 42(18):5341–5348.
- PONTING, C. P. und L. ARAVIND (1997). *PAS: a multifunctional domain family comes to light*. Current biology: CB, 7(11):R674–677.
- POPOT, J. L. und M. SARASTE (1995). *Engineering membrane proteins*. Current Opinion in Biotechnology, 6(4):394–402.
- POS, K. M., P. DIMROTH und M. BOTT (1998). *The Escherichia coli citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts*. Journal of Bacteriology, 180(16):4160–4165.
- RAPOPORT, TOM A. (2007). *Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes*. Nature, 450(7170):663–669.
- ROUX, BENOIT (2007). *Lonely Arginine Seeks Friendly Environment*. The Journal of General Physiology, 130(2):233–236.

- RUSS, W. P. und D. M. ENGELMAN (2000). *The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association*. Journal of Molecular Biology, 296(3):911–919.
- SAMBROOK, J. und D. W. RUSSELL (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed.*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHEU, P. D., J. WITAN, M. RAUSCHMEIER, S. GRAF, Y.-F. LIAO, A. EBERT-JUNG, T. BASCHÉ, W. ERKER und G. UNDEN (2012). *CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in Escherichia coli and its relation to the DcuS/DcuR system in vivo*. Journal of Bacteriology, 194(3):636–645.
- SCHEU, PATRICK, S. SDORRA, Y.-F. LIAO, M. WEGNER, T. BASCHÉ, G. UNDEN und W. ERKER (2008). *Polar accumulation of the metabolic sensory histidine kinases DcuS and CitA in Escherichia coli*. Microbiology (Reading, England), 154(Pt 8):2463–2472.
- SCHEU, PATRICK D., O. B. KIM, C. GRIESINGER und G. UNDEN (2010a). *Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: exogenous versus endogenous sensing of C(4)-dicarboxylates in bacteria*. Future Microbiology, 5(9):1383–1402.
- SCHEU, PATRICK D., Y.-F. LIAO, J. BAUER, H. KNEUPER, T. BASCHÉ, G. UNDEN und W. ERKER (2010b). *Oligomeric sensor kinase DcuS in the membrane of Escherichia coli and in proteoliposomes: chemical cross-linking and FRET spectroscopy*. Journal of Bacteriology, 192(13):3474–3483.
- SCHIFFER, M., C. H. CHANG und F. J. STEVENS (1992). *The functions of tryptophan residues in membrane proteins*. Protein Engineering, 5(3):213–214.
- SCHNEITER, ROGER und A. TOULMAY (2007). *The role of lipids in the biogenesis of integral membrane proteins*. Applied Microbiology and Biotechnology, 73(6):1224–1232.
- SEVVANA, MADHUMATI, V. VIJAYAN, M. ZWECKSTETTER, S. REINELT, D. R. MADDEN, R. HERBST-IRMER, G. M. SHELDRIK, M. BOTT, C. GRIESINGER und S. BECKER (2008). *A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA*. Journal of Molecular Biology, 377(2):512–523.
- SIEVERS, FABIAN, A. WILM, D. DINEEN, T. J. GIBSON, K. KARPLUS, W. LI, R. LOPEZ, H. MCWILLIAM, M. REMMERT, J. SÖDING, J. D. THOMPSON und D. G.

- HIGGINS (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. *Molecular Systems Biology*, 7:539.
- SILHAVY, T. J., M. L. BERMAN und L. W. ENQUIST (1984). *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- SIX, S., S. C. ANDREWS, G. UNDEN und J. R. GUEST (1994). *Escherichia coli possesses two homologous anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct)*. *Journal of Bacteriology*, 176(21):6470–6478.
- SLAVNY, PETER, R. LITTLE, P. SALINAS, T. A. CLARKE und R. DIXON (2010). *Quaternary structure changes in a second Per-Arnt-Sim domain mediate intramolecular redox signal relay in the NifL regulatory protein*. *Molecular Microbiology*, 75(1):61–75.
- SMITH, ADAM W. (2012). *Lipid-protein interactions in biological membranes: a dynamic perspective*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818(2):172–177.
- SPARKS, KELSEY A., N. J. GLEASON, R. GIST, R. LANGSTON, D. V. GREATHOUSE und R. E. KOEPPE (2014). *Comparisons of interfacial Phe, Tyr, and Trp residues as determinants of orientation and dynamics for GWALP transmembrane peptides*. *Biochemistry*, 53(22):3637–3645.
- SPIRO, S. und J. R. GUEST (1990). *FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 6(4):399–428.
- STEINMETZ, PHILIPP A. (2010). *Die Transmembrandomäne des C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Sensors DcuS aus Escherichia coli*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- STEINMETZ, PHILIPP A. (2014). *Signalerkennung und Signaltransduktion im DctA/DcuS-Sensor-Regulatorkomplex von Escherichia coli*. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([ArchiMeD](#)).
- STEINMETZ, PHILIPP ALOYSIUS, S. WÖRNER und G. UNDEN (2014). *Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of Escherichia coli: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C<sub>4</sub>-dicarboxylate sensor*. *Molecular Microbiology*.

- STEWART, R. C. (1993). *Activating and inhibitory mutations in the regulatory domain of CheB, the methylesterase in bacterial chemotaxis*. The Journal of Biological Chemistry, 268(3):1921–1930.
- STEWART, RICHARD C. (2010). *Protein Histidine Kinases: Assembly of Active Sites and Their Regulation in Signaling Pathways*. Current opinion in microbiology, 13(2):133–141.
- STEWART, V. (2003). *Biochemical Society Special Lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria*. Biochemical Society Transactions, 31(Pt 1):1–10.
- STOCK, A, T. CHEN, D. WELSH und J. STOCK (1988). *CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions..* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(5):1403–1407.
- STOCK, A. M., V. L. ROBINSON und P. N. GOUDREAU (2000). *Two-component signal transduction*. Annual Review of Biochemistry, 69:183–215.
- STOCK, ANN M. (2006). *Transmembrane signaling by asymmetry*. Nature Structural & Molecular Biology, 13(10):862–863.
- STUDIER, F. W. und B. A. MOFFATT (1986). *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. Journal of Molecular Biology, 189(1):113–130.
- SZURMANT, HENDRIK und J. A. HOCH (2013). *Statistical analyses of protein sequence alignments identify structures and mechanisms in signal activation of sensor histidine kinases*. Molecular microbiology, 87(4):707–712.
- TAYLOR, B. L. und I. B. ZHULIN (1999). *PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light*. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 63(2):479–506.
- ULRICH, LUKE E., E. V. KOONIN und I. B. ZHULIN (2005). *One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes*. Trends in Microbiology, 13(2):52–56.

- ULRICH, LUKE E. und I. B. ZHULIN (2010). *The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction*. Nucleic Acids Research, 38(Database issue):D401–D407.
- UNDEN, G., S. BECKER, J. BONGAERTS, G. HOLIGHAUS, J. SCHIRAWSKI und S. SIX (1995). *O<sub>2</sub>-sensing and O<sub>2</sub>-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria*. Archives of Microbiology, 164(2):81–90.
- UNDEN, GOTTFRIED und A. KLEEFELD (2004). *C<sub>4</sub>-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth*. EcoSal Plus.
- UNDEN, GOTTFRIED, P. A. STEINMETZ und P. DEGREIF-DÜNNWALD (2014). *The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of Escherichia coli and Salmonella enterica: Enzymes and Energetics*. EcoSal Plus.
- VARUGHESE, KOTTAYIL I., I. TSIGELNY und H. ZHAO (2006). *The crystal structure of beryllofluoride Spo0F in complex with the phosphotransferase Spo0B represents a phosphotransfer pretransition state*. Journal of Bacteriology, 188(13):4970–4977.
- WALLACE, B. J. und I. G. YOUNG (1977). *Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in Escherichia coli. Studies with a ubiA- menA- double quinone mutant*. Biochimica Et Biophysica Acta, 461(1):84–100.
- WANG, CHEN, J. SANG, J. WANG, M. SU, J. S. DOWNEY, Q. WU, S. WANG, Y. CAI, X. XU, J. WU, D. B. SENADHEERA, D. G. CVITKOVITCH, L. CHEN, S. D. GOODMAN und A. HAN (2013). *Mechanistic Insights Revealed by the Crystal Structure of a Histidine Kinase with Signal Transducer and Sensor Domains*. PLoS Biology, 11(2).
- WANG, YANRU, M. TOEI und M. FORGAC (2008). *Analysis of the membrane topology of transmembrane segments in the C-terminal hydrophobic domain of the yeast vacuolar ATPase subunit a (Vph1p) by chemical modification*. The Journal of Biological Chemistry, 283(30):20696–20702.
- WATTS, KYLIE J., M. S. JOHNSON und B. L. TAYLOR (2011). *Different Conformations of the Kinase-On and Kinase-Off Signaling States in the Aer HAMP Domain*. Journal of Bacteriology, 193(16):4095–4103.
- WELCH, M., N. CHINARDET, L. MOUREY, C. BIRCK und J. P. SAMAMA (1998). *Structure of the CheY-binding domain of histidine kinase CheA in complex with CheY*. Nature Structural Biology, 5(1):25–29.

- WELCH, M., K. OOSAWA, S. AIZAWA und M. EISENBACH (1993). *Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(19):8787–8791.
- WHITE, STEPHEN H. und G. VON HEIJNE (2008). *How translocons select transmembrane helices*. Annual Review of Biophysics, 37:23–42.
- WIENER, M. C. und S. H. WHITE (1992). *Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure*. Biophysical Journal, 61(2):434–447.
- WIMLEY, W. C. und S. H. WHITE (1996). *Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces*. Nature Structural Biology, 3(10):842–848.
- WITAN, JULIAN, J. BAUER, I. WITTIG, P. A. STEINMETZ, W. ERKER und G. UNDEN (2012a). *Interaction of the Escherichia coli transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units*. Molecular Microbiology, 85(5):846–861.
- WITAN, JULIAN, C. MONZEL, P. D. SCHEU und G. UNDEN (2012b). *The sensor kinase DcuS of Escherichia coli: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit*. Biological Chemistry, 393(11):1291–1297.
- WITAN, JULIAN R. (2012). *Funktion der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat-Transporter DctA und DcuB als Co-Sensoren von DcuS in Escherichia coli*. Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. ([urn:nbn:de:hebis:77-31616](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-31616)).
- WOLANIN, PETER M., D. J. WEBRE und J. B. STOCK (2003). *Mechanism of phosphatase activity in the chemotaxis response regulator CheY*. Biochemistry, 42(47):14075–14082.
- WÖRNER, SEBASTIAN (2013). *Substratspezifität des Sensors DcuS und der Transporter DcuB und DctA*. Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- WUICHET, KRISTIN, B. J. CANTWELL und I. B. ZHULIN (2010). *Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems*. Current Opinion in Microbiology, 13(2):219–225.

- XU, DONG und Y. ZHANG (2012). *Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field*. *Proteins*, 80(7):1715–1735.
- YAMADA, SEIJI und Y. SHIRO (2008). *Structural basis of the signal transduction in the two-component system*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 631:22–39.
- YAMADA, SEIJI, H. SUGIMOTO, M. KOBAYASHI, A. OHNO, H. NAKAMURA und Y. SHIRO (2009). *Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex*. *Structure (London, England: 1993)*, 17(10):1333–1344.
- YAMAMOTO, KANEYOSHI, K. HIRAO, T. OSHIMA, H. AIBA, R. UTSUMI und A. ISHIHAMA (2005). *Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2):1448–1456.
- YAMAMOTO, KANEYOSHI, F. MATSUMOTO, T. OSHIMA, N. FUJITA, N. OGASAWARA und A. ISHIHAMA (2008). *Anaerobic regulation of citrate fermentation by CitAB in Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(11):3011–3014.
- YANISCH-PERRON, C., J. VIEIRA und J. MESSING (1985). *Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors*. *Gene*, 33(1):103–119.
- YAO, XIAOLAN, M. K. ROSEN und K. H. GARDNER (2008). *Estimation of the available free energy in a LOV2-J alpha photoswitch*. *Nature Chemical Biology*, 4(8):491–497.
- YEH, J. I., H. P. BIEMANN, G. G. PRIVÉ, J. PANDIT, D. E. KOSHLAND und S. H. KIM (1996). *High-resolution structures of the ligand binding domain of the wild-type bacterial aspartate receptor*. *Journal of Molecular Biology*, 262(2):186–201.
- ZHOU, YAN-FENG, B. NAN, J. NAN, Q. MA, S. PANJIKAR, Y.-H. LIANG, Y. WANG und X.-D. SU (2008). *C4-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain*. *Journal of Molecular Biology*, 383(1):49–61.
- ZIENTZ, E., J. BONGAERTS und G. UNDEN (1998). *Fumarate regulation of gene expression in Escherichia coli by the DcuSR (dcuSR genes) two-component regulatory system*. *Journal of Bacteriology*, 180(20):5421–5425.

ZIENTZ, E., I. G. JANAUSCH, S. SIX und G. UNDEN (1999). *Functioning of DcuC as the C<sub>4</sub>-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 181(12):3716–3720.

ZIENTZ, E., S. SIX und G. UNDEN (1996). *Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport in Escherichia coli: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange*. Journal of Bacteriology, 178(24):7241–7247.

## A Anhang

### Anhang zu 3.2

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien sind zusammen mit ihrem Hersteller in Tab. 13 aufgelistet. Für komplexe Substanzen ist die Bestellnummer angegeben.

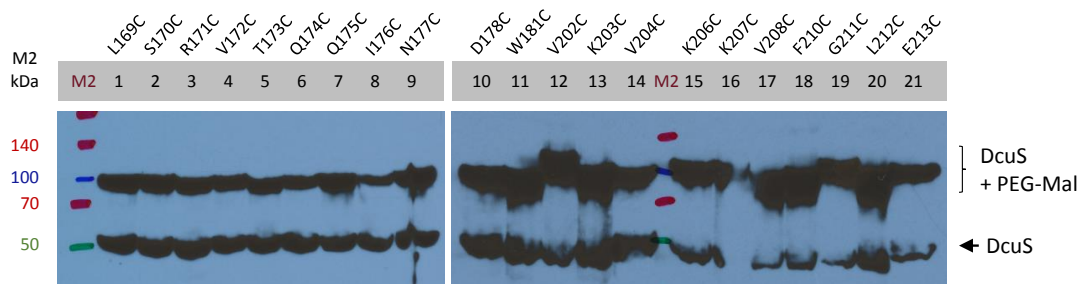
**Tab. 13:** Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Art. nr.
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth	
Agar-Agar, Kobe I	Roth	5210
Ammoniumchlorid	Fluka	
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	
Ampicillin Natriumsalz	Roth	
Bacto-Trypton	BD	211708
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Roth	8072
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich	
Bromphenolblau	AppliChem	
Calciumchlorid	AppliChem	
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Serva	
Chloramphenicol	Fluka	
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	
Dinatriumfumarat	Merck	
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth	
Dinatriumsuccinat	Roth	
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	
Ethanol	VWR Chemicals	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich	
$\alpha$ -D(+)-Glucose	Roth	
Glycerin	Roth	
Hefeextrakt	Roth	2363
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher	
Kaliumchlorid	Roth	
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	
Kanamycinsulfat	Roth	
LB-Medium (Lennox)	Roth	X964
Magnesiumsulfat	Roth	

Bezeichnung	Hersteller	Art. nr.
Magnesiumchlorid	Roth	
L-(-)-Malat	Fluka	
2-Mercaptoethanol	Roth	
Dinatriummaleinat	Sigma-Aldrich	
Methoxy-Polyethylenglykolmaleimid (PEG-Mal)	Sigma-Aldrich	712469
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth	
Natriumcarbonat	Roth	
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	
Natriumdesoxycholat	Fluka	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	
o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)	Roth	
3-Nitropropionsäure	Fluka	
1,10-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich	
Phenylbernsteinsäure	Sigma-Aldrich	
Polyethylenglycol (PEG) 6000	Roth	0158
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Roth	
Saccharose	Roth	
Salzsäure, > 37 %	Sigma-Aldrich	
Säurehydrolysiertes Casein (AHC)	Gibco	30392-021
SOB-Medium	Roth	AE27.1
Spectinomycin	Sigma-Aldrich	
Streptomycin	Sigma-Aldrich	
Tetracyclin Hydrochlorid	Merck	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth	
L-Tryptophan	Serva	
L-(+)-Weinsäure	Roth	

Anhang zu 4.1.1.1

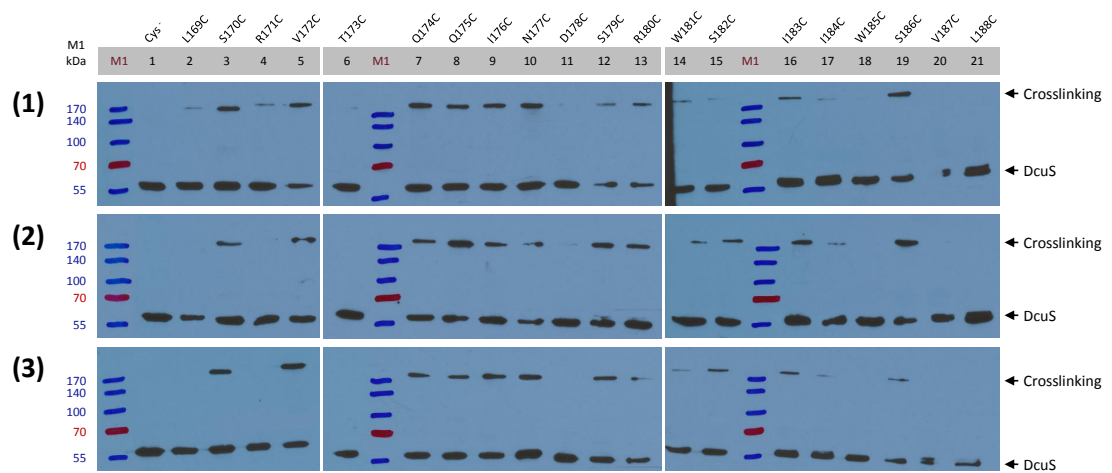
Markierungskontrollen zugänglicher Cysteinreste im Bereich der zweiten Transmembranhelix. Da die Maskierung durch NEM und damit die Zugänglichkeit von Cysteinresten nur indirekt durch das Fehlen einer hochmolekularen Bande erkannt wurde, sollte die grundsätzlich Markierbarkeit an diesen Positionen überprüft werden. Dazu wurde auf die Maskierung mit NEM verzichtet und stattdessen sofort solubilisiert und anschließend mit PEG-Mal markiert. Wie Abb. 73 zeigt, wurden für alle Cysteinreste zusätzliche Banden erhalten. Das Fehlen dieser Bande im SCAM-Experiment (Abb. 13) ist auf die Reaktion mit NEM zurückzuführen.



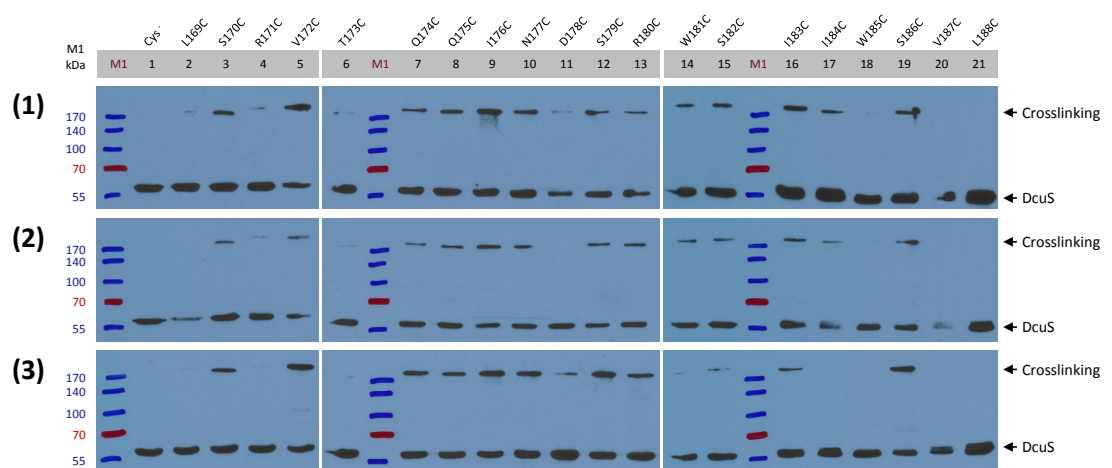
**Abb. 73:** Markierungskontrolle zugänglicher Cysteinreste im Bereich von TM2. Die Markierbarkeit von 21 zugänglichen Cysteinresten wurde durch Weglassen der NEM-Maskierung ermittelt, d.h. es wurde sofort solubilisiert und anschließend mit PEG-Mal markiert. M2: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder.

## Anhang zu 4.1.5.2

Das oxidative Cystein-Crosslinking wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die zur Auswertung der quantitativen Crosslinking-Effizienz (Abb. 57) verwendeten Blots sind in den Abb. 74 und 75 gezeigt.



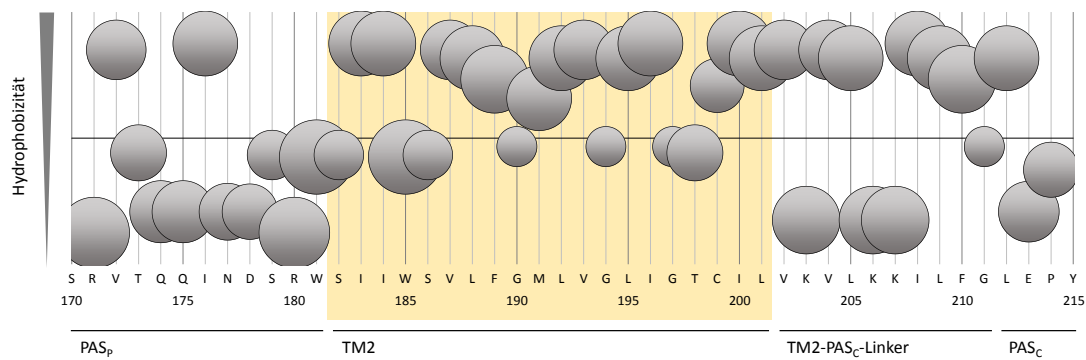
**Abb. 74:** Western-Blots zur quantitativen Auswertung des Cystein-Crosslinkings. Zucht und Cystein-Crosslinking ohne Fumarat. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.



**Abb. 75:** Western-Blots zur quantitativen Auswertung des Cystein-Crosslinkings. Zucht und Cystein-Crosslinking mit Fumarat. M1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Anhang zu 4.1.5.2

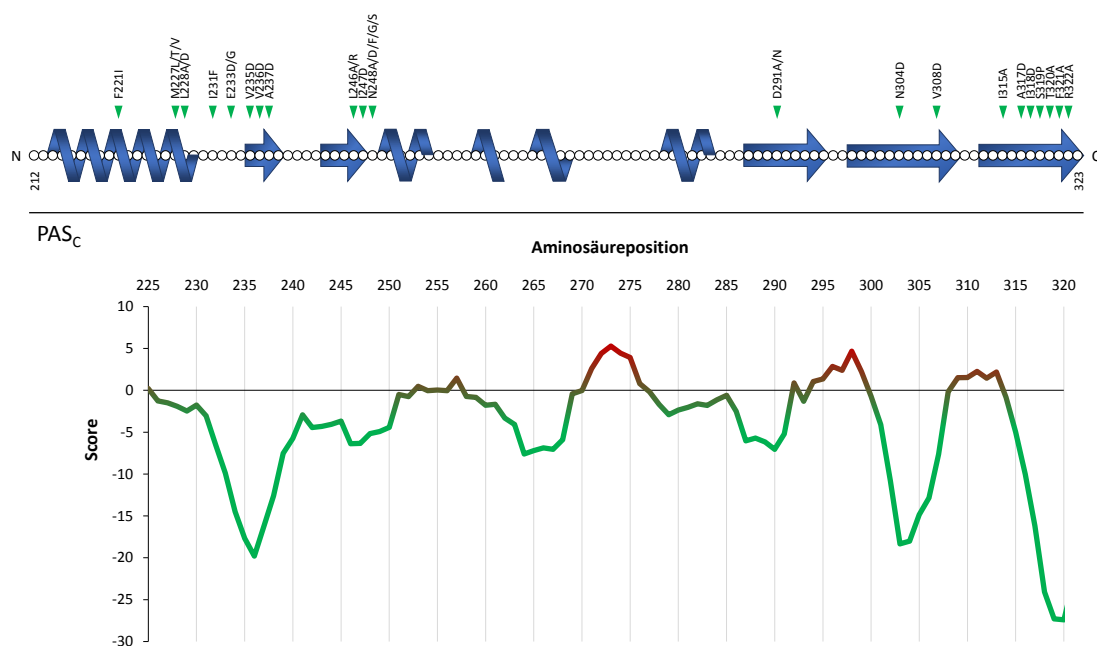
Hydrophobizität und Van-der-Waals-Volumen von Aminosäureresten am C-Terminus von  $PAS_p$ , in TM2, im Linker zwischen TM2 und  $PAS_c$  sowie am N-Terminus von  $PAS_c$ .



**Abb. 76:** Hydrophobizität und Van-der-Waals-Volumen von Aminosäureresten rund um TM2. Die Hydrophobizität eines Aminosäurerestes ist auf der Ordinate dargestellt und die Blasenfläche entspricht dem Van-der-Waals-Volumen. Der Bereich der zweiten Transmembranhelix ist gelb hinterlegt.

## Anhang zu 4.2

Die auf Basis von  $\text{NifL}_{Av}$  erzeugte Strukturvorhersage von  $\text{PAS}_c$  wurde auf ihre Qualität hin überprüft. Die Beurteilung erfolgte durch den ANOLEA Server, der Energieberechnungen an einem Protein durchführt um die nicht-lokale Umgebung (NLE, Non-Local Environment) schwerer Atome auszuwerten (MELO und FEYTMANS, 1998). Anhand dieser Berechnungen lässt sich die Qualität einer Struktur für jede einzelne Position abschätzen. Abb. 77 zeigt die Auswertung, wobei negative Energiewerte in grün günstige Energieumgebungen repräsentieren, während positive Werte für ungünstige Umgebungen sprechen, d.h. je negativer der Wert, desto besser die Qualität des Modells an dieser Position. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, hat die modellierte Struktur über große Bereiche eine hohe Güte, insbesondere in den Bereichen wo ON-Mutationen in  $\text{PAS}_c$  zu finden sind.



**Abb. 77:** Qualitätsbeurteilung der auf Basis von  $\text{NifL}_{Av}$  erzeugten Strukturvorhersage von  $\text{PAS}_c$ . Die Beurteilung erfolgte durch den ANOLEA Server, der Energieberechnungen an einem Protein durchführt um die nicht-lokale Umgebung (NLE, Non-Local Environment) schwerer Atome auszuwerten (MELO und FEYTMANS, 1998). Negative Energiewerte in grün repräsentieren günstige Energieumgebungen, während positive Werte für ungünstige Umgebungen sprechen. Das heißt, je negativer der Wert, desto besser die Qualität des Modells an dieser Position. Zum Vergleich ist das Diagramm zur Sekundärstruktur passend ausgerichtet, grüne Pfeile geben die Lage von ON-Mutationen wieder.

### B Abkürzungsverzeichnis

AHC	Acid-hydrolyzed casein
Amp	Ampicillin
APS	Adenosinphosphosulfat
Arc	Aerobic respiration control
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BACTH	Bacterial Two-Hybrid
BSA	Bovines Serumalbumin
Cache	Calcium channels and Chemotaxis receptors
Cam	Chloramphenicol
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	Catabolite Activator Protein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CuPhenanthrolin	Cu[II]-(1,10-Phenanthrolin) <sub>3</sub>
DauA	Dicarboxylate uptake system protein A
DctA	Dicarboxylate transport Protein A
DcuB	Dicarboxylate uptake Protein B
DcuR	Dicarboxylate uptake Regulator
DcuS	Dicarboxylate uptake Sensor
DEPC	Diethyldicarbonat
DHp	Dimerization and Histidine phosphotransfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	ExtraCytoplasmic Function
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eM9	Enriched M9
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FAD	Flavinadenindinukleotid
FNR	Fumarate Nitrate reductase Regulator
Frd	Fumaratreduktase
GAF	cGMP-specific phosphodiesterases, Adenylyl cyclases and FhlA
HAMP	Histidine kinases, Adenylate cyclases, MCP and Phosphatases
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxia-Inducible Factor

HPT	Histidine Containing Phosphotransfer
HRP	Horseradish Peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KAXI	Kanamycin/Ampicillin/X-Gal/IPTG
kB	Kilo-Basen
LB	Lysogeny broth
LOV	Light, Oxygen or Voltage
MCP	Methyl-accepting Chemotaxis Proteins
MD	Molecular Dynamics
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTP	Mikrotiterplatte
MU	Miller-Units
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NEM	N-Ethylmaleimid
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
PAC	PAS domain C-terminus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-SIM
PAS <sub>c</sub>	Cytoplasmatische PAS-Domäne
PAS <sub>p</sub>	Periplasmatische PAS-Domäne
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDC	PhoQ, DcuS, CitA
PEG	Polyethylenglycol
PEG-Mal	Methoxy-Polyethylenglycolmaleimid
PEP	Phosphoenolpyruvat
Per	PERIOD Clock Protein
QH <sub>2</sub>	Ubichinol
RMSD	Root Mean Square Deviation
RRR	Response Regulator Receiver
RT	Raumtemperatur
SCAM	Scanning Cysteine Accessibility Method
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sim	Single-minded protein
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolic repressor
Spc	Spectinomycin
Str	Streptomycin
t	Zeit

## B Abkürzungsverzeichnis

---

$T_M$	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TM	Transmembranhelix
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Transformation and Storage Buffer
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
VE	Vollentionisiert
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZKS	Zwei-Komponenten-System

## C Veröffentlichungen und Präsentationen

### Veröffentlichungen

Monzel, Christian, und [REDACTED] (2014). *Signal transduction in the Sensor Kinase DcuS of Escherichia coli*. Manuskript in Bearbeitung.

Monzel, Christian, [REDACTED] (2014). *The sensor kinase DcuS of Escherichia coli requires presence of the transporter DcuB, but not the transport or C<sub>4</sub>-dicarboxylate sensing by DcuB for function*. Manuskript in Bearbeitung.

Monzel, Christian, [REDACTED] (2013). *The cytoplasmic PAS<sub>c</sub> domain of the sensor kinase DcuS of Escherichia coli: role in signal transduction, dimer formation, and DctA interaction*. *MicrobiologyOpen*, 2(6):912-927.

[REDACTED], C. Monzel, [REDACTED] (2012). *The sensor kinase DcuS of Escherichia coli: two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit*. *Biological Chemistry*, 393(11):1291-1297.

### Vorträge

Monzel, Christian, [REDACTED] (2014). *Signal transduction in the Sensor Kinase DcuS of Escherichia coli*. Young Microbiologist Symposium, Norwich, UK

Monzel, Christian, [REDACTED] (2014). *Transmembrane Signaling in the Sensor Kinase DcuS of Escherichia coli*. 4. Gemeinsamer Kongress von DGHM und VAAM, Dresden

Monzel, Christian, [REDACTED] (2014). *Transmembrane Signaling in the Sensor Kinase DcuS of Escherichia coli*. 9<sup>th</sup> Transport Colloquium, Schloss Rauischholzhausen

### Poster

Monzel, Christian, [REDACTED] (2013). *A Hydrophobic Interface in PAS<sub>c</sub> Required for Homodimerization and Signal Transfer of Escherichia coli DcuS*. VAAM-Jahrestagung, Bremen

Monzel, Christian, [REDACTED] (2012). *ON-Mutations within Periplasmic and Intramembrane Regions of the E. coli Fumarate Sensor Kinase DcuS*. VAAM-Jahrestagung, Tübingen

## D Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Christian Monzel

Anschrift

Telefon

E-Mail

Geburtsdatum 04.09.1984

Geburtsort Wittlich

Familienstand Ledig

Staatsangehörigkeit Deutsch

### Promotion

seit 07/11 Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Mikrobiologie und Weinforschung  
Arbeitsgruppe

### Studium

04/06 - 07/11 Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Diplom-Biologe (Note: Mit Auszeichnung)  
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Physiologie  
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung  
Arbeitsgruppe  
Thema: Die periplasmatische Domäne der Sensor-Histidinkinase  
DcuS aus *Escherichia coli*

10/05 - 03/06 Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Studium der Bioinformatik (Diplom)

### Ehrenamt

04/05 - 09/06 Johanniter-Unfall-Hilfe e.V. Regionalverband Trier-Mosel  
Mobiler sozialer Dienst  
Hausarbeits- und Hilfstätigkeiten für pflegebedürftige Personen  
Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung

### Schule

08/95 - 03/04 Peter-Wust-Gymnasium, Wittlich  
Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,2)



Was wir wissen, ist ein Tropfen - was wir nicht wissen, ein Ozean

*Sir Isaac Newton*