

**Untersuchungen zu atypischen
Signaltransduktionssystemen im methanogenen
Archaeon *Methanosarcina acetivorans***

vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung
des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

angefertigt im

Fachbereich Biologie

Abteilung Mikrobiologie

vorgelegt von

Loriana Blasius

Wissenschaftliche Aussprache: Kaiserslautern, 09.12.2022

Referent: Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Hahn

Vorsitz: Prof. Dr. Stefan Kins

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Danksagung	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion	1
1.1.1 Zwei-Komponenten-Systeme	1
1.1.2 Serin/Threonin und Tyrosin Phosphorylierung.....	5
1.1.3 Signaltransduktion in <i>Archaea</i>	5
1.2. Der Modelorganismus <i>Methanosarcina acetivorans</i>	8
1.2.1 Methanogenese	9
1.2.2 Signaltransduktionssysteme in <i>Methanosarcina acetivorans</i>	11
1.3 Genregulation in <i>Archaea</i>	13
1.4 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material und Chemikalien	16
2.1.1 Geräte und Software	16
2.1.2 Enzyme, Antikörper, Kits und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.3 Bakterien- und Archaeastämme	19
2.1.4 Plasmide	20
2.1.5 Oligonukleotide	23
2.2 Mikrobiologische Methoden	26
2.2.1 Nährmedien und Zusätze	26
2.2.2 Lagerung von <i>E. coli</i> Zellen	27
2.2.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> Zellen	27
2.2.4 Medium <i>M. acetivorans</i>	27
2.2.5 Kultivierung von <i>M. acetivorans</i>	29

2.2.6 Lagerung von <i>M. acetivorans</i> Zellen.....	29
2.2.7 Bestimmung der Zelldichte	29
2.2.8 Zellaufschluss <i>M. acetivorans</i>	29
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	30
2.3.2 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	30
2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Easy Pure Kit.....	30
2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse	30
2.3.5 Präparation von genomischer DNA aus <i>M. acetivorans</i>	31
2.3.6 Präparation von RNA aus <i>M. acetivorans</i>	31
2.3.7 cDNA-Synthese.....	32
2.3.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	32
2.3.9 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	33
2.3.10 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.3.11 Reinigung von DNA-Fragmenten.....	34
2.3.12 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.3.13 Klonierung /Gibson Assembly.....	34
2.3.14 Ortsspezifische Mutagenese	35
2.3.15 Sequenzanalyse von DNA.....	35
2.4 Proteinbiochemische und analytische Methoden	36
2.4.1 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine.....	36
2.4.1.1 Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	36
2.4.1.2 Zellernte und Zellaufschluss.....	36
2.4.1.3 Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie	37
2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.4.3 Coomassie-Färbung.....	41
2.4.4 Kolloidale-Coomassie-Färbung	41
2.4.5 Umpufferung (Dialyse) und Konzentrierung isolierter Proteine	41
2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	42

2.4.7 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC).....	43
2.4.8 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA).....	44
2.4.9 Western-Blot	44
2.4.10 Tryptischer In-Gel-Verdau	46
2.4.11 Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitchromatographie-Massenspektrometrie	47
2.4.12 <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	47
2.4.13 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR).....	48
2.4.14 <i>In vivo</i> Quervernetzung (<i>Crosslinking</i>).....	50
2.4.15 Phosphorylierungs-Assay	51
2.4.16 TNP-ATP-Assay	52
2.4.17 ADP-Glo Kinase Assay.....	54
2.4.18 Quantitative Reverse Transkriptase (qRT)-PCR	55
3 Ergebnisse.....	58
3.1 Untersuchung der Protein-Interaktion.....	58
3.1.1 Proteinreinigung der Sensorkinasen und Transkriptionsregulatoren.....	59
3.1.2 Untersuchung der Protein-Interaktion mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	60
3.1.3 Optimierung der Proteinausbeute und Reinheit von MsmS	64
3.1.4 Untersuchung der Protein-Interaktion mittels <i>in vivo Crosslinking</i>	66
3.2 RdmS und MsmS sind keine typischen Sensorhistidinkinasen	69
3.2.1 Identifikation der Phosphorylierungsstelle(n) in der Kinase RdmS.....	69
3.2.2 MsrF und RdmS zeigen unspezifische Interaktion mit ATP	71
3.2.3 ATP zeigt unspezifische Interaktion mit verschiedenen Proteinen	74
3.3 Die Kinase RdmS bindet und hydrolysiert ATP	76
3.3.1 Charakterisierung der Interaktion von RdmS mit TNP-ATP	76
3.3.2 Charakterisierung der ATP-Hydrolyseaktivität von RdmS.....	78
3.3.3 Wer oder was ist der Phosphoakzeptor von RdmS?.....	79
3.4 Untersuchung der Transkriptionsregulation durch die Msr-Regulatoren.....	81
3.4.1 MsrF und MsrG bilden keine Heterodimere	81

3.4.2 <i>Electrophoretic mobility shift assays</i> von MsrF mit der Promotorregion von <i>mtsD</i>	83
3.4.3 <i>Electrophoretic mobility shift assays</i> von MsrG mit der Promotorregion von <i>mtsH</i>	86
3.4.4 <i>Electrophoretic mobility shift assays</i> von MsrC mit der Promotorregion von <i>mtsF</i>	87
3.4.5 <i>Electrophoretic mobility shift assays</i> von MsrF mit der Promotorregion von <i>mtsH</i>	88
4 Diskussion	90
4.1 RdmS und MsmS zeigen keine redoxabhängige Autokinaseaktivität	90
4.2 RdmS und MsmS sind atypische Sensorkinasen	92
4.3 RdmS bindet und hydrolysiert ATP	96
4.4 RdmS und MsmS interagieren mit den Msr-Regulatoren	97
4.5 Die Transkriptionsregulation der <i>mts</i> -Gene	100
4.6 Der putative Mechanismus der Signaltransduktion	105
5 Zusammenfassung	108
6 Summary	109
References	110
Anhang	127
Lebenslauf	135
Eidesstattliche Erklärung	138

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel für die Vergabe des interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke ihr für ihre Unterstützung, egal für welche Belangen und die stete Bereitschaft zur Diskussion.

Bei Prof. Dr. Matthias Hahn bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Außerdem danke ich Prof. Dr. Stefan Kins für die Bereitschaft der Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Bei der Carl-Zeiss-Stiftung und der TU Kaiserslautern bedanke ich mich für die finanzielle Förderung während meines Promotionsvorhabens.

Dr. Fred Sommer der Abteilung molekularen Biotechnologie und Systembiologie und Dr. Markus Räschele der Abteilung molekularen Genetik danke ich für die massenspektroskopischen Analysen und der Hilfe bei deren Auswertung.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Heermann und Kirstin Schaubruch von der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion mittels Biacore-Messungen und die fachliche Unterstützung bei der Auswertung.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Prof. Dr. William Metcalf von der University of Illinois Urbana-Champaign für die Bereitstellung der Methanosarcina-Stämme und der Dissertation von Madeline Lopez Munzo.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den ehemaligen und jetzigen FKBlern für eine unvergessliche Zeit im und außerhalb des Labors. Ich danke den alten FKBlern: Anne, Benni, Marco, Natascha, Katrin, Martina und Kerstin für die tolle Zeit hier in Lautern. Danke auch an Christina, Nora, Anna, Bin und den übrigen Doktoranden und Studenten für die entspannte Arbeitsatmosphäre.

Den größten Dank möchte ich an meine Familie richten, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Danke, Mama, Papa, Gian-Luca, Nonna, Hauke und Frieda!

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems (SI) sind nicht gelistet. Für Aminosäuren wurde in dieser Arbeit die Einbuchstaben-Kodierung verwendet.

ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
5'-UTR	5' untranslatierte Region
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptionseinheit (engl. <i>absorbance unit</i>)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaar
BRE-Element	Transkriptionsfaktor B Erkennungselement
Cmp	Chloramphenicol
DHp	Dimerisierungs und Histidin Phosphotransfer-Domäne
DMS	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
CA	Katalytische ATP-binde-Domäne
CHASE	<i>Cyclase/histidine kinase associated sensory extracellular</i>
CoA	Coenzym A
CoM	Coenzym M; 2-Mercapthoethansulfonsäure
C-Terminal	carboxy-Terminus
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation (engl. <i>electrospray ionization</i>)
EtOH	Ethanol
Fwd	Vorwärts-Primer (engl. <i>forward</i>)
GAF	cGMP spezifische Phosphodiesterase, <u>A</u> denylylcyclase und Transkriptionsaktivator <u>F</u> h1A
H ₄ SPT	Tetrahydrosarcinopterin
HATPase	Histidinkinase ähnliche ATPase-Domäne
HAMP	<u>H</u> istidinkinasen, <u>A</u> denylatcyclasen, <u>m</u> ethylierten Chemotaxisproteinen und <u>P</u> hosphatasen
HTH	Helix-Turn-Helix
HPt	Histidin phosphotransfer-Domäne
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	Luria Bertani
MKS	Multi-Komponenten-Systeme (engl. <i>multi-component-system</i>)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MsmS	<i>methyl sulfide methyltransferase associated sensor</i>
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
N-Terminal	Amino-Terminus

OCS	Ein-Komponenten-System (engl. <i>one-component-system</i>)
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PAS	<i>Drosophila</i> period clock protein (<u>P</u> ER), vertebrate aryl hydrocarbon nuclear translocator (<u>A</u> RNT), <i>Drosophila</i> single minded protein (<u>S</u> IM)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REC	Receiver-Domäne
Rev	Rückwärts-Primer (engl. <i>reverse</i>)
RdmS	<i>redox dependent methyltransferase-associated sensor</i>
RR	Antwortregulator (engl. <i>response regulator</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV	Säulenvolumen
SHK	Sensorhistidinkinase
SK	Sensorkinase
TCA	Trichloressigsäure (engl. <i>trichloroacetic acid</i>)
TBP	TATA-Bindeprotein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
Tet	Tetracyclin
TNP	Trinitrophenyl
UV/vis	Ultraviolett/sichtbar (engl. <i>ultraviolet/visible</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
ZKS	Zwei-Komponenten-System (engl. <i>two-component-system</i>)

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin
O	Pyl	Pyrrolysin

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Lebewesen sind darauf angewiesen, sich auf stetig wechselnde Umweltbedingungen in ihren natürlichen Habitaten schnell und effektiv anzupassen. So können sich physikalische, aber auch chemische Parameter wie die Temperatur, der zelluläre Redoxstatus, die Osmolarität, der pH-Wert oder die Nährstoffverfügbarkeit in kürzester Zeit verändern. Daher ist es notwendig, dass Organismen beispielsweise eine Hitzeschockantwort generieren (Yura *et al.*, 1993), auf Säurestress und Salzstress (Kunst & Rapoport, 1995; Heermann & Jung, 2010) reagieren oder die verfügbaren C-Quelle wahrnehmen und assimilieren (Golby *et al.*, 1999). Folglich haben sie Signaltransduktionsmechanismen etabliert, um Umweltsignale wahrzunehmen und diese intrazellulär zu verarbeiten, zu modulieren, weiterzuleiten und darauf zu reagieren. Die Reaktionen auf einen Reiz reichen von der Modulation der Expression eines einzelnen oder mehrerer Gene und der damit einhergehenden Proteinproduktion bis hin zu globalen zellulären Reaktionen, wie der Motilität oder Apoptose (Gao & Stock, 2009). Bei der Signalweiterleitung spielen Proteinmodifikationen, wie Phosphorylierungen eine bedeutende Rolle, die durch Kinasen und ihre Antagonisten, die Phosphatasen, moduliert werden. Solche Proteinphosphorylierungen an Aminosäureresten, wie Histidin, Aspartat, Serin, Threonin, Tyrosin oder Arginin sind charakteristisch für Signaltransduktionsprozesse und können in allen Domänen des Lebens gefunden werden (Hanks & Hunter, 1995; Stock *et al.*, 1989; Gao & Stock, 2009; Stock *et al.*, 2000).

1.1.1 Zwei-Komponenten-Systeme

Typische phosphorylierungs-basierte Signaltransduktionssysteme, die in der Domäne der *Bacteria* weit verbreitet sind, stellen die Zwei-Komponenten-Systeme (ZKS) dar. Klassische bakterielle ZKS bestehen aus einer membrangebundenen Sensorhistidinkinase (SHK) und einem zytoplasmatisch lokalisierten korrespondierenden Antwortregulator (*response regulator*, RR) (Parkinson, 1993; Stock *et al.*, 2000; Hoch, 2000). Wird ein Signal durch die Sensor-Domäne der SHK wahrgenommen, kommt es zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrests in der Phosphotransfer-Domäne. Anschließend wird die Phosphorylgruppe auf einen konservierten Aspartatrest in der Empfänger-Domäne (Receiver-(REC)-Domäne) des Antwortregulators übertragen, wodurch dieser aktiviert oder deaktiviert wird und so eine zelluläre Antwort auslöst (Abbildung 1).

SHK sind in der Regel Multidomänenproteine, die eine modulare Architektur aufweisen. Dabei bestehen sie aus einer oder mehreren nicht konservierten N-terminalen Sensor-Domänen, die ein spezifisches Signal wahrnehmen, gefolgt von einer konservierten Kinase-Domäne, in der die Autophosphorylierung stattfindet (Abbildung 1). Der Prototyp einer SHK besitzt eine membranintegrierte Sensordomäne, wie der Osmosensor EnvZ aus *Escherichia coli* (*E. coli*) (Abbildung 1 A) (Stock *et al.*, 2000). Die Sensor-Domänen können jedoch auch zytoplasmatisch (z. B. FixL; Abbildung 1 B) oder Membran-assoziiert (zB. LuxN; Abbildung 1 C) vorliegen (Bassler *et al.*, 1993; Stock *et al.*, 2000; Martínez-Argudo *et al.*, 2001).

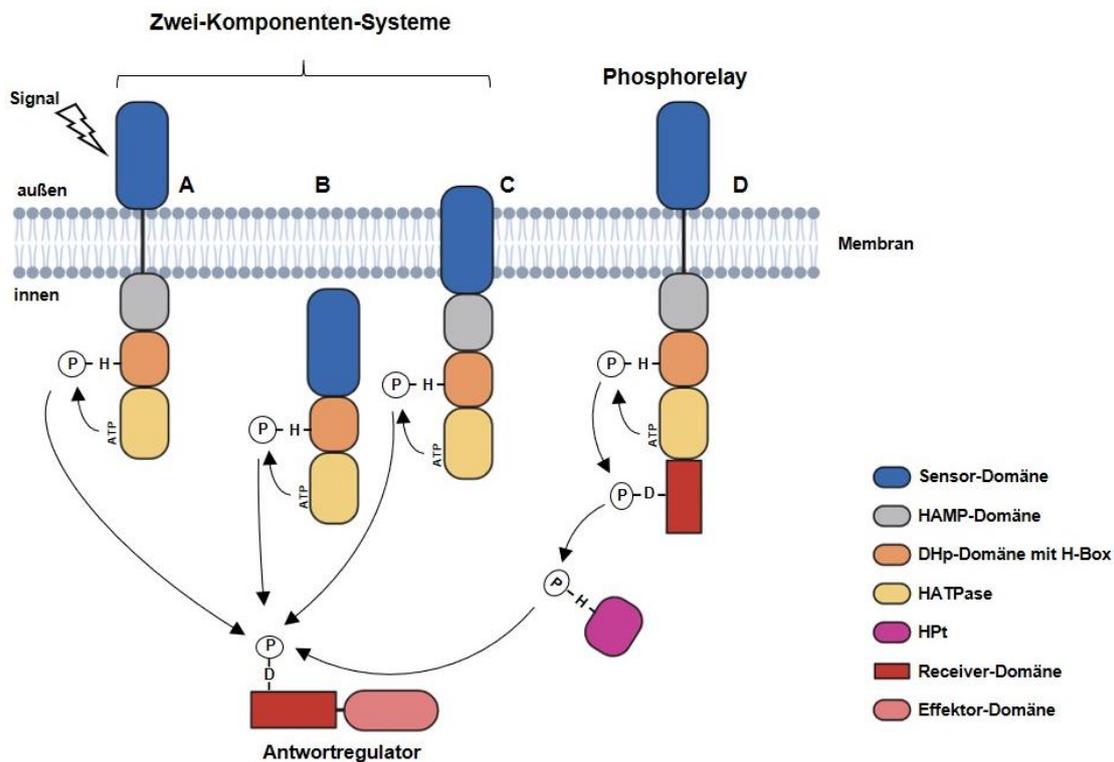


Abbildung 1. Schematische Übersicht von Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystemen. (A) Aufbau eines prototypischen Zwei-Komponenten-Systems. Durch ein externes Signal, welches durch die Sensor-Domäne der membrangebundenen Sensorhistidinkinase perzipiert wird, kommt es zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung eines konservierten Histidinrests in der H-Box. Der Phosphatrest wird auf einen konservierten Aspartatrest der Receiver-Domäne des Antwortregulators übertragen. Dieser erfährt eine Konformationsänderung und kann in seiner aktiven Form über die Reaktions-Domäne an bestimmte Bereiche der DNA binden und die Expression bestimmter Zielgene steuern. Alternativ kann die Sensor-Domäne der Sensorhistidinkinase zytoplasmatisch (B) oder membrangebunden (C) lokalisiert liegen. In einem Phosphorelay-System (D) wird die Hybridkinase autophosphoryliert und transferiert die Phosphorylgruppe auf einen Aspartatrest einer fusionierten Receiver-Domäne. Die Histidin Phosphotransfer-Domäne transferiert die Phosphorylgruppe anschließend auf einen konservierten Aspartatrest der Receiver-Domäne des zytoplasmatisch lokalisierten Antwortregulators, wodurch dessen Reaktions-Domäne aktiviert wird.

Neben den Sensor-Domänen können SHK weitere Module wie HAMP-, PAS-, oder GAF-Domänen, die zur Signalerkennung und Weiterleitung beitragen, aufweisen (Galperin *et al.*, 2001; Mascher *et al.*, 2006; Stewart & Chen, 2010).

HAMP-Domänen dienen dabei oft als Verbindung zwischen der extrazellulären Signaleingangs-Domäne und der intrazellulären Kinase-Domäne (Abbildung 1). Das Akronym HAMP steht für das Vorkommen dieser Domäne in Histidinkinasen, Adenylatcyclasen, methylierten Chemotaxisproteinen und Phosphatasen (Parkinson, 2010).

Die PAS-Domäne leitet sich namentlich von den Proteinen ab, in denen sie ursprünglich identifiziert wurde: *Drosophila* period clock protein (PER), vertebrate aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNNT) und *Drosophila* single minded protein (SIM; (Nambu *et al.*, 1991). PAS-Domänen sind wichtige zytosolische Signal-Domänen, die ubiquitär in *Bacteria*, *Eukarya* und *Archaea* in einer Reihe von Proteinen gefunden werden können. Sie sind in der Lage, aromatische Liganden, wie Tetrapyrrole zu binden und auf Reize wie Sauerstoff oder Veränderungen im Redoxpotential und dem Energiehaushalt der Zelle zu reagieren. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen (Huang *et al.*, 1993); (Taylor & Zhulin, 1999). Ein Beispiel für eine PAS-Domänen tragende SHK stellt der Sauerstoffsensoren FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* oder *Rhizobium meliloti* dar. Dieser besitzt einen an der PAS-Domäne gebundenen Häm-Kofaktor, der Sauerstoff binden und durch Konformationsänderung die Kinaseaktivität beeinflussen kann (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1994; Mascher *et al.*, 2006; Mascher *et al.*, 2006).

Die GAF-Domäne ist ebenfalls nach Proteinen benannt, in denen sie erstmals identifiziert wurde: cGMP spezifische Phosphodiesterase, Adenylylcyase und dem Transkriptionsaktivator FhIA (Aravind & Ponting, 1997). GAF-Domänen sind strukturell dem PAS-Domänen sehr ähnlich und in der Lage kleine Moleküle wie beispielsweise zyklische Nukleotide zu binden, können aber auch in Häm-Kofaktor tragenden Redoxsensoren wie DosS oder DosT aus *Mycobacterium tuberculosis* gefunden werden (Aravind & Ponting, 1997; Ho *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2009; Sivaramakrishnan & Montellano, 2013).

Die Kinase-Domäne, welche aus einer DHp-Domäne (Dimerisierungs- und Histidin Phosphotransfer-Domäne; Nomenklatur: His Kinase A HisKA) und einer CA-Domäne (Katalytische und ATP-bindende-Domäne; Nomenklatur: HATPase_c) besteht, besitzt stark konservierte Sequenzmotive. Die DHp-Domäne enthält die H-Box (HExxxP), in der der konservierte Histidinrest lokalisiert liegt und vermittelt die Dimerisierung von SHK. Die CA-Domäne hingegen ist durch die sogenannten N-(NLxxxN), G1-(DxGxG), F-(FxPF) und G2-(GxGxGL)-Boxen charakterisiert, welche in die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse involviert sind (Stock *et al.*, 2000; Stewart, 2010). Dieses katalytische Zentrum ist strukturell homolog zur ATPase-Domäne der DNA-Gyrase B und von Hsp90 (Park *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998), unterscheidet sich jedoch signifikant von dem der eukaryotischen Proteinkinasen (vgl. Kapitel 1.1.2).

Wird ein spezifisches Signal durch die Sensor-Domäne der SHK wahrgenommen, verändert sich deren Konformation, wodurch die Interaktion zum Homodimer über die DHp-Domäne und die Hydrolyse des an die CA-Domäne gebundenen ATPs ermöglicht wird. Die Phosphorylierung des konservierten Histidinrests führt zur Ausbildung einer Phosphoamidatbindung (P-His) (Gao & Stock, 2009; Fuhs & Hunter, 2017). Diese besitzt ein hohes Energiepotenzial, sodass der Phosphatrest schließlich auf einen konservierten Aspartatrest in der Empfänger-Domäne des korrespondierenden RR übertragen werden kann (Abbildung 1) (Robinson *et al.*, 2000). Durch die Phosphorylierung des RR wird dessen Reaktions-Domäne schließlich aktiviert oder deaktiviert. Diese Reaktions-Domänen sind oft DNA-bindende-Domänen, die durch Transkriptionsregulation die Genexpression beeinflussen. DNA-bindende-Domänen können aufgrund ihrer Proteinstruktur in *winged helix-turn-helix*-(wHTH)-Domänen der OmpR/PhoB-Familie (Martinez-Hackert *et al.*, 1997) oder *helix-turn-helix*-(HTH)-Domänen der NarL/FixJ-Familie (Baikalov *et al.*, 1996) eingeteilt werden. Allerdings können die Reaktions-Domänen auch mit RNA, Liganden oder anderen Proteinen interagieren oder durch katalytische Enzymaktivität zur Veränderung der zellulären Physiologie beitragen (Gutiérrez *et al.*, 2005; Gao & Stock, 2009; Galperin, 2010; Perry *et al.*, 2011). Alternativ dazu können RR lediglich aus einer REC-Domäne bestehen, wie beispielsweise CheY aus *E. coli*. Ca. 15% aller RRs in *Bacteria* und ca. 50% der RRs in *Archaea* bestehen ausschließlich aus einer alleinstehenden Empfänger-Domäne (Bourret, 2010).

Einige SHK sind multifunktionale Enzyme, die neben der Kinase- und Phosphotransferaseaktivität auch eine intrinsische Phosphataseaktivität aufweisen und somit ihren korrespondierenden RR dephosphorylieren können. Dabei wird die Phosphorylgruppe durch Hydrolyse vom Aspartatrest auf ADP übertragen (Cohen, 1989). Zudem konnten Regulatoren identifiziert werden, die ihre eigene Dephosphorylierung katalysieren (Bourret, 2010).

Neben den konventionellen ZKS gibt es auch Verschaltungen von ZKS-Proteinen, wodurch der Mechanismus der Signaltransduktion komplexer werden kann. Anzahlmäßig liegen Sensorkinasen und RR meist in einem Verhältnis von eins zu eins in der Zelle vor, jedoch können auch Kreuzreaktionen (*cross talk*) stattfinden. So kann beispielsweise eine Kinase mehrere Regulatoren phosphorylieren (*one-to-many*-Prinzip) oder ein Regulator durch mehrere Kinasen (*many-to-one*-Prinzip) aktiviert werden (Laub & Goulian, 2007). Daneben besteht die Möglichkeit zur Signalweiterleitung über sogenannte Multi-Komponenten-Systeme (MKS) mit hybriden Histidinkinasen (Abbildung 1 D). Diese weisen neben den typischen SHK-Domänen weitaus komplexere Strukturen auf. Die Phosphorylierungskaskade solcher Systeme verläuft über einen vier Stufen Phosphorelay (His1-Asp1-His2-Asp2) (Varughese,

2002). Hier sind also zwei ZKS in Reihe geschaltet. Neben der SHK und dem RR sind in MKS zusätzliche Signalmodule, wie Histidinphosphotransfer-(HPt)-Domänen oder REC-Domänen zwischengeschaltet. Diese können alleinstehend oder mit der Kinase fusioniert vorliegen. So findet man in *Eukarya* fast ausschließlich Hybridkinasen und alle eukaryotisch basierten ZKS stellen Phosphorelays dar. Solche Phosphorelays ermöglichen eine genauere Feinabstimmung bzw. Vernetzung mit anderen Signaltransduktionswegen (Thomason & Kay, 2000).

1.1.2 Serin/Threonin und Tyrosin Phosphorylierung

Während Bakterien vorwiegend Histidin-Aspartat Phosphorylierungsbasierte Signaltransduktionssysteme nutzen, spielen in *Eukarya* Systeme, die auf der Phosphorylierung der OH-Gruppe von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten basieren, eine Schlüsselrolle (Hanks, 2003). Eukaryotische Proteinkinasen (PK), auch Hanks-Type-Kinasen genannt, können in Serin/Threonin-(Ser/Thr)-Kinasen oder Tyrosin-(Tyr)-Kinasen eingeteilt werden (Krebs, 1983) und unterscheiden sich auf Sequenz- und Strukturebene signifikant von typischen SHK. Alle Ser/Thr-Kinasen und Tyr-Kinasen besitzen ein katalytisches Zentrum aus 12 konservierten Subdomänen (Hanks *et al.*, 1988; Hanks & Hunter, 1995; Taylor & Kornev, 2011). Viele dieser Kinasen sind in Signalkaskaden organisiert. Dabei können sie sich selbst autophosphorylieren oder hierarchisch niedriger stehende Kinasen, Adapterproteine oder Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und diese dadurch aktivieren. So können durch ein einziges äußeres Signal mehrere intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und miteinander vernetzt werden. Neben der Kinase-Domäne können solche Kinasen verschiedene andere Protein-Domänen aufweisen, die die Interaktion mit anderen Proteinen oder Lipiden vermitteln und dadurch mit *downstream* lokalisierten Signalknotenpunkten kommunizieren (Derouiche *et al.*, 2012). Obwohl Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten vorwiegend in der Domäne der *Eukarya* gefunden werden können, konnten einige offene Leseraster (*open reading frames*; ORFs), die für eukaryotische PK codieren, sowohl in *Bacteria* als auch in *Archaea* identifiziert werden (Leonard *et al.*, 1998).

1.1.3 Signaltransduktion in *Archaea*

Neben den *Bacteria* und *Eukarya* bilden die *Archaea* eine der drei Domänen des Lebens, innerhalb derer alle zellulären Lebewesen eingeordnet werden (Woese *et al.*, 1990). Dabei werden sie aufgrund ihres fehlenden Zellkerns den Prokaryoten zugeteilt, unterscheiden sich in ihrem Zellaufbau jedoch deutlich von dem der *Bacteria*. Phylogenetisch betrachtet sind *Archaea* näher mit den *Eukarya* verwandt und auch molekulare Prozesse wie beispielsweise die Transkription verlaufen ähnlich wie bei den Eukaryoten (Iwabe *et al.*, 1989). Über die

Funktion und Regulation von archaeellen Signaltransduktionsmechanismen ist hingegen nur sehr wenig bekannt. Im Vergleich zur Domäne der *Bacteria* sind archaeelle Signaltransduktionsprozesse vorwiegend durch Ein-Komponenten-Systeme (EKS) reguliert. In EKS ist die Sensor-Domäne direkt mit der Reaktions-Domäne fusioniert und die Signalweiterleitung findet ohne chemische Modifikation statt. Die Sensor-Domäne ist meist zytoplasmatisch lokalisiert und etwa 84% der Reaktions-Domänen in EKS stellen DNA-bindende HTH-Domänen dar (Ulrich *et al.*, 2005).

Neben EKS konnten aber auch Gene, die für ZKS kodieren, in *Archaea* identifiziert werden, deren Verteilung jedoch stark unilateral erscheint. So können unter den sequenzierten Genomen im Phylum der *Crenarchaeota*, der *Nanoarchaeota* und der *Korarchaeota* keine Gene für ZKS identifiziert werden (Ashby, 2006). Die höchste Abundanz findet sich hingegen innerhalb der *Euryarchaeota* und *Thaumarchaeota*. Dies führt zu der Annahme, dass ZKS ihren Ursprung in *Bacteria* haben und durch horizontalen Gentransfer auf die *Archaea* übertragen wurden (Koretke *et al.*, 2000; Ulrich *et al.*, 2005).

Während in *Bacteria* die Anzahl der Kinasen und Regulatoren meist in einem 1:1 Verhältnis vorliegt, sodass Kinase und Regulator spezifisch miteinander interagieren können, variiert dieses Verhältnis, besonders unter den Methanogenen, innerhalb der *Archaea* signifikant (Galperin *et al.*, 2001; Galperin, 2010). Im methanogenen Archaeon *M. acetivorans* beispielsweise stellen SHK, mit 51 Mitgliedern die drittgrößte Multigenfamilie dar, wohingegen nur 18 RR identifiziert werden können (Galagan *et al.*, 2002; Galperin *et al.*, 2018). Daher ist davon auszugehen, dass archaeelle ZKS nicht in strikten Paaren agieren, sondern dass eine SHK mehrere RR bedient (Krell, 2018).

Wird die Domänenstruktur im Vergleich zu bakteriellen SHK näher betrachtet, ist auffällig, dass 62% der archaeellen SHK keine Transmembran-Domäne aufweisen und zytoplasmatisch lokalisiert liegen (Abbildung 1 B). Zudem besitzen sie zumeist multiple PAS- und GAF-Domänen. Jedoch konnten auch Kinasen die eine ungewöhnliche Domänenarchitektur aufweisen ausgemacht werden. Diese besitzen zwar die C-terminale HisKA-Domäne, in der der konservierte Histidinrest lokalisiert liegt, ihnen fehlt jedoch die HATPase-Domäne, die für die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse verantwortlich ist. Diese „nichtenzymatischen Histidinkinasen ähnlichen Proteine“ können vorwiegend in *Archaeoglobi* und *Methanomicrobia* gefunden werden (Galperin *et al.*, 2018). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Histidinrest in solchen Proteinen als Phosphoakzeptor fungiert und ähnlich wie in eukaryotischen Systemen in einen Phosphorelay involviert ist. Zudem konnten für *Archaea* exklusive Sensor-Domänen identifiziert werden, deren Funktion jedoch weitgehend unbekannt ist (Galperin *et al.*, 2018).

Archaeelle RR unterscheiden sich innerhalb der Reaktions-Domäne signifikant von ihrem bakteriellen Pendant. Die meisten archaeellen Genome kodieren keine Homologe zu klassischen bakteriellen RR, wie z.B. Transkriptionsregulatoren der OmpR/PhoB, NarL/FixJ oder Agr/LytR Familie (Galperin *et al.*, 2001; Krell, 2018; Ulrich *et al.*, 2005). Die Regulatoren scheinen meist aus einer alleinstehenden REC-Domäne oder aus einer Kombination aus REC und PAS-/GAF-Domänen zu bestehen. Die REC-Domänen finden sich jedoch auch fusioniert mit Kinasen zu sogenannten Hybridkinasen. Viele putative Reaktions-Domänen sind auf funktioneller Ebene nicht charakterisiert und DNA-bindende-HTH-Domänen finden sich in einer verhältnismäßig sehr geringen Anzahl an RR. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Signaltransduktion in archaeellen ZKS eher durch Protein-Protein-Interaktionen als durch eine direkte Transkriptionsregulation vermittelt wird (Galperin *et al.*, 2018).

In der Domäne der *Bacteria* konnten bereits zahlreiche SHK und RR sowohl strukturell als auch funktionell näher charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu sind in der Domäne der *Archaea* nur wenige ZKS näher beschrieben und auch biochemisch charakterisiert. Studien zu ZKS wurden bislang nur in halophilen (*Halobacterium salinarum*) und methanogenen (*Methanosarcina spp.*) *Archaea* durchgeführt. Dazu zählt unter anderem das ZKS Fill/FilR aus *Methanosaeta harundinacea*, welches an der Regulation von Genen, die in die acetoklastische Methanogenese involviert sind, beteiligt ist. Es besteht aus einer membrangebunden SHK Fill und den zwei RR, FilR1 und FilR2. FilR1 weist eine C-terminale REC-Domäne, eine N-terminale wHTH-Domäne und eine dazwischen liegende Domäne bisher unbekannter Funktion (DUF1724) auf und FilR2 besteht aus einer alleinstehenden REC-Domäne (Li *et al.*, 2014). Daneben konnte das ZKS LtrK/LtrR, welches an der temperaturabhängigen Genregulation in *Methanococcoides burtonii* verantwortlich ist sowie das ZKS CheY/CheA aus *Halobacterium salinarum* welches eine analoge Funktionsweise zu dem System aus *Bacteria* aufweist, näher charakterisiert werden (Rudolph *et al.*, 1995; Koch *et al.*, 2008; Najnin *et al.*, 2016).

Neben Signaltransduktionssystemen, die auf Histidin-Aspartat Phosphorylierungen basieren, konnten innerhalb der *Archaea* auch solche vom eukaryotischen-Typ, basierend auf Ser/Thr- und Tyr-Phosphorylierungen, identifiziert werden (Shi *et al.*, 1998; Ponting *et al.*, 1999; Kennelly, 2014). Die erste genomweite Analyse eines archaeellen Phosphoproteom wurde 2009 in *H. salinarum* durchgeführt. Dabei konnten 81 Phosphorylierungsstellen in 69 Proteinen identifiziert werden, mit einer Verteilung von Ser/Thr/Tyr-Phosphorylierungen von 86%/12%/1% (Aivaliotis *et al.*, 2009). Das zweite veröffentlichte Phosphoproteom stammt aus *Sulfolobus solfataricus*. Hier konnten insgesamt 1318 Phosphorylierungsstellen in 540 Proteinen gefunden werden. Besonders auffallend war hier die hohe Anzahl an Tyrosinphosphorylierungen, die mit einer Ser/Thr/Tyr-Verteilung von 26%/21%/56% konträr zur

Verteilung in *H. salinarum* ist (Esser *et al.*, 2012). Beide Analysen weisen jedoch darauf hin, dass Proteinphosphorylierungen an diesen Aminoäsureresten ebenfalls eine bedeutende Rolle in *Archaea* spielen. Durch bioinformatische Analysen konnten eine Reihe von putativen eukaryotischen Proteinkinasen in *Archaea* identifiziert werden. Einige davon wie z. B die Ser/Thr-Kinase ST1565 aus *Sulfolobus tokadaii* oder ArnC und ArnB aus *Sulfolobus acidocaldarius* konnten in den vergangenen Jahren auch biochemisch näher charakterisiert werden. ST1565 besitzt Autophosphorylierungsaktivität und phosphoryliert ein *forkhead-associated*-(FHA)-Domänen tragendes Protein (ST0829) (Wang *et al.*, 2010) und die archaeellen Proteinkinasen ArnC und ArnD phosphorylieren zwei Repressoren, die an der Regulation der Motilität beteiligt sind an Serin-/Threoninresten (Reimann *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2019). Außerdem konnten in methanogenen *Archaea* die Histidinkinasen ähnlichen Redoxsensoren MsmS und RdmS, die ebenfalls Autophosphorylierungsaktivität an Serin- und Tyrosinresten aufweisen, identifiziert werden (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019).

1.2. Der Modelorganismus *Methanosarcina acetivorans*

M. acetivorans ist ein mesophiler, strikt anaerob lebender Organismus, der zur Domäne der *Archaea* gehört, und erstmals 1984 aus marinen Sedimenten isoliert werden konnte (Sowers *et al.*, 1984). Zur Energiegewinnung betreibt er die sogenannte Methanogenese (siehe Kapitel 1.2.1). Alle methanproduzierenden Organismen gehören zur Domäne der *Archaea* und werden aktuell in die acht Ordnungen der *Methanopyrales*, *Methanobacterales*, *Methanococcales*, *Methanonatronarchaeales*, *Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanosarcinales* und *Methanomassiliicoccales* unterteilt, die allesamt zum Phylum der *Euryarchaeota* gehören (Evans *et al.*, 2019). *M. acetivorans* gliedert sich dabei innerhalb der *Methanosarcinales* in die Familie der *Methanosarcinaceae* ein. In Abhängigkeit der Wachstumsphase und sich ändernden Umweltbedingungen ist das Archaeon in der Lage, verschiedene morphologische Formen anzunehmen. Neben einzelligen Kokken kann es auch unregelmäßig geformte Zellaggregate bilden (Sowers *et al.*, 1984; Macario & Conway de Macario, 2001). Das zirkuläre Genom von *M. acetivorans* wurde 2002 vollständig sequenziert und ist mit ca. 5,75 Megabasen und 4524 vorhergesagten offenen Leserastern das größte bisher bekannte unter den Methanogenen. Diese enorme Genomgröße ist auf eine starke genetische Redundanz zurückzuführen. Dies bedeutet, dass mehrere Homologe eines Gens innerhalb des Genoms vorkommen (Galagan *et al.*, 2002).

1.2.1 Methanogenese

Bei der Methanogenese handelt es sich um eine besondere Form der anaeroben Atmung, welche ausschließlich durch methanogene *Archaea* betrieben wird und Methan (CH_4) als Endprodukt des Energiestoffwechsels freisetzt (Jones *et al.*, 1987). Grundsätzlich können methanogene *Archaea* vier verschiedene Reaktionswege betreiben, um unterschiedliche Substrate zu verwerten (Thauer, 1998). Die acetoklastische Methanogenese, die methylotrophe Methanogenese, die hydrogenotrophe Methanogenese und die carboxidotrophe Methanogenese (Abbildung 2). Die meisten Methanogenen betreiben die hydrogenotrophe Methanogenese. Dabei wird CO_2 unter Zuhilfenahme des Elektronendonors H_2 schrittweise zu Methan reduziert (Whiticar *et al.*, 1986; Wagner *et al.*, 2018). Bei der acetoklastischen Methanogenese wird die Methylgruppe des Acetats zu CH_4 reduziert. Dazu wird das Acetat zu Acetylphosphat aktiviert und unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch auf Coenzym A (CoA) übertragen (Abbildung 2) (Ferry, 1997). Das entstandene Acetyl-CoA wird anschließend durch die Acetyl-CoA-Synthase (ACS) in eine Methyl- und eine Carbonylgruppe gespalten (Grahame & DeMoll, 1995). Während die Carbonylgruppe unter der Beteiligung von Wasser oxidiert und in Form von CO_2 freigesetzt wird, kann die Methylgruppe auf Coenzym M (CoM) transferiert und schließlich durch die Methyl-S-CoM-Reduktase (Mcr) zu CH_4 reduziert werden (Abbildung 2, roter Pfad) (Costa & Leigh, 2014). Methylotrophe Methanogene können methylierte Verbindungen, wie Methylamin, Methanol oder Methylsulfid in die Methanogenese einbinden. Bei der methylotropen Methanogenese werden die Methylgruppen der verschiedenen Substrate durch zwei Methyltransferasen (MT1 und MT2) auf CoM übertragen (Deppenmeier *et al.*, 1996). Die erste Methyltransferase MT1 ist substratspezifisch und besteht aus einem Corrinoïd-Protein (MtxC x steht für das Substrat) und einer Methyltransferase (MtxB), welche die Methylgruppe auf das Corrinoïd überträgt. Die zweite Methyltransferase MT2 (MtxA) besitzt keine Substratspezifität und überträgt im nächsten Schritt die Methylgruppe vom Corrinoïd auf HS-CoM. Etwa ein Viertel der Methylgruppen wird dabei gegenläufig zum hydrogenotropen Weg zu CO_2 oxidiert, wobei die restlichen Methylgruppen am Coenzym M durch die Mcr zu CH_4 reduziert werden (Abbildung 2, grüner Pfad). Die hierfür benötigten Reduktionsäquivalente stammen entweder aus der Oxidation von H_2 oder der Oxidation einer Methylgruppe (Ferry, 1992; Blaut, 1994; Costa & Leigh, 2014). In einigen Fällen ist es für die Verstoffwechslung von Methylsulfiden ausreichend lediglich eine Methyltransferase und das Corrinoïd-Protein zu besitzen. In *M. acetivorans* können diese Komponenten sogar fusioniert vorliegen (Tallant *et al.*, 2001; Oelgeschläger & Rother, 2009). Wird Kohlenstoffmonoxid (CO) über den carboxidotropen Weg (Abbildung 2, blauer Pfad) als Substrat in die Methanogenese eingebunden, wird vorwiegend Acetat, Formiat, Methanthiol sowie Dimethylsulfid (DMS) und weniger Methan als

Hauptmetabolit gebildet (Rother & Metcalf, 2004; Moran *et al.*, 2008). Bislang konnten lediglich vier in Reinkultur untersuchte Methanogene identifiziert werden, die CO als einzige Kohlenstoffquelle nutzen.

Während die meisten methanogenen *Archaea* nur einen der genannten Wege nutzen und nicht mehr als zwei unterschiedliche Substrate in die Methanogenese einbinden können (Zinder, 1993; Galagan *et al.*, 2002), stellt die Familie der *Methanosarcinaceae* die metabolisch vielseitigste Gruppe dar (Thauer *et al.*, 2008). Diese können in der Regel mehr als einen Energiestoffwechsel nutzen. *M. acetivorans* kann sowohl die acetoklastische Methanogenese und carboxidotrophe Methanogenese als auch die methylotrophe Methanogenese betreiben (Abbildung 2) (Sowers *et al.*, 1984; Deppenmeier *et al.*, 1996).

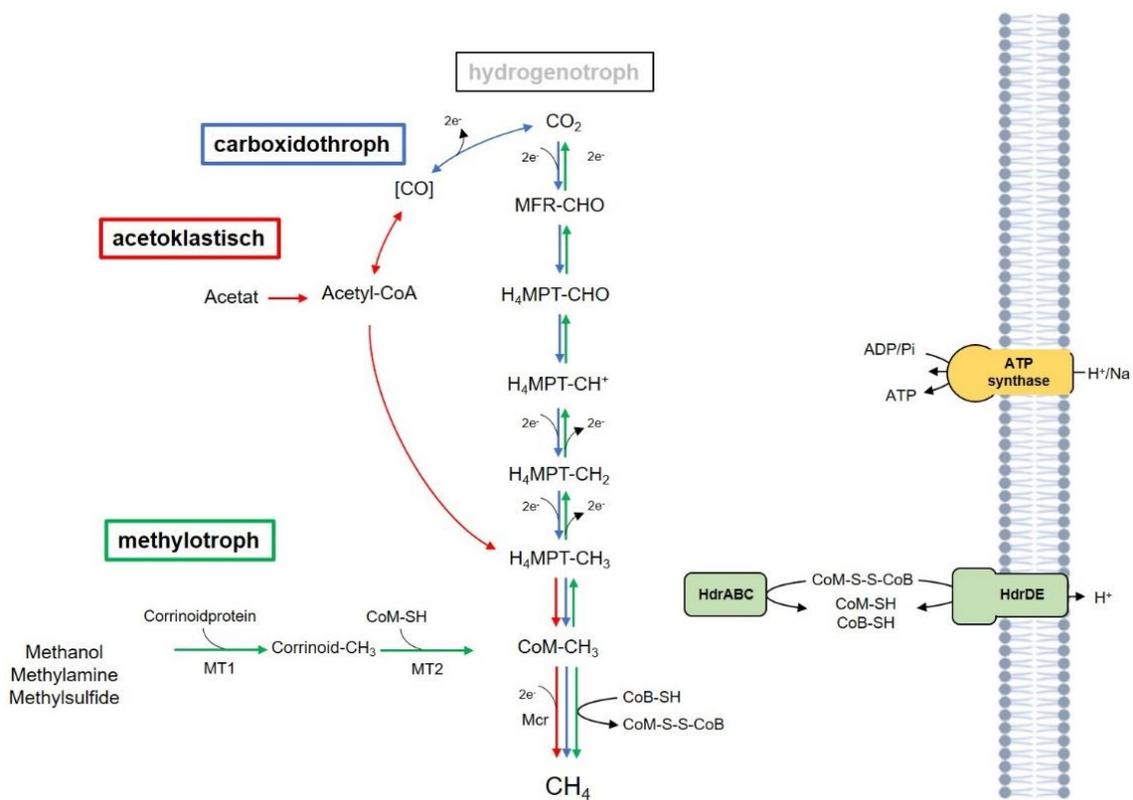


Abbildung 2. Schematische Übersicht der Methanogenese. *M. acetivorans* ist in der Lage, drei verschiedene Stoffwechselwege zur Energiegewinnung zu nutzen: Die acetoklastische (rot), die methylotrophe (grün) und die carboxidotrophe (blau) Methanogenese. *M. acetivorans* betreibt jedoch keine hydrogenotrophe Methanogenese, bei der CO₂ als Substrat verwendet wird. Acetat kann über den acetoklastischen Weg zu CH₄ und CO₂ umgesetzt werden. CO kann über den carboxidotrophen Weg in die Methanogenese eingebunden werden. Hierbei werden jedoch vorwiegend Formiat, Methanthiol und Dimethylsulfid als Endprodukte gebildet. Während der methylotrophen Methanogenese werden die Methylgruppen der verschiedenen Substrate durch zwei Methyltransferasen (MT1 und MT2) und einen Corrinoidfaktor auf Coenzym M (CoM) übertragen. Ein Teil der Methylgruppen wird gegenläufig der hydrogenotrophen Methanogenese schrittweise zu CO₂ oxidiert, um Elektronen für die Reduktion der Methylgruppen bereitzustellen. Auf CoM werden auch die in anderen Reaktionswegen gebildeten Methylgruppen übertragen. Das anschließend gebildete Heterodisulfid aus CoM und Coenzym B (CoM-CoB) wird mithilfe der Heterodisulfidreduktasen in CoM und CoB reduziert. Der während der Methanogenese aufgebaute elektrochemische Gradient wird für die Synthese von ATP genutzt.

1.2.2 Signaltransduktionssysteme in *Methanosarcina acetivorans*

Unter den methanogenen *Archaea* ist *M. acetivorans* einer der metabolisch vielseitigsten, da der Organismus in der Lage ist, eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate für die Methanogenese zu nutzen. Wie der Organismus diese verschiedenen Nährstoffe wahrnimmt und anschließend die benötigten Stoffwechselfgene aktiviert ist jedoch bislang weitestgehend unerforscht. Für die Verstoffwechslung von Methylsulfiden sind die drei methylsulfidspezifischen Methyltransferase-Isoenzyme MtsD (MA0859), MtsH (MA4558) und MtsF (MA4384; umbenannt in CmtA (Vepachedu & Ferry, 2012) von Bedeutung (Abbildung 3) (Oelgeschläger & Rother, 2009; Bose *et al.*, 2009). Diese stellen Corrinoid/Methyltransferase-Fusionsproteine dar und setzen sich aus einer N-terminalen Corrinoid-Bindedomäne und einer Uroporphyrinogen-Decarboxylase/Methyltransferase-Domäne zusammen. Diese Fusionsproteine sind einzigartig für *M. acetivorans* und werden transkriptionell und posttranskriptionell über die Anwesenheit von Methylsulfiden wie Methanthiol (MT), Dimethylsulfid (DMS) und Methylmercaptopropionat (MMPA) reguliert (Fu & Metcalf, 2015). An der transkriptionellen Regulation sind zudem die zur Msr-Familie gehörenden Transkriptionsregulatoren MsrG, MsrF und MsrC beteiligt (Abbildung 3). Diese liegen stromaufwärts der *mts*-Gene und bestehen aus einer C-terminalen Domäne unbekannter Funktion (DUF1724), die nur in archaeellen Regulatorproteinen zu finden ist und N-Terminal besitzen sie eine DNA-bindende-HTH-Domäne, die Ähnlichkeit zur ArsR-Familie bakterieller Transkriptionsregulatoren aufweist. Anhand von *msr*-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass MsrG für die Regulation der Genexpression von *mtsH*, MsrF für die Regulation von *mtsD* und MsrC für die Regulation von *mtsF* verantwortlich ist (Bose *et al.*, 2009). Direkt stromaufwärts der Msr-Regulatoren MsrG und MsrF liegen Gene die für die Sensorinasen MsmS und RdmS kodieren (Abbildung 3) (Bose *et al.*, 2009; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Es wird angenommen, dass die Kinasen zusammen mit den Regulatoren Signaltransduktionssysteme bilden und diese die Expression der *mts*-Gene regulieren. Zudem gibt es Hinweise, dass die Systeme nicht nur linear reguliert sind, sondern auch kreuzregulieren. So konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *msmS* zu einer DMS-abhängigen konstitutiven Synthese von MtsF führt (Molitor, 2013).

Stromaufwärts von MsrC kodiert die Kinase MA4377 (Abbildung 3). MA4377 ist eine Hybridkinase bakteriellen Ursprungs, die an einem konservierten Histidinrest autophosphoryliert wird und ihren zweiten fusionierten Receiver sowie einen downstream lokalisierten alleinstehenden Receiver (MA4376) an einem konservierten Aspartatrest phosphorylieren kann (Sexauer, 2021). In wie weit die Kinase in die oben genannten Signaltransduktionssysteme involviert ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Durch

Lopez Munzo (2017) konnte allerdings gezeigt werden, dass die Deletion von MA4377 zu einer TMA-abhängigen, erhöhten Synthese von *mtsF* führt.

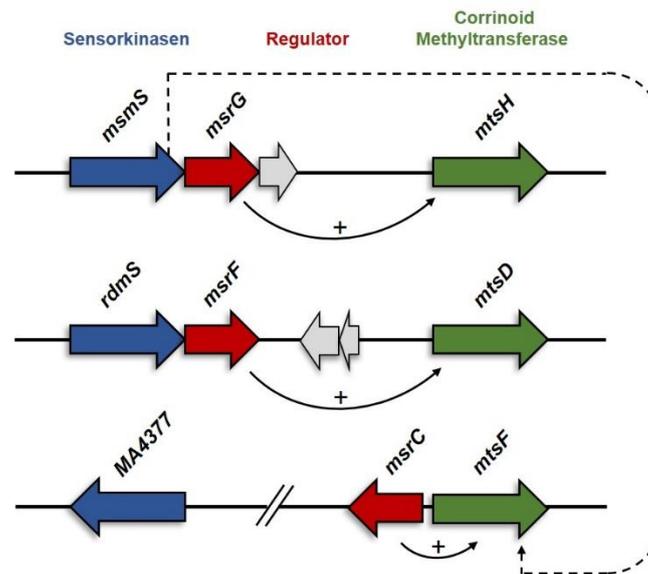


Abbildung 3. Genetische Anordnung von drei in den Dimethylsulfid-Metabolismus involvierten putativen Zwei-Komponenten-Systemen in *M. acetivorans*. Schematisch dargestellt sind die Positionen der Gene, die für die methylsulfidspezifischen Methyltransferasen MtsH, MtsD und MtsF kodieren (grün), relativ zu den Genen der Transkriptionsregulatoren MsrG, MsrF und MsrC (rot) und relativ zu den Genen der Sensorkinasen MsmS, RdmS und MA4377 (blau). Die Transkriptionsregulatoren aktivieren die Genexpression der *mts*-Gene (grün). Die Sensorkinase MsmS hat einen Einfluss auf die Expression von *mtsF* (Bose *et al.*, 2009; Molitor *et al.*, 2013).

Die beiden Sensorkinasen MsmS und RdmS konnten in vorangegangenen Untersuchungen ebenfalls näher charakterisiert werden. Diese Kinasen unterscheiden sich signifikant in Aufbau und Struktur von MA4377. Sie weisen auf Sekundärstrukturebene eine hohe Homologie zueinander auf (60% Identität und 76% Ähnlichkeit) und bestehen aus alternierenden PAS- und GAF-Domänen und einer C-terminalen Histidin-ähnlichen ATPase-Domäne (Abbildung 4). Dieser HATPase-Domäne fehlt jedoch der in der H-Box lokalisierte, konservierte Histidinrest, der typischerweise in bakteriellen SHK und auch in MA4377 phosphoryliert wird. In der zweiten GAF-Domäne tragen beide Kinasen einen Häm-Kofaktor, welcher kovalent über einen Cysteinrest an Position 656 (MsmS) bzw. 620 (RdmS) gebunden ist (Abbildung 4). Zusätzlich besitzt RdmS ein Amber-Codon (UAG) in der zweiten PAS-Domäne, das in den meisten Organismen als Stopp-Codon fungiert, in *M. acetivorans* jedoch für die 22. Aminosäure Pyrrolysin kodiert (Srinivasan *et al.*, 2002). Für beide Kinasen konnte eine redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität unter oxidierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Aufgrund des gebundenen Häm-Kofaktors wurde angenommen, dass dieser für die Redoxwahrnehmung verantwortlich ist. Im Falle von RdmS konnte jedoch gezeigt werden, dass die redoxabhängige Phosphorylierungsaktivität unabhängig von gebundenem Kofaktor ist und dass der Redoxstatus vermutlich durch die Oxidation von Thiolen wahrgenommen wird

(Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Als potentielle Phosphorylierungsstelle(n) konnten durch Dünnschichtchromatographie Analysen Serin-/Tyrosinreste für MsmS und Tyrosinrest(e) für die Kinase RdmS ausgemacht werden (Molitor, 2013; Molitor *et al.*, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019).

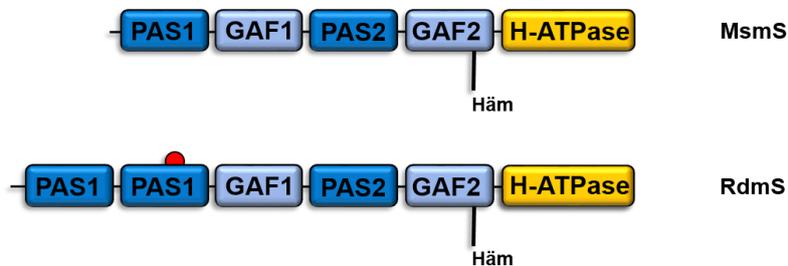


Abbildung 4. Schematische Darstellung der putativen Domänenstruktur der Sensorkinasen MsmS und RdmS. MsmS und RdmS bestehen aus alternierenden PAS- und GAF-Domänen sowie einer C-terminalen Histidin-ähnlichen ATPase-Domäne (HATPase). In der zweiten PAS-Domäne besitzt RdmS ein Amber-Codon (UAG), welches für die Aminosäure Pyrrolysin (roter Kreis) kodiert. In der zweiten GAF-Domäne haben die Kinasen kovalent einen Hämfaktor über den Cysteinrest 656 (MsmS) bzw. 620 (RdmS) gebunden. Die Domänenvorhersage von mehreren Datenbanken (InterPro, Pfam, SMART und NCBI-BLAST) wurden zusammengefügt. Vorhergesagte Domänenstruktur für MsmS: PAS1: AS 118-293; GAF1: AS 298-470; PAS2: AS 471-585; GAF2: AS 609 -761; HATPase: AS 783-998. Vorhergesagte Domänenstruktur für RdmS: PAS1: AS 33-118; PAS2: AS 163-251; GAF1: AS 277-422; PAS3: AS 458-541; GAF2: AS 572-716; HATPase: AS 852-964.

1.3 Genregulation in *Archaea*

Im Vergleich mit den Domänen *Bacteria* und *Eukarya* ist in der Domäne der *Archaea* nur sehr wenig über die molekularen Mechanismen, die der Kontrolle der Genexpression zugrunde liegen bekannt. Die basale Transkriptionsmaschinerie der *Archaea* ähnelt in ihrem grundsätzlichen Aufbau dem Transkriptionsapparat der Eukaryoten (Marsh *et al.*, 1994; Bell & Brinkman *et al.*, 2001). *Archaea* besitzen eine für Eukaryoten typische RNA-Polymerase (RNAP) des RNA-Polymerase II-Typus und Homologe zu den eukaryotischen TATA-Box-Bindeproteinen sowie den Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIE *alpha*, welche als archaeelles TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und Transkriptionsfaktor B (TFB) bzw. Transkriptionsfaktor E (TFE) bezeichnet werden. Dementsprechend besitzt der archaeelle Promotor eine TATA-Box, ein Transkriptionsfaktor B Erkennungselement (BRE-Element) und einen Transkriptionsstartpunkt (Abbildung 5) (Bartlett *et al.*, 2000; Geiduschek & Ouhammouch, 2005; Rowlands *et al.*, 1994). Die Transkriptionsinitiation der *Archaea* verläuft in mehreren Schritten und wird durch die oben genannten DNA-Elemente und basalen Transkriptionsfaktoren strikt reguliert. Den ersten Schritt zur Initiation stellt die Erkennung und Bindung der ca. 25-30 bp stromaufwärts von Transkriptionsstart lokalisierten TATA-Box durch das TBP dar (Littlefield *et al.*, 1999).

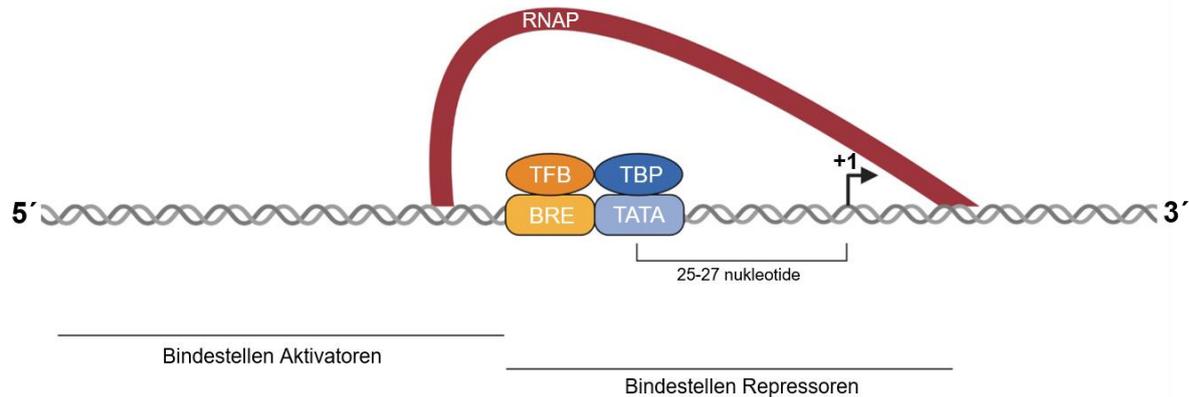


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Promotorstruktur und der basalen Transkriptionsmaschinerie in *Archaea*. Den ersten Schritt der Transkriptionsinitiation stellt die Erkennung und Bindung des archaeellen TATA-Box-Bindeproteins (TBP; dunkel blau) und des Transkriptionsfaktors B (TFB; orange) an die TATA-Box (TATA; hellblau) bzw. an das BRE-Element (BRE; gelb) dar. Der dadurch entstandene TBP/TFB/Promotorkomplex vermittelt anschließend die Assoziation der RNA-Polymerase (RNAP; rot). +1; Transkriptionsstart.

Die TATA-Box liegt direkt hinter dem purinreichen BRE-Element, welches für die Orientierung der RNAP verantwortlich ist. Im folgenden Schritt erkennt der TFB den TBP-DNA-Komplex und stabilisiert diesen durch die direkte Bindung an das TBP und das BRE-Element (Hausner *et al.*, 1996). Der dadurch entstandene Komplex aus TBP, TFB und Promotor-DNA rekrutiert dann den TFE und vermittelt die Assoziation der RNAP. Diese bindet stromabwärts der TATA-Box bis zu 18 bp hinter dem Transkriptionsstart (Abbildung 5) (Ouhammouch, 2004). Die meisten archaeellen Genome kodieren für mehrere TBP und TFB. Dabei können hohe Varianzen innerhalb der verschiedenen Spezies beobachtet werden und nicht immer entspricht die Anzahl der Gene die für die TBP kodieren, denen der *tfp*-Gene (Baliga *et al.*, 2000; Santangelo *et al.*, 2007). Daher wird vermutet, dass bestimmte TBP-TFB-Komplexe für die Expression spezifischer Gene oder Gengruppen verantwortlich sind (Hickey *et al.*, 2002). Obwohl die Transkriptionsmaschinerie der *Archaea* der der *Eukarya* ähnelt, wird dessen Aktivität von Transkriptionsregulatoren kontrolliert, die mehr Homologien zu denen der *Bacteria* aufweisen (Kyrpides & Ouzounis, 1999; Bell, Magill & Jackson, 2001). Lediglich ein geringe Minderheit weist Homologien zu eukaryotischen Proteinen auf (Aravind & Koonin, 1999; Bell & Jackson, 2001). Ein Großteil der charakterisierten archaeellen Regulatoren ist homolog zu bakteriellen Proteinen mit HTH-Motiv, wie Mitglieder der Lrp/AsnC-Familie, welche an der Regulation des Aminosäuremetabolismus und verwandten Prozessen beteiligt sind. Lrp14 aus *S. solfataricus* bindet beispielsweise im Promotor seines eigenen Gens und reprimiert die Transkription. Dabei liegt die Bindestelle in einem Bereich, der die TATA-Box und das BRE-Element verdeckt, wodurch die Bindung von TBP und TFB verhindert wird. Der Transkriptionsrepressor LrpA aus *Pyrococcus woesei* hingegen verhindert die Rekrutierung der RNAP durch die Bindung an den eigenen Transkriptionsstart (Brinkman *et al.*, 2000). Im

Gegensatz zu den transkriptionellen Repressoren binden Transkriptionsaktivatoren bevorzugt stromaufwärts des BRE-Elements und stimulieren die Rekrutierung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der RNAP (Abbildung 5). Neben den bakteriellen Homologen kodieren *Archaea* auch Transkriptionsfaktoren, die ausschließlich innerhalb dieser Domäne identifiziert werden können (Cavicchioli, 2007). Dazu zählen unter anderem die Mitglieder der Msr-Familie (vgl. Kapitel 1.2.2).

1.4 Zielsetzung

Die archaeeellen Signaltransduktionsmechanismen sind im Gegensatz zu ihren bakteriellen Pendanten weitgehend unerforscht. Neben Ein-Komponenten-Systemen, die maßgeblich für die Signalaufnahme und Signalweiterleitung verantwortlich sind konnten in der Domäne der *Archaea* auch Signaltransduktionsstrukturen identifiziert werden, die Ähnlichkeit zu bekannten eukaryotischen oder bakteriellen Systemen aufweisen. In vorangegangenen Studien konnten die zwei redoxabhängigen Sensorkinasen MsmS und RdmS aus dem methanogenen Archaeon *M. acetivorans* identifiziert und näher charakterisiert werden, die mit Genen, die für Regulatoren der Msr-Familie kodieren, assoziiert im Genom vorliegen und an der Regulation der methylsulfidspezifischen Methyltransferasen MtsH, MtsD und MtsF beteiligt sind. Diese Systeme stellen vielversprechende Modelle dar, um Signaltransduktion in *Archaea* besser zu verstehen. Für die Kinasen konnte eine redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität an Serin- oder Tyrosinresten nachgewiesen werden (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Daher wird vermutet, dass die Signalweiterleitung nicht wie in bakteriellen ZKS durch die Übertragung des Phosphatrestes auf den Regulator stattfindet, sondern dass die Kinasen und Regulatoren direkt miteinander interagieren. Mithilfe von Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie und *in vivo Crosslinking*-Experimenten sollte daher eine mögliche Interaktion zwischen den Kinasen und den Msr-Regulatoren untersucht werden. Des Weiteren sollte die Phosphorylierungsstelle(n) der Kinasen identifiziert werden, um zu überprüfen, in wie weit diese einen Einfluss auf die Interaktion mit den Regulatoren hat. Für die Msr-Regulatoren konnte zudem ein aktivierender Einfluss auf die Transkription der *mts*-Gene gezeigt werden (Bose *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus der Transkriptionsregulation ist jedoch noch weitestgehend unklar. Daher sollte in dieser Arbeit die physikalische Interaktion der Regulatoren mit der Promotorregion der *mts*-Gene *in vitro* mittels *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) untersucht werden, um den Mechanismus der Transkriptionsregulation aufzuklären.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Chemikalien

2.1.1 Geräte und Software

Tabelle 1. Verwendete Geräte und Software.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	ComPhor L Mini	Biozym
	Große Elektrophoresekammer	Hergestellt an der TU Kaiserslautern
Anaeroben Zelt	Type B/Type C (N ₂ mit 5% H ₂)	Coy Lab
Autoklav	VX-150	Systec
Biacore	Biacore™ T200	Cytiva
	Biacore™2000	GE Healthcare
Blotapparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Feinwaage	Research	Sartorius
Fluoreszenzspektrometer	FP-8300	Jasco
Geldokumentationsgerät	GeliX20 Imager	Intas
	Darkbox gel iX Imager	
	Exview HAD CCD™ Kamera	
	UV-Transilluminator "Ultra Bright"	LI-COR
	Odyssey® Fc Imaging System	Intas
Gel-Permeations- Chromatographie	ÄktaPure	GE Healthcare
	ÄktaExplorere	GE Healthcare
Horizontalschüttler	Innova 44®	New Brunswick Scientific
	SM 30 Control	Edmund Bühler
	74024	Labortechnik
	Polymax 1040	ROCKY®3D Heidolph
Inkubator	Inkubationshaube TH 30	Edmund Bühler
	Modell B 28	Binder
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
	MR Hei-Mix L	Heidolph
	PB-11	Sartorius
pH-Meter	PC 50 VioLab	XS Instruments

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Phospholmager	Cyclon	Perkin Elmer
	Typhoon FLA 7000	GE Healthcare
Photometer	Novaspec III	Amersham Bioscience
	Nanodrop™ Lite	Thermo Fisher
Pipetten	Research	Eppendorf
	Research Plus	Eppendorf
Spannungsgeber	PowerPac™ Basic	Bio Rad
	PowerPac™ HC	Bio Rad
	PowerPac™ 300	Bio Rad
Reinstwasseranlage	MilliQ® Integral Water Purification System F3MA89742B	Merck Millipore
SDS-PAGE-Kammer	Mini-Protean® Tetra cell System	Bio-Rad
	Mini-Protean® 3 cell System	Bio-Rad
Thermoblock	ThermoStat Plus	Eppendorf
Thermocycler	T-Gradient	Biometra
	T-Personal	Biometra
UV/Vis-Spektralphotometer	8453 UV-Visible System	Agilent
Vakuumpumpe	Laboport®	KNF
Vortex	Reax top	Heidolph
Waage	Acculab	Sartorius
Zellaufschlussgerät	LM 10 Microfluidizer®	Microfluidics
Zentrifugen	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Rotor F-45-24-11	
	Centrifuge 5810R	Eppendorf
	Rotor A-4-62	
	Z32HK	HERMLE
	Rotor 12/032	
	Sorvall LYNX 6000 Centrifuge	Thermo Fisher
	Rotor T29	
Rotor F9		

2.1.2 Enzyme, Antikörper, Kits und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2. Verwendete Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien.

Enzyme/Kits/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
5% Mini-PROTEAN® TBE Gel	Bio Rad
Biacore Sensor Chip CM5	Cytiva

Enzyme/Kits/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Chromatographiesäulen Poly-Prep® Chromatography Columns	Bio Rad
Dialyseschlauch Visking, MWCO 4.000 - 10.000	Carl Roth
Standardprotein für Gelfiltration	
- β -Amylase	Sigma Aldrich
- Albumin	Sigma Aldrich
- Apoferritin	Sigma Aldrich
- Alkoholdehydrogenase	Sigma Aldrich
- Carboanhydrase	Sigma Aldrich
- Blue Dextran	Sigma Aldrich
Einmalküvetten (Halbmikro)	Hartenstein
Elektrophoresemarker	
- Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher
- Unstained Protein Standard Broad Range	NEB
- Blue Prestained Protein Standard Broad Range	NEB
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Fisher
Enzyme	
- DNaseI	Roche
- Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher, NEB
- <i>Phusion</i> -HF DNA-Polymerase	NEB
- <i>Pfu</i> DNA-Polymerase	NEB
- Dream Taq Green PCR Mastermix (2x)	Thermo Fisher
Gelfiltrationssäule	
- Superdex™ 75 10/300 GL	GE Healthcare
- Superdex™ 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare
Kits	
- ADP-Glo™ Kinase Assay	Promega
- NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit	Macherey-Nagel
- Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel
- Nucleo Spin® Microbial DNA Mini Kit	Macherey-Nagel
- NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	NEB
- Quick-RNA™ Miniprep Kit	Zymo Research
- Twin-Strep-tag® Capture Kit for SPR	IBA GmbH
- His Capture Kit	GE Healthcare
Membranfilter	
- Rotilabo® RC 0,2 μ m Ø 33 mm	Carl Roth
- PVDF 0,45 μ m Ø 25 mm	Diagonal
- Roti®-PVDF-Membran	Carl Roth
Microtiterplatten LUMITRAC™ 200 (96-well)	Greiner

Enzyme/Kits/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Säulenmaterial für Affinitätschromatographie	
- Strep-Tactin®-Sephrose	IBA GmbH
- TALON® <i>Metal Affinity Resin</i>	Clontech
SYBR® Green I nucleic acid gel stain	BMA
2',3'-O-Trinitrophenyl-adenosine-5'-triphosphate, Triethylammonium salt (TNP-ATP)	Jena Bioscience
Zentrifugen Konzentratoren	
- Amicon® Ultra MWCO 10,000	Merk Millipore
- Amicon® Ultra MWCO 50,000	Merk Millipore
- Amicon® Ultra MWCO 100,000	Merk Millipore

Alle weiteren Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analysequalität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Tabelle 3. Verwendete Antikörper.

Antikörper	Nachweis	Hersteller
Strep-Tactin® AP conjugate	StrepII- <i>tag</i> (primär AK)	IBA GmbH
6x-HisTag Monoclonal Antikörper	His- <i>tag</i> (primär AK)	Thermo Fisher
Anti-Mouse IgG-Alkaline Phosphatase	Mouse IgG (sekundär AK)	Sigma Aldrich
Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase	Rabbit IgG (sekundär AK)	Sigma Aldrich
Phosphoserine/threonine/tyrosine Monoclonal Antibody	Phosphoserin/Threonine/Tyrosin (primär AK)	Thermo Fisher

2.1.3 Bakterien- und Archaeastämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Archaeastämme sind mit entsprechenden Verweisen in nachfolgender Tabelle aufgeführt (Tabelle 4). Für die Isolierung und Klonierung von Plasmiden dienten der *Escherichia coli* Stamm DH5 α . Zur Produktion rekombinanter Proteine wurden die Stämme *E. coli* BL21 (λ DE3) und *E. coli* Nissle1917 verwendet.

Tabelle 4. Verwendete Bakterien- und Archaeestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (λDE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB⁺</i>] _{K-12} (λ ^S)	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB21 80dlacZΔM15Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (r_K-m_K⁺), λ⁻</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Serotyp: O6:K5:H1	(Grozdanov <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. acetivorans</i> WWM73	Δ <i>hpt::PmcrB-tetR-ΦC31-int-attP</i>	(Guss <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. acetivorans</i> WWM 82	Δ <i>hpt::PmcrB-ΦC31-int-attP</i>	(Guss <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. acetivorans</i> WWM 380	Δ <i>hpt::PmcrB-ΦC31-int-attP ΔmsrG</i>	(Bose <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. acetivorans</i> WWM 381	Δ <i>hpt::PmcrB-ΦC31-int-attP ΔmsrF</i>	(Bose <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. acetivorans</i> WWM 332	Δ <i>hpt::PmcrB-ΦC31-int-attP ΔmsrC</i>	(Bose & Metcalf, 2008)

2.1.4 Plasmide

In Tabelle 5 sind die Eigenschaften der für diese Arbeit hergestellten bzw. verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 5. Hergestellte Plasmide.

Nr.	Plasmid	Eigenschaften	Fusions-tag	Referenz
pLOB01	pACYC-Duet1- <i>msrG</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> ; Cmp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB8	pACYC-Duet1- <i>msrG-msmS</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> und <i>msmS</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB13	pACYC-Duet1- <i>msmS</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msmS</i> ; Cmp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB9	pACYC-Duet1- <i>msrF</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrF</i> ; Cmp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB10	pACYC-Duet1- <i>msrF-msmS</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrF</i> und <i>msmS</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB11	pACYC-Duet1- <i>msrC</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrC</i> ; Cmp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB12	pACYC-Duet1- <i>msrC-msmS</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrC</i> und <i>msmS</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB19	pACYC-Duet1- <i>pebS</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>pebS</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB18	pACYC-Duet1- <i>pebS-msmS</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>pebS</i> und <i>msmS</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB14	pACYC-Duet1- <i>rdmSO216K</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmS O216</i> →K; Cmp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit

Material und Methoden

Nr.	Plasmid	Eigenschaften	Fusions-tag	Referenz
pLOB07	pACYC-Duet1- <i>pebS</i> - <i>rdmSO216K</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>pebS</i> und <i>rdmSO216K</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB06	pACYC-Duet1- <i>msrG</i> - <i>rdmSO216K</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> und <i>rdmSO216K</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB05	pACYC-Duet1- <i>msrF</i> - <i>rdmSO216K</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrF</i> und <i>rdmSO216K</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB20	pACYC-Duet1- <i>msrC</i> - <i>rdmSO216K</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrC</i> und <i>rdmSO216K</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB23	pACYC-Duet1- <i>msrG</i> - <i>msrF</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> und <i>msrF</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB24	pACYC-Duet1- <i>msrC</i> - <i>msrF</i>	pACYC-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrC</i> und <i>msrF</i> ; Cmp ^r	C-StrepII N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB3	pACYC-Duet1-c- <i>aYFP</i> - <i>msrG</i>	pCOLA-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> und c-terminale Fusion von aYFP		Diese Arbeit
	pASK-IBA3- <i>msmS</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>msmS</i> (<i>ma4561</i>); Amp ^r	C-StrepII	(Molitor <i>et al.</i> , 2013)
	pASK-IBA3- <i>rdmS</i> O216K	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmSO216K</i> (<i>ma0863</i>); Amp ^r	C-StrepII	(Kwiatkowski, 2013)
pLOB26	pASK-IBA3- <i>msrG</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> ; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit
pLOB27	pASK-IBA3- <i>msrF</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrF</i> ; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit
pLOB25	pASK-IBA3- <i>msrC</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrC</i> ; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit
pLOB32	pASK-IBA3- <i>rdmS</i> O216K-HATP	pASK-IBA3-Derivat; HATPase-Domäne von <i>rdmSO216K</i> ; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit
pLOB33	pASK-IBA3- <i>rdmSO216K</i> -GAF2-HATP	pASK-IBA3-Derivat; HATPase-Domäne von <i>rdmSO216K</i> ; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit
pLOB28	pASK-IBA3- <i>rdmSO216K</i> -Y825F	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmSO216K</i> , Y825 →F; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit
pLOB29	pASK-IBA3- <i>rdmSO216K</i> -Y913F	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmSO216K</i> , Y913 →F; Amp ^r	C-StrepII	Diese Arbeit

Nr.	Plasmid	Eigenschaften	Fusions-tag	Referenz
pLOB30	pASK-IBA3- <i>rdmSO216K-Y923F</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmSO216K</i> , Y923 →F; Amp ^r	C-StreptII	Diese Arbeit
pLOB31	pASK-IBA3- <i>rdmSO216K-Y931F</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmSO216K</i> Y931 →F; Amp ^r	C-StreptII	Diese Arbeit
	pASK-IBA- <i>msmS</i> - G2736A	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>msmS</i> G2736 →A; Amp ^r	C-StreptII	Diese Arbei
	pASK-IBA- <i>msmS</i> - A2613G	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>msmS</i> A2613 →G; Amp ^r	C-StreptII	Diese Arbei
pLOB34	pASK-IBA3- <i>mssit0767-O215K</i>	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>mssit0767</i> O215→K; Amp ^r	C-StreptII	(Köhler, 2021)
pASX04	pASK-IBA3- <i>ma4377</i> - PAS-HisKA	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>ma4377</i> (1124 bp); PAS-, HisK-Domäne; Amp ^r	C-StreptII	(Sexauer, 2021)
pASX01	pASK-IBA3- <i>ma4377</i> - PAS-HisKA-R1+2	pASK-IBA3-Derivat; kodierender Bereich von <i>ma4377</i> (2058 bp); PAS-, HisK-Domäne, Reciver1, Reciver2; Amp ^r	C-StreptII	(Sexauer, 2021)
	pBBR1- <i>msc3-T7</i> - RNAPol	Kodierender Bereich für die T7- RNA-Poymerase, Tc ^r		Drepper 2011, Jülich
pLOB3	pCOLA-Duet1-c- bYFP- <i>msrG</i>	pCOLA-Duet1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> und c-terminale Fusion von bYFP		Diese Arbeit
	pET21a(+)- <i>msrG</i>	pET21a(+)-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> (<i>ma4560</i>); Amp ^r	N-His ₆	(Molitor, 2013), Bochum
	pET21a(+)- <i>msrF</i>	pET21a(+)-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrF</i> (<i>ma0862</i>); Amp ^r	N-His ₆	Molitor 2013, Bochum
pLOB4	pET21a(+)- <i>msrC</i>	pET21a(+)-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrC</i> (<i>ma4383</i>); Amp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB15	pET21a(+)-HTH- <i>msrG</i>	pET21a(+)-Derivat; verkürzter kodierender Bereich von <i>msrG</i> ; HTH-Motiv von <i>msrG</i> (522 bp); Amp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB16	pET21a(+)-DUF1724- <i>msrG</i>	pET21a(+)-Derivat; verkürzter kodierender Bereich von <i>msrG</i> ; DUF1724-Domäne von <i>msrG</i> (237 bp); Amp ^r	N-His ₆	Diese Arbeit
pLOB22	pGEX-6P1-DUF1724- <i>msrG</i>	pGEX-6P1-Derivat; verkürzter kodierender Bereich von <i>msrG</i> ; DUF1724-Domäne von <i>msrG</i> (237)	N-GST	Diese Arbeit

Nr.	Plasmid	Eigenschaften	Fusions-tag	Referenz
pLOB17	pGEX-TEV- <i>msrG</i>	pGEX-4T-1-Derivat; kodierender Bereich von <i>msrG</i> ; Cmp ^r	C-StreptII N-His ₆	Diese Arbeit
	pSH14P46	pHERD26T-Derivat; kodierender Bereich von <i>bphP</i> aus PAO1 H513→A; Tet ^r	C-StreptII	(Heine, 2014)
	pSH14P46_H513A	pHERD26T-Derivat; kodierender Bereich von <i>bphP</i> aus PAO1; Tet ^r	C-StreptII	(Denig, 2020)
pLOB35	pNB730- <i>msmS</i> -3xFLAG	pNB730-Derivat; kodierender Bereich von <i>msmS</i> ; Amp ^r	C-Flag	(Köhler, 2021)
pLOB36	pNB730- <i>rdmS</i> -3xFLAG	pNB730-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmS</i> ; Amp ^r	C-Flag	(Köhler, 2021)
pLOB37	pNB730- <i>msmS</i> -Strep	pNB730-Derivat; kodierender Bereich von <i>msmS</i> ; Amp ^r	C-StreptII	(Köhler, 2021)
pLOB38	pNB730- <i>rdmS</i> -Strep	pNB730-Derivat; kodierender Bereich von <i>rdmS</i> ; Amp ^r	C-StreptII	(Köhler, 2021)
pLOB39	pNB237- <i>rdmS</i> -KO	pNB237-Derivat für markerlose Deletionsmutante mittels homologer Rekombination; upstream und downstream kodierender Bereich von <i>rdmS</i> ; Amp ^r		(Köhler, 2021)

2.1.5 Oligonukleotide

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics.

Tabelle 6. Verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' – 3')
1	<i>mtsH</i> -266-fwd	CCTGAAATAGGGCATTGATATTATCA
2	<i>mtsH</i> -205-fwd	CATGGTCCTGTCGAGGTCAG
3	<i>mtsH</i> -220-fwd	GTTTCTTCCTTTATTCATGGTC
4	<i>mtsH</i> -215-fwd	TTCCTTTATTCATGGTCCTGT
5	<i>mtsH</i> -210-fwd	TTATTCATGGTCCTGTCGAG
6	<i>mtsH</i> -205-fwd	CATGGTCCTGTCGAGGTCAG
7	<i>mtsH</i> -205-rev	CTGACCTCGACAGGACCATG
8	<i>mtsH</i> +158-rev	GCCATATTAACCTCCTATATTCAGG
9	<i>mtsH</i> -165-fwd	GTGCTTTCAATATCAAAACCTCCTT
10	<i>mtsH</i> -140-rev	AAGGAGGTTTTGATATTGAAAGCA
11	<i>mtsH</i> -85-fwd	CTTATCAAAAGCCCCGAGAAAATCAG
12	<i>mtsH</i> -59-rev	CTGATTTTCTCGGGCCTTTTGATAAG
12	<i>mtsH</i> +54-rev	TGTTAACCGTAATGTCTGAAGGAA

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' – 3')
13	<i>mtsH</i> -53-fwd	GCATAACCGATAGCGTTTTTCCTC
14	<i>mtsH</i> -29-rev	GAGGAAAAACGCTATCGGTTATGC
11	<i>mtsH</i> +24-rev	CAGATTCTGTAAAACCGCACTTGCAAT
12	<i>mtsD</i> -231-fwd	CCGGCTGGTAAGACCCACTA
13	<i>mtsD</i> -213-fwd	TATCCGATCAAAGCCTTTG
14	<i>mtsD</i> -183-fwd	GCCTCTGATCAAATGAGAG
15	<i>mtsD</i> -162-fwd	CCACACGAGATCAGAAAAGTTAACA
16	<i>mtsD</i> +144-rev	CGACAGCTTCCGCTAATTGG
17	<i>mtsD</i> -120-fwd	CCACACGAGATCAGAAAAGTTAACA
18	<i>mtsD</i> -88-fwd	TTCACCGAATTAAGCATCAGG
19	<i>mtsD</i> -46-fwd	AGATCTCTGCGTTTTATGTTATATG
20	<i>mtsD</i> +47-rev	ATTAACGCAGTTAACCTC
21	<i>mtsF</i> -192-fwd	TTGCAAAAAGGCCGAGAACG
22	<i>mtsF</i> +153-rev	TGTGGATTAAGGAGTATTATTAGTGA
23	<i>mtsH</i> -negK-fwd	GATTAAAGCAACAAAACCTTGCAAAAG
24	<i>mtsH</i> -negK-rev	TCAAAGAAAGCCCTGGAAACCTC
25	<i>pcyX</i> _lowGC-fwd	GAACCTGGAATAACAGATATATTAG
26	<i>pcyX</i> _lowGC-rev	CATAGGAAATAAACATAGATGAGC
27	pET21a- <i>msrC</i> -fwd	GCTTAGCATATGATGCATGGTTGGA
28	pET21a- <i>msrC</i> -rev	CGCATACTCGAGGATGATTTTCTC
29	pASK- <i>msrG</i> -gb-fwd	ATGAATAGTTCGACAAAAATATGAAACTGGAATTGTTGGG
30	pASK- <i>msrG</i> -gb-rev	GTGGCTCCAAGCGCTGAGACTGAGTTCCGACGTG
31	pASK- <i>msrC</i> -gb-fwd	ATGAATAGTTCGACAAAAATATGCATGGTTGGAAGCTG
32	pASK- <i>msrC</i> -gb-rev	GTGGCTCCAAGCGCTGAGACTGATGATTTTCTCCGAGC
33	pASK-rdmS-Y825F-fwd	TACTCTCGGATGTTTTCTCAATCTTGTCCT
34	pASK-rdmS-Y825F-rev	AGGACAAGATTGAGGAAAACATCCGAGAGTA
35	pASK-rdmS-Y913F-fwd	CTTGCCACAGGATCTTCCAGGTGGACGATTCC
36	pASK-rdmS-Y913F-rev	GGAATCGTCCACCTGGAAGATCCTGTGGAAG
37	pASK-rdmS-Y923F-fwd	CCTCACCCGCAGGTTTCAGGGCCTTGAATC
38	pASK-rdmS-Y923F-rev	GATTCAAGGCCCTGAAACCTGCGGGTGAGG
39	pASK-rdmS-Y931F-fwd	TTGAATCGGGGTCTTTATCTGCAAAAACAT
40	pASK-rdmS-Y931F-rev	ATGTTTTTGCAGATAAAGAACCCCGATTCAA
41	pASK- <i>msmS</i> 2736G-C-fwd	CACTCCGAGGGGGCAAGCTGGCACTGGA
42	pASK- <i>msmS</i> 2736G-C-rev	TCCAGTGCCAGCTTGCCCCCTGCGGAGTG
43	pASK- <i>msmS</i> 2613A-G-fwd	TCTGATCGGTGAAAAGGCCCTGGAGGTAA
44	pASK- <i>msmS</i> 2613A-G-rev	TTAACCTCCAGGGCCTTTTCACCGATCAGA
45	MSSIT0767-gb- <i>iba</i> -fwd	GGCAAAAAATGGGAGACCGCATGAAAAAGTTCGATATAAATCTTG
46	MSSIT0767-gb- <i>iba</i> -fwd	TGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCCTCTATTTCGATTCATG
47	pASK-HATP-rdms-gb-fwd	TCTAGATAACGAGGGCAAAAATGCTTGAAGACGCCCTG
48	pASK-HATP-rdms-gb-rev	CGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCAGACTCTATTTGATTCATGC
49	pASK-GAF2-HATP-rdmS-gb-fwd	TCTAGATAACGAGGGCAAAAATGCTGAACGAAGCCAGG
50	pACYC- <i>msrG</i> -gb-fwd	CATCACCACAGCCAGGATGCCAAAACCTGGAATTGTTGGAAC

Nr.	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' – 3')
51	pACYC- <i>msrG</i> -gb-rev	CTGTTTCGACTTAACATTATTTAGAGTTCCGACGTGGTAATC
52	pACYC-pebS-gb-fwd	accatcatcaccacagccagACTAAAAACCCAAGAAATAACAAAC
53	pACYC-pebS-gb-rev	gttcgacttaagcattatgcTTATCATTGTATGAAAAAAGGAAATC
54	ACYC- <i>msms</i> -gb-fwd	gtataagaaggagatatatacaATGATAGGTGTTGACATG
55	ACYC- <i>msms</i> -gb-rev	cagcggtttctttaccagacTTATTATTTTTTCGAACTGCG
56	ACYC-0863-gb-fwd	GTATAAGAAGGAGATATACAATCGATA
57	ACYC-0863-gb-rev	CAGCGGTTTCTTCTTTACCAGACTTATTTTTTCG
58	ACYC- <i>msrF</i> -gb-fwd	GTATAAGAAGGATATACAATGTGGAGCCACCCGCG
59	ACYC- <i>msrF</i> -gb-rev	TATCCAATTGAGATCTGCCATTAGGTCTTCTCTAATTCGATTTCCATT TCC
60	ACYC- <i>msrC</i> -gb-fwd	GTATAAGAAGGAGATATACAATGTGGAGCCACCCGCG
61	ACYC- <i>msrC</i> -gb-rev	TATCCAATTGAGATCTGCCATTAGATGATTTTTCTCCGAGCGGTC
62	<i>msrG</i> -in-fwd	GCTGGCCTGTAGAAACCGT
63	<i>msrG</i> -in-rev	CGCTCATCAGTGCATGGTTG
64	<i>msrF</i> -in-fwd	GCTATTGATGGAGGAGCCCA
65	<i>mtsF</i> -in2-rev	CCACACGAGATCAGAAAAGTTAACA
66	<i>msrF</i> -in-rev	AGGTCTTCTCCCCATTTGAGG
67	<i>msrC</i> -in-fwd	GAGTTCCTTATAGACTTGATTTTC
68	<i>msrC</i> -in-rev	TCAATGTAATACTGGGCAAGTTC
69	<i>msmS</i> -in-fwd	GCTGGCCTGTAGAAACCGT
70	<i>msmS</i> -in-rev	ACCAGATCTCCCCTTTGTGG
71	<i>mtsH</i> -fwd	ATGGCAATTGAAAATGAAAATCAAGGAGC
72	<i>mtsH</i> -rev	TTATCCTATCATCATCTTCTGGAGTTCTGG
73	<i>mtsD</i> -fwd	ATGGCAGCAGATATTTTGAACCAATTAGC
74	<i>mtsD</i> -rev	GGCACACCATCCCGAAAAAAGTTGCC
75	<i>mtsF</i> -fwd	ATGGCAAAGAAGATATTCTGAATACTTTAGC
76	<i>mtsF</i> -rev	CCCGATTATCTTTTTGTAGAGCTCC
77	<i>mtsH</i> -RT-Buan-fwd	GCTGCATGATGGGTGAAAGTG
78	<i>mtsH</i> -RT-Buan-rev	GCCTTCCGGCGAGTTGT
79	<i>mtsD</i> -RT-Buan-fwd	AACGGCCTCCAGTCCAAGTA
80	<i>mtsD</i> -RT-Buan-rev	CCACCTGGCGGGATCTC
81	<i>mtsF</i> -RT-Buan-fwd	ACGGCCCTCGATGCAA
82	<i>mtsF</i> -RT-Buan-rev	GCTCGCTTACAAGGGAGGTAAG
83	<i>rpoA1</i> -RT-Buan-fwd	ATGCAGAAGCTCGGAAAAGC
84	<i>rpoA1</i> -RT-Buan-rev	GTCCCATGTGGCTATCTGCAA
85	<i>msrG</i> -deletion-fwd	TAATGTCCACATCGTGATTGCAGACAGCGGAA
86	<i>msrG</i> -deletion-rev	ACGGAAAGTACCGGTACCCTATCCGCA
87	<i>msrF</i> -deletion-fwd	AAAGAAGCCTGAAACCCGACGCATGAATCAAA
88	<i>msrF</i> -deletion-rev	GGGAAAGACCGCTCTCCTGCGTC
89	<i>msrC</i> -deletion-fwd	GGTTTCAAACCCCTTAATTTCCAGGTCGTATA
90	<i>msrC</i> -deletion-rev	ATGAACATGTACAGAGAATCACGGGAATTAAA

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Nährmedien und Zusätze

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen in autoklaviertem, selektivem Luria Bertani (LB)- oder Hochsalz (HS)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Durch die Zugabe von Agar-Agar vor dem Autoklavieren wurde Festmedium hergestellt.

LB-Medium:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
(1,5% (w/v) Agar-Agar)

LB-HS-Medium:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
24,22 g/l NaCl
(1,5% (w/v) Agar-Agar)

Sämtliche Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Membranfiltern (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert und dem jeweiligen Medium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur unter 60 °C zugesetzt.

Tabelle 7. Medienzusätze.

Zusatz	Konzentration	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cmp) ¹	34 mg/ml	34 µg/ml
Tetrazyklin (Tc) ¹	10 mg/ml	10 µg/ml
Anhydrotetrazyklin (AHT) ^{1,2}	2 mg/ml	200 µg/ml
Disuccinimidyl suberat (DSS) ²	2 mg/432 µl	12,5 mM
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	1 M	0,25 mM

¹) gelöst in 70%-igem (v/v) Ethanol

²) gelöst in DMF

2.2.2 Lagerung von *E. coli* Zellen

Die Lagerung von *E. coli* Zellen erfolgte in einer Glycerinkultur. Dabei wurden 700 µl einer Übernachtskultur mit 700 µl sterilem Glycerin (80% v/v) versetzt. Anschließend wurde die Suspension gevortext und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Kultivierung von *E. coli* Zellen

Für die Vorkulturen wurde die gewünschte Menge an LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt und mit *E. coli* Einzelkolonien beimpft. Die Zellen wurden über Nacht (ü. N.) bei 37 °C und 180 rpm (SM 30 Control, Edmund Bühler) inkubiert. Für die Hauptkulturen wurden entsprechende Volumina an LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt, 1:100 mit der Vorkultur verdünnt und bei 37 °C und 100 rpm (SM 30 Control, Edmund Bühler) bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Für die Kultivierung auf LB-Agarplatten wurden *E. coli*-Zellen aus einer Glycerinkultur mittels Drigalskispatel auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und ü. N bei 37 °C inkubiert.

2.2.4 Medium *M. acetivorans*

Die Kultivierung von *M. acetivorans* erfolgte unter anaeroben Bedingungen in autoklaviertem HS-Medium. Für die Herstellung von 1 l HS-Medium wurden 100 ml 10x Mix A und 100 ml 10x Mix B versetzt mit je 1 ml 500x Spurenelementen und 500x Vitaminlösung in eine 3 l rundboden Flasche gegeben und auf 1 l mit H₂O_{dest.} aufgefüllt. Anschließend wurden 20 mM MOPS hinzugegeben und ein pH-Wert von 7 eingestellt. Die Lösung wurde für 10 min unter ständigem Gasstrom (N₂) gekocht, ehe sie für 30 min unter Gasstrom auf Eis abgekühlt und in das anaerobe Zelt (Coy Lab) eingeschleust wurde. Im Zelt erfolgte nacheinander die Zugabe von NH₄Cl und Cystein-HCl bis ein Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin von dunkelblau zu rosa (teil reduziertes Resorufin) stattfand. Anschließend wurden dem Medium Na₂S zur vollständigen Reduktion des Resorufin zu Dihydroresorufin und die entsprechenden Zusätze zugegeben und das Medium mit anaerobisiertem H₂O_{dest.} auf 1 l aufgefüllt. Das Medium wurde in Serumflaschen oder anaerobe Kulturröhrchen (Balch-Typ) abgefüllt, mit Butylstopfen und Aluminium-Bördelkappen gasdicht verschlossen und aus dem Zelt ausgeführt. Anschließend wurde die Gasphase auf 40 kPa N₂/CO₂ (80:20 [v/v]) durch 3 aufeinander folgenden Gasvakuum-Zyklen (3x 20 s 0,4 bar und 2x 20 s Vakuum) eingestellt.

Tabelle 8. Zusammensetzung des HS-Medium für die Kultivierung von *M. acetivorans*.

	Zusatz	Konzentration	Endkonzentration
10x Mix A	NaCl		400 mM
	KCl		13 mM
	Resazurin	0,1% (v/v)	4 µM
	500x Spurenelemente		
	500x Vitaminlösung		
10x Mix B	MgCl ₂ x 6H ₂ O		45 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O		2 mM
Spurenelemente¹			
	Nitritotriessigsäure	58 mM	58 µM
	FeSO ₄ x 7H ₂ O	20 mM	20 µM
	Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O	11 mM	11 µM
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	4 mM	4 mM
	MnSO ₄ x H ₂ O	6 mM	6 mM
	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	4 mM	4 µM
	Na ₂ WO ₄ x H ₂ O	3 mM	3 µM
	ZnSO ₄ x H ₂ O	3 mM	3 M
	NiCl ₂ x 6H ₂ O	12 mM	12 µM
	H ₃ BO ₃	1,6 mM	1,6
	CuSO ₄	0,4 mM	0,4 µM
Vitaminlösung²			
	p-Aminobenzoesäure	264,5 µM	729 nM
	Nicotinsäure	406 µM	812 nM
	Ca-Panthenat	209,5 µM	419 nM
	Pyridoxin-HCl	243 µM	486 nM
	Riboflavin	133 µM	266 nM
	Thiamin-HCl	148 µM	296 nM
	Biotin	102 µM	204 nM
	Folsäure	56,5 µM	113 nM
	α-Liponsäure	121 µM	242 nM
	Vitamin B12	18,5 µM	37 nM

¹⁾ 500x konzentriert in 200 ml H₂O, pH 6,5, autoklaviert

²⁾ 500x konzentriert in 200 ml H₂O, sterilfiltriert

Tabelle 9. Substrate für die Kultivierung von *M. acetivorans*.

Zusatz	Konzentration	Endkonzentration
Trimethylamin ¹	5 M	50 mM
Dimethylamin ¹	5 M	50 mM
Monomethylamin ¹	5 M	50 mM
Methanol ¹	25 M	125 mM

¹⁾ vorbereitet in 10 ml Serumflaschen, begast mit N₂/CO₂ (80/20 [v/v]) für 30 min, autoklaviert

2.2.5 Kultivierung von *M. acetivorans*

Die Kultivierung von *M. acetivorans* erfolgte in 10 ml HS-Medium in anaeroben Kulturröhrchen (Balch-Typ) oder in 50 ml HS-Medium in Serumflaschen. Lösliche Substrate wie Methanol, TMA, DMA und MMA wurden dem Medium mit einer sterilen Kanüle vor der Inokulation hinzugefügt. Für die Kultivierung wurde die gewünschte Menge *M. acetivorans* Vorkultur mithilfe einer sterilen Kanüle, welche vorab mit N₂/CO₂ (80:20 [v/v]) gespült wurde, entnommen und in HS-Medium überführt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der gewünschten OD_{600nm} bei 37 °C und 160 rpm (SM 30 Control, Edmund Bühler) inkubiert.

2.2.6 Lagerung von *M. acetivorans* Zellen

Die Lagerung von *M. acetivorans* Zellen erfolgte in einer Glycerinkultur. Dabei wurde 1 ml einer anaeroben Kultur mit 3 ml anaerobisiertem, sterilem (80% (v/v)) Glycerin in einem anaeroben Kulturgefäß (Balch-Typ) versetzt. Anschließend wurde die Suspension gevortext und bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600nm}) bestimmt. Das jeweilige Kulturmedium diente dabei als Referenz.

2.2.8 Zellaufschluss *M. acetivorans*

Für den Zellaufschluss wurden die zuvor hergestellten *M. acetivorans* Kulturen (OD_{600nm} von ~0,1 - 0,2) in ein Falcon überführt und für 10 min bei 4 °C (4.000 rpm; Z32HK, Rotor12/032) zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation sollte eine deutliche Brauchfärbung der Suspension vorhanden sein. Die lösliche Fraktion wurde im Anschluss durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 4.000 rpm; Z32HK, Rotor12/032) von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

Aufschlusspuffer:

50 mM Tris-HCl
pH 7,0

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente Bakterienzellen besitzen die Eigenschaft, fremde DNA-Moleküle aus ihrer Umgebung aufzunehmen. *E. coli* Zellen sind jedoch nicht natürlich kompetent, sondern müssen erst durch eine chemische Methode kompetent gemacht werden. Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit einer *E. coli*-Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden zentrifugiert (4 °C, 5 min, 4000 rpm; Z32HK, Rotor12/032), in 50 ml eiskaltem CaCl₂ (50 mM) aufgenommen und anschließend 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C, 5 min, 4000 rpm; Z32HK, Rotor 12/023) wurde das Pellet in 5 ml gekühltem CaCl₂ (50 mM) mit 15% (v/v) Glycerin resuspendiert. Aliquots (200 µl) dieser Lösung wurden bei -80 °C gelagert. Kompetente *E. coli* Nissle1917-Zellen wurden maximal 3 Monate gelagert.

2.3.2 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation von *E. coli* Zellen wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 100 pg - 1 ng Plasmid-DNA oder 15 µl einer Gibson-Reaktion erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min. Nach der Zugabe von 700 µl LB-Medium wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm (SM 30 Control, Edmund Bühler) geschüttelt. Danach wurden 100 µl der Kultur auf selektiven LB-Agar-Platten ausplattiert und ü. N. bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert.

Da für die Koexpression mehr als ein Plasmid in die *E. coli*-Zellen transformiert werden musste, wurde hier zunächst, wie beschrieben, ein Plasmid in kompetente Zellen transformiert. Anschließend wurden aus einer Einzelkolonie, die dieses Plasmid trägt, chemisch kompetente Zellen hergestellt, die anschließend wieder mit dem nächsten Plasmid transformiert werden konnten.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Easy Pure Kit

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin® Plasmid Easy Pure Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Für die Isolierung von Plasmiden mittels alkalischer Lyse wurden 2 ml einer Vorkultur für 1 min bei 13000 rpm (Centrifuge 5415D, Rotor F45-24-11) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl P1 versetzt mit RNase A (100 mg/ml) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit je 300 µl P2 und P3 versetzt, der Ansatz invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem 15-minütigem Zentrifugationsschritt (RT, 13000 rpm; Centrifuge 5415D, Rotor F 45-24-11) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 800 µl 100% (v/v) Ethanol versetzt, ehe die Lösung erneut für 15 min bei 13000 rpm (Centrifuge 5415D, Rotor FS 45-24-11) zentrifugiert wurde. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei 37°C getrocknet und in 50 µl H₂O_{dest.} gelöst.

P1 (Resuspensionspuffer):

25 mM Tris
50 mM Glucose Monohydrat
10 mM EDTA
pH 8,0 (HCl)

P2 (alkalischer Lysepuffer):

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

P3 (Äquilibrierung des pH-Werts):

3 M Natriumacetat
pH 5,5

2.3.5 Präparation von genomischer DNA aus *M. acetivorans*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *M. acetivorans* wurden 50 ml einer Kultur mit entsprechendem Supplement, bei 37 °C bis zum Erreichen der stationären Phasen inkubiert und die Zellen für 10 min bei 4000 rpm (Centrifuge 5415D, Rotor FS 45-24-11) pelletiert. Anschließend wurden 0,5 g der Zellen in 150 µl 50 mM Tris/HCl pH 7 resuspendiert. Alle weiteren Schritte wurden mit dem NucleoSpin® Microbial DNA Mini Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.6 Präparation von RNA aus *M. acetivorans*

Für die Isolierung von RNA aus *M. acetivorans* wurden 50 ml einer Kultur mit entsprechendem Supplement bei 37 °C bis zum Erreichen der mittleren exponentiellen Phasen inkubiert. Anschließend erfolgte unter anaeroben Bedingungen die Zugabe von 5 ml RNA-Stopplösung, ehe die Zellen für 10 min bei 4000 rpm (Centrifuge 5415D, Rotor FS 45-24-11) pelletiert

wurden. Alle weiteren Schritte wurden mit dem Quick-RNA™ Miniprep Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die gesamte RNA wurde in 50 µl H₂O_{dest.} eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet, zwecks Dokumentation jedoch an dieser Stelle aufgeführt.

2.3.7 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA aus RNA erfolgte mittels reverser Transkription. Hierzu wurde 1 µg RNA mit 2 µl Random Primer Mix (60µM) und 2 µl 10 dNTPs (10 mM) in einem Gesamtansatz von 20 µl versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Für die cDNA Synthese wurde der Ansatz mit dem Reaktionsmix versetzt und für 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei 42 °C für 1 h. Die Enzyme wurden durch einen weiteren Inkubationsschritt bei 65 °C für 20 min denaturiert und die cDNA wurde abschließend mithilfe des Nucleo Spin®Gel and PCR Clean-up-Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Kapitel 2.3.3 und 2.3.11) und durch Messung der UV-Absorption (Kapitel 2.3.8) quantifiziert. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet, zwecks Dokumentation jedoch an dieser Stelle aufgeführt.

cDNA Reaktionsmix:

8 µl	5x ProtoScript II Puffer
4 µl	0,1 M DTT
1 µl	ProtoScript II RT (200 U/µl)
0,4 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl)
ad 20 µl	Nukleasefreies H ₂ O

2.3.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA sowie von RNA in wässriger Lösung wurde durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Verunreinigungen durch Proteine lassen sich durch das Verhältnis A_{260nm}/A_{280nm} erkennen. Bei DNA gilt ein Verhältnis von 1,8 und bei RNA gilt ein Verhältnis von 2 als angemessener Wert (Lottspeich & Zorbas, 1998). In Abhängigkeit des pH-Werts der Probe kann eine Verschiebung dieser Werte um 0,2 bis 0,3 stattfinden. Das A_{260nm}/A_{230nm}-Verhältnis ist eine zweite Kontrolle der Reinheit von DNA bzw. RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen (Desjardins & Conklin, 2010).

2.3.9 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Dabei wandert die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Kleinere Fragmente durchqueren die Gelmatrix schneller als größere Fragmente. Zur Herstellung der Agarosegele wurden entsprechende Mengen an Agarose eingewogen, mit entsprechendem Volumen an 1x TAE-Laufpuffer aufgekocht und in einen Gelschlitten gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung für 5 min inkubiert, ehe die DNA-Banden durch die Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) in der Geldokumentationsanlage visualisiert wurden. Als Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix verwendet.

50x TAE-Laufpuffer:

2 M Tris-Acetat
50 mM EDTA
pH 8,0 (HCl)

6x DNA-Probenpuffer:

87% (v/v) Glycerin
0,25% (w/v) Bromphenolblau
250 mM EDTA

2.3.10 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte wurde mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) durchgeführt (Mullis & Faloona, 1987). Für die Durchführung der PCR wurde entweder die *Phusion*-HF DNA-Polymerase oder die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet.

Standard PCR-Ansatz für die *Phusion*-HF DNA-Polymerase:

10-100 ng Template DNA
1 µl dNTPs (200 µM je Nukleotid)
100 pmol Primer-*fwd*
100 pmol Primer-*rev*
10 µl 5x *Phusion*-HF Puffer
1 U *Phusion*-HF Polymerase
ad 50 µl H₂O_{dest.}

Tabelle 10. Standard PCR-Temperaturprogramm für die *Phusion*-HF DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Primäre Denaturierung	98 °C	30 s	
2. Denaturierung	98 °C	10 s	
3. Annealing	$T_m - 5$ °C	30 s	x 30 Zyklen
4. Elongation	72 °C	15-30 s/kb	
5. Finale Elongation	72 °C	420 s	
6. Lagerung	4 °C	∞	

2.3.11 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von cDNA und der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Purification Kits gemäß den Angaben des Herstellers nach dem PCR-*clean-up*-Protokoll durchgeführt.

2.3.12 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bei der DNA-Restriktion wird durch Restriktionsendonukleasen ein Doppelstrangbruch der DNA herbeigeführt. Bei den durchgeführten DNA-Restriktionen wurden sowohl konventionelle als auch „*Fast Digest*“ Restriktionsenzyme sowie der dazugehörige Restriktionspuffer eingesetzt und diese entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Wurden mehrere Enzyme zum Verdau benötigt, so wurde dieser sequenziell durchgeführt. Die erfolgreiche Restriktion von Plasmid-DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.3.9) überprüft.

Standard Restriktionsansatz:

1 µg Template DNA
1 µl Restriktionsenzym
4 µl 10x Restriktionspuffer
Ad 40 µl H₂O_{dest.}

2.3.13 Klonierung /Gibson Assembly

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Plasmid-Konstrukte hergestellt (Tabelle 5). Die Herstellung erfolgte über die Methode des Gibson Assembly® (NEBuilder HiFi DNA Assembly® Cloning Kit, NEB). Dazu wurde mit speziell entworfenen Oligonukleotiden (Kapitel 2.1.5) ein PCR-Produkt mit 15-20 bp überlappenden Enden generiert, die mit der Zielvektorsequenz

übereinstimmen. Die gewonnene DNA wurde mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly® Cloning Kit in den entsprechenden Vektor, der vorab mittels Restriktionsverdau (Kapitel 2.3.12) linearisiert wurde, rekombiniert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Plasmide (Kapitel 2.1.4) standen anschließend zur Transformation in die entsprechenden *E. coli*-Zellen zur Verfügung.

2.3.14 Ortsspezifische Mutagenese

Bei der zielgerichteten Mutagenese können Mutationen in ein Gen eingebracht werden und der daraus resultierende Effekt auf die Proteinstruktur oder Proteinaktivität überprüft werden. Hierbei wird durch spezielle Oligonukleotide (Kapitel 2.1.5) ein Basenaustausch innerhalb des Genes erzeugt. Als Ausgangskonstrukt wurde das Plasmid mit entsprechendem Gen ohne Mutation verwendet. Die PCR-Reaktion erfolgte, wie in Kapitel 2.3.10 beschrieben, mit angepasster Elongationsdauer entsprechend der Konstruktgröße. Die Methylierung des parentalen Ausgangskonstruktes erlaubt es anschließend, dieses mittels Restriktionsverdau (Kapitel 2.3.12) mit *DpnI* aus dem Reaktionsansatz zu eliminieren. Das entstandene Plasmid (Kapitel 2.1.4) stand anschließend zur Transformation in die entsprechenden *E. coli*-Zellen zur Verfügung.

2.3.15 Sequenzanalyse von DNA

Zur Überprüfung der klonierten und mittels ortsspezifischer Mutagenese erzeugten Plasmide sowie der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden Sequenzanalysen nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firmen Eurofins Genomics und SeqIT. Dazu wurde Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 80-100 ng/μl und PCR-Produkte mit einer Konzentration von 20-80 ng/μl mit den entsprechenden Oligonukleotiden (5 μM) in einem Gesamtvolumen von 10 μl verwendet.

2.4 Proteinbiochemische und analytische Methoden

2.4.1 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine

2.4.1.1 Proteinproduktion in *E. coli*

Die Produktion rekombinanter Proteine erfolgte heterolog in *E. coli* BL21 (λ DE3) oder *E. coli* Nissle1917. Für die Produktion der Sensorinasen MsmS und RdmS wurde der Bakterienstamm *E. coli* Nissle1917 verwendet, da dieser das *chuA*-Gen im Genom integriert trägt. *ChuA* kodiert für einen in der äußeren Membran liegenden Häm-Rezeptor, der für die Aufnahme von extrazellulärem Häm verantwortlich ist, das infolgedessen während der Proteinproduktion quantitativ in die Sensorinasen eingebaut werden kann (Fiege *et al.*, 2018). Für die Produktion wurden *E. coli*-Hauptkulturen bei 37 °C und 100 rpm (Innova[®]44, New Brunswick Scientific) bis zu einer OD_{600nm} von ~0,6 für *E. coli* BL21 (λ DE3) und bis zu einer OD_{600nm} von ~1,2 für *E. coli* Nissle1917 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen statisch bis zum Erreichen einer Temperatur von 30 °C bzw. 17 °C heruntergekühlt, ehe die Proteinproduktion mit dem entsprechenden Induktor (IPTG oder AHT) induziert wurden. Die Produktion der Proteine erfolgte dann entweder bei 30 °C und 100 rpm (Innova[®]44, New Brunswick Scientific) für 3 h oder ü. N. bei 17 °C und 100 rpm (Innova[®]44, New Brunswick Scientific). Die Parameter für die Produktion der Proteine sind in folgender Tabelle dargestellt (Tabelle 9). Die Koexpression mehrerer Proteine erfolgte ü.N. bei 17 °C und 100 rpm (Innova[®]44, New Brunswick Scientific).

2.4.1.2 Zellernte und Zellaufschluss

Bei der Zellernte wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C (9.000 rpm; Sorvall LYNX 6000 Centrifuge, Rotor T9) zentrifugiert und die pelletierten Zellen anschließend bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde ein Aliquot gefrorener Zellen auf Eis aufgetaut, in 15-40 ml des entsprechenden Aufschlusspuffers (Puffer W_{His}, Puffer W) resuspendiert und nach der Zugabe von 0,25 mM AEBSF, 0,1 mM DTT und je einer Spatelspitze DNaseI und Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch mittels Microfluidizer[™] zweimal bei einem konstanten Druck von 15000 PSI aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (1 h, 4°C, 19000 rpm; Sorvall LYNX 6000 Centrifuge, Rotor T29) von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

Puffer W_{His}:

50 mM Tris
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 7,0 (HCl)

Puffer W:

100 mM Tris
300 mM NaCl
1 mM EDTA
pH 8,0 (HCl)

2.4.1.3 Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie

Um die gewünschten Proteine aus dem Gesamtzelllysat zu isolieren, wurde die Methode der Affinitätschromatographie verwendet. Dabei wird die Eigenschaft genutzt, dass die Fusionsproteine mit einer hohen Affinität an das Säulenmaterial binden. In Abhängigkeit des fusionierten *tag* wurde entweder TALON[®] *Metal Affinity Resin* oder Strep-Tactin-Sepharose[®] verwendet. Die Affinitätschromatographiesäulen wurden nach Herstellerangaben äquillibriert, bevor das jeweilige Zelllysat aufgetragen wurde. Anschließend wurden die Säulen mit entsprechendem Waschpuffer gewaschen und die Fusionsproteine mit einem geeigneten Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die eluierten Proteine wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt und über eine *Sodiumdodecylsulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Kapitel 2.4.2) aufgetrennt. Die Säule wurde anschließend gemäß Herstellerangaben regeneriert und bis zur weiteren Verwendung auf 20% (v/v) Ethanol oder Puffer R bei 4 °C gelagert. Die Parameter der Reinigung der unterschiedlichen Fusionsproteine sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Geeignete Elutionsfraktionen wurden nach der Reinigung vereinigt und für nachfolgende Untersuchungen in geeignete Puffer umgepuffert (Kapitel 2.4.5).

Tabelle 11. Reinigung von StrepII- und His₆-tag-Fusionsproteinen.

	His ₆ -tag	StrepII-tag
Säulenmaterial	TALON [®] (Co-NTA)	Strep-Tactin-Sepharose
1 SV* (ml)	2-4	2-4
Äquillibrieren mit:	10 SV H ₂ O _{dest.} 10 SV* Puffer W _{His}	10 SV* Puffer W
	Lysat auftragen	
Waschen (W ₁)	1 SV* Puffer W _{His}	1 SV* Puffer W
Waschen (W ₂)	10 SV* Puffer W _{His}	10 SV* Puffer W
Elution	6-9x 1 ml Puffer E _{His}	6-9x 1 ml Puffer E _{Strep}
Regeneration	10 SV* Puffer W _{His} 10 SV* H ₂ O _{dest.} 5 SV* 20% (v/v) EtOH	10 SV* Puffer R

* Säulenvolumen

Puffer W_{His}:

50 mM Tris
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 7,5 (HCl)

Puffer E_{His}:

Puffer W_{His}
150 mM Imidazol

Puffer W:

50 mM Tris
300 mM NaCl
1 mM EDTA
pH 8,0 (HCl)

Puffer E_{Strep}:

Puffer W_{Strep}
150 mM d-Desthiobiotin

Puffer R:

Puffer W_{Strep}
1 mM HABA

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach deren Größe erfolgt über eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Bevor die Proben auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden, wurden diese mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele für 50 min bei 180 V und für 10%ige SDS-Polyacrylamidgele für 50 min bei 200 V in 1x SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard wurde der Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder, der Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder oder der Unstained Protein Standard Broad Range verwendet.

4x Sammelgelpuffer:

1,5 M Tris
0,4% (w/v) SDS
pH 6,8 (HCl)

4x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris
0,4% (w/v) SDS
pH 8,8 (HCl)

Stoppgel:

420 µl Rotiphorese Gel 30
(30% (v/v) Acrylamid,
0,8% (v/v) Bisacrylamid)
250 µl 4x Trenngelpuffer
330 µl H₂O_{dest.}
20 µl 10% (w/v) APS-Lösung
4 µl TEMED

Trenngel (12,5%):

6,7 ml Rotiphorese Gel 30
(30% (v/v) Acrylamid,
0,8% (v/v) Bisacrylamid)
4 ml 4x Trenngelpuffer
5,3 ml H₂O_{dest.}
80 µl 10% (w/v) APS-Lösung
8 µl TEMED

Trenngel (10%):

5,3 ml Rotiphorese Gel 30
(30% (v/v) Acrylamid,
0,8% (v/v) Bisacrylamid)
4 ml 4x Trenngelpuffer
6,7 ml H₂O_{dest.}
80 µl 10% (w/v) APS-Lösung
8 µl TEMED

Sammelgel (5,25%):

1,4 ml Rotiphorese Gel 30
(30% (v/v) Acrylamid,
0,8% (v/v) Bisacrylamid)
2 ml 4x Sammelgelpuffer
4,6 ml H₂O_{dest.}
30 µl 10% (w/v) APS-Lösung
20 µl TEMED

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris
1,92 M Glycin
1% (w/v) SDS
pH 8,3 (HCl)

4x SDS-Probenpuffer:

100 mM	Tris
110 mM	SDS
40% (w/v)	Glycerin
3 mM	Bromphenolblau
2 mM	β -Mercaptoethanol

2.4.3 Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurde dieses für ca. 5 min bei RT in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung entfärbt. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass Coomassie Brilliant Blue (G250) als Farbstoff an basische Aminosäuren bindet und diese färbt.

Coomassie-Färbelösung:

10% (v/v)	Essigsäure
0,25% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue (G250)
30% (v/v)	Ethanol

Entfärbelösung:

30% (v/v)	Ethanol
10% (v/v)	Essigsäure

2.4.4 Kolloidale-Coomassie-Färbung

Die Kolloidale-Coomassie-Färbung wurde zur Visualisierung von Proteinen, die mittels tryptischen In-Gel Verdau für die massenspektroskopischen Analysen verwendet wurden, angewandt. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel zwei Mal für jeweils 10 min in Fixierlösung inkubiert, ehe es zwei Mal für 5 min in $H_2O_{\text{dest.}}$ gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gel in der Färbelösung für 3 h oder ü. N. inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde das Gel anschließend in 1%iger Essigsäurelösung unter ständigem Schütteln inkubiert

2.4.5 Umpufferung (Dialyse) und Konzentrierung isolierter Proteine

Zur Umpufferung oder Entfernung des Imidazol bzw. d-Desthiobiotin aus dem Puffer wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung in Dialyseschläuchen mit entsprechenden Ausschlussgrenzen von 7 kDa oder 14 kDa ü. N. bei 4 °C unter ständigem Rühren gegen das 200fache Volumen des gewünschten Puffers umpuffert. Anschließend wurde die umpufferte Proteinlösung in Amicon Ultra Zentrifugen-Konzentratoren

(Ausschlussgrenze 10 kDa, 50 kDa und 100 kDa) auf das gewünschte Volumen durch Zentrifugieren bei 4 °C und 4000 rpm (Z32HK, Rotor 12/032) reduziert.

Natriumphosphatpuffer:

150 ml	Lösung A
	(50 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O = 6,89 g/l)
850 ml	Lösung B
	(50 mM Na ₂ HPO ₄ = 7,09 g/l)
100 mM	NaCl
	pH 7,5

Kinasepuffer:

50 mM	Tris
50 mM	KCl
150 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂
10% (v/v)	Glycerin
	pH 7,5

2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von heterolog produzierten Proteine erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 280 nm. Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ der Proteine wurde mit der Software Protein Calculator v3.4 nach der Methode von Gill und van Hippel ermittelt (Tabelle 12) (Gill & van Hippel, 1989).

$$c \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \times d \times F}$$

A_{280} = Absorption bei 280 nm in AU

c = Konzentration in mol/l

d = Schichtdicke der Küvette in cm

$\epsilon_{280\text{nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in M⁻¹ cm⁻¹

F = Verdünnungsfaktor

Tabelle 12. Verwendete molare Extinktionskoeffizienten für die Bestimmung der Proteinkonzentration.

Protein	Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
MsrG-His ₆	29420
MsrG-StrepII	35110
MsrF-His ₆	25580
MsrF-StrepII	31270
MsrC-His ₆	32790
MsrC-StrepII	38480
MsmS-StrepII	123920
RdmS-O216K-StrepII	115080
MA4377-PKR1R2-StrepII	31840
PebS-His ₆	35110

Um die Konzentration in g/l zu berechnen, wurde das relative Molekulargewicht der entsprechenden Proteine, welches ebenfalls mithilfe der Software Protein Calculator v3.4 ermittelt wurde, verwendet.

$$c \left[\frac{g}{l} \right] = M_r \left[\frac{g}{mol} \right] \times c \left[\frac{mol}{l} \right]$$

c = Konzentration in g/l

M_r = Molekulargewicht in g/mol

2.4.7 Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die Gel-Permeations-Chromatographie dient dazu, den Oligomerisierungszustand von Proteinen zu analysieren (Moore, 1964). Dabei werden die Proteine aufgrund ihres hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Grundlage ist eine Säule, die mit einer speziellen Gelmatrix gefüllt ist. Große Moleküle können, da sie schlechter in die hydrophilen Poren des dreidimensionalen Netzwerks der Gelmatrix eindringen können, eine solche Säule schneller durchwandern. Kleine Moleküle hingegen können in die Poren diffundieren und werden dadurch zurückgehalten. Je kleiner ein Molekül ist, desto geringer ist seine Wandergeschwindigkeit in der Säule und desto größer sein Elutionsvolumen (V_e). Durch Vergleich der Elutionsvolumina mit dem von Proteinstandards lässt sich die relative molekulare Masse einer unbekanntes Molekülspezies ableiten. Die GPC erfolgte mittels ÄktaPure und einer Superdex[®] 75 10/300 GL- bzw. Superdex[®] 200 Increase 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von je ca. 24 ml. Die Flussrate betrug 0,3 ml/min. Bevor

die Proteinprobe injiziert wurde, wurde die Säule zunächst mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und entsprechendem Puffer äquilibriert. Das Elutionsverhalten der Probe wurde spektroskopisch bei 280 nm verfolgt. Proteine in geeigneten Elutionsfraktionen wurden anschließend mithilfe von Trichloressigsäure (TCA) aus der Lösung gefällt (Kapitel 2.4.8) und durch eine SDS-PAGE überprüft (Kapitel 2.4.2). Als Proteinstandards zur Ableitung des Molekulargewichts der unbekanntes Proteinprobe wurden Carboanhydrase (CA; 29 kDa), Albumin (Alb; 66 kDa), Alkoholdehydrogenase (ADH; 150 kDa), β -Amylase (β -Amy; 200 kDa) und Apoferritin (Apo; 400 kDa) über die Säule aufgetrennt und deren Elutionsvolumina bei A_{280} nm mit dem der unbekanntes Proteinprobe verglichen. Zur Bestimmung des Ausschlussvolums (V_0) diente Blue Dextran (2000 kDa).

2.4.8 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Die Trichloressigsäure (TCA)-Fällung dient dazu, Proteine aus Lösungen zu fällen. Dazu wurde die Proteinlösung mit der halben Menge an 40%-iger (v/v) TCA-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert, (4 °C, 30 min, 4000 rpm; Z32HK, Rotor 12/032) der Überstand verworfen und das Proteinpellet in 30 μl Tris-Puffer resuspendiert. Die Proben konnten dann mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.4.2) überprüft werden.

Tris-Puffer:

50 mM Tris
100 mM NaCl
pH 7,5 (HCl)

2.4.9 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis eines Fusionsproteins nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei können spezifische Antikörper, die sich gegen die jeweiligen Fusionstags (*His₆-tag*, *StrepII-tag*) der Proteine richten, an diese binden. Die Antikörper sind mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert, über deren Aktivität der Nachweis erfolgt. Zum Nachweis wurden die Proteinproben zunächst mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.4.2) aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran vorab für 15 min in Methanol inkubiert, ehe diese dann zusammen mit dem Polyacrylamidgel und *Whatman*-Papier in Towbin-Puffer äquilibriert wurde. Die Übertragung der Proteine erfolgte mittels Semi-Dry-Blot-Verfahrens für 20 min bei konstanter Spannung von 15 V. Für den anschließenden Nachweis wurde die Membran vorerst für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C in 10 ml Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen auf der Membran zu sättigen, ehe eine einstündige Inkubation mit dem

Primärantikörper (Tabelle 3) erfolgte. Für den Nachweis der StrepII-*tag* tragenden Proteine wurden außerdem vor der Inkubation mit dem Antikörper 2 µg/ml Avidin gelöst in PBS-T zugegeben, um der Detektion der in *E. coli*-Zellen vorhandenen endogenen biotin-Carboxyl tragenden Proteine entgegenzuwirken. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS-T für jeweils 5 min, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran (für die Detektion gegen His₆-*tag*) für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 3) inkubiert, der zusammen mit der Alkalischen Phosphatase an den primären Antikörper bindet. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBS-T für 5 min und PBS für jeweils 1 min wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer äquilibriert. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte durch die Zugabe von 66 µl BCIP (50 mg/ml) und 33 µl NBT (100 mg/ml). Dabei kommt es zu einer Farbreaktion, hervorgerufen durch BCIP, NBT und der am Erst- (bei der Detektion gegen StrepII-*tag*) oder Zweitantikörper (bei der Detektion gegen His₆-*tag*) gekoppelten Alkalischen Phosphatase. Durch die chromogene Reaktion kommt es zu einer Blaufärbung, die als unlösliches Produkt auf der Membran sichtbar wird. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit H₂O_{dest.} gestoppt. Alternativ erfolgte die Detektion mit der chemilumineszenten Substratlösung CPD-Star® (0,25 mM). Dazu wurde die Membran vollständig mit der CPD-Star®-Substratlösung befeuchtet. Das Substrat bindet hierbei ebenfalls an die am Erst- (bei der Detektion gegen StrepII-*tag*) oder Zweitantikörper (bei der Detektion gegen His₆-*tag*) gekoppelten Alkalischen Phosphatase und führt zu einem Lumineszenzsignal, welches mittels Chemolumineszenz-Imager (ChemoStar PC ECL, Intas) detektiert werden konnte.

Towbin-Puffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
pH 8,3 (HCl)

10x PBS-Puffer:

100 mM Na₂HPO₄
18 mM KH₂PO₄
1,4 M NaCl
27 mM KCl
pH 7,4 (NaOH)

PBS-T-Puffer:

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

Blockierlösung:

1x PBS-T-Puffer
3% (w/v) Albumin Fraktion V

AP-Puffer:

100 mM Tris
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
pH 9,5 (HCl)

2.4.10 Tryptischer In-Gel-Verdau

Der tryptische In-Gel-Verdau dient dazu Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, durch enzymatischen Verdau in Peptide zu zerlegen. Diese Methode wurde in Kooperation mit Dr. Frederik Sommer (Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU Kaiserslautern) durchgeführt. Die mittels Kolloidalem-Coomassie gefärbte Proteinbande (Kapitel 2.4.4) wurde zunächst mit einem Skalpell aus dem Polyacrylamidgel getrennt und in ca. 1 mm x 1 mm große Stücke zerlegt. Diese wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und drei Mal mit 25 mM NH₄HCO₃-Puffer gewaschen und anschließend mit 100 µl 50%igem (v/v) Acetonitril (ACN) für 15 min inkubiert. Die Reduktion der Disulfidbrücken sowie die Alkylierung der SH-Gruppen erfolgte daraufhin durch die Zugabe einer 10 mM DTT/25 mM NH₄HCO₃-Lösung bei 50 °C für 30 min unter ständigem Schütteln (Inova44[®]; New Brunswick). Der Überstand wurde verworfen, die Gelstücke durch die Zugabe von ACN dehydratisiert und diese unter Lichtausschluss bei RT für 30 min in einer 55 mM Jodacetamid/25 mM NH₄HCO₃-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgten jeweils drei Waschschrte im Wechsel für 15 min mit 100 µl 250 mM NH₄HCO₃ und 100 µl ACN. Die Gelstücke wurden mittels Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet und die Probe auf Eis mit 30 µl einer 12,5 ng/µl Trypsin/25 mM NH₄HCO₃-Lösung für 6 h bei 37°C unter ständigem Schütteln (Inova44[®]; New Brunswick) inkubiert. Parallel wurde ein identischer Ansatz lediglich für nur eine Stunde verdaut. Die Überstände beider Ansätze wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl einer 50% (v/v) ACN/1% (v/v) Essigsäure-Lösung gemischt. Nach der Vakuumzentrifugation wurden die Peptide nach (Rappsilber *et al.*, 2003) entsalzt und erneut in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.4.11 Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

Die Elektrospray-Ionisations-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (ESI-LCMS) wurde in Kooperation mit Dr. Frederik Sommer (Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU Kaiserslautern) und Dr. Markus Räsche (Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Ionen in die Gasphase überführt, welche dann in Massenanalysatoren abhängig von ihrem Masse-Lade-Verhältnis physikalisch getrennt werden. Anschließend werden die Gasphase-Ionen zum Detektor, einem Sekundärelektronen-Vervielfacher, weitergeleitet, um ein Massenspektrum zu generieren. Die so erhaltenen Massen können dann mit einer Datenbank abgeglichen werden, um die in der Probe enthaltenen Makromoleküle zu identifizieren. Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden an einem TripleTOF 6600 (ABSciex) gekoppelt mit ekspertTM nanoLC 425 (eksigent, ABSciex) untersucht. Die Peptide wurden mit einer Flussrate von 4 µl/min von der Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesäule (Triart-C18-Säule, 5 µm Partikel, 0,5 mm x 5 mm als Trap-Säule; Triart C18, 3 µm Partikel, 300 µm x 150 mm als Analytik-Säule, YMC), mit einem Gradienten von 2% (v/v) bis 35% (v/v) HPLC-Puffer B, eluiert. Das Flugzeitmassenspektrometer wurde im IDA-Mode betrieben, welcher ein Survey Scan (350-1250 m/z, 250 ms) und Fragment-Spektren (100-1500 m/z) der 20 relevantesten Mutter-Ionen (70 ms, Ladezustand >2, Intensität >400 cps) aufnimmt.

HPLC-Puffer B:

90% (v/v) ACN

10% (v/v) Ameisensäure

2.4.12 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen wurden *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) durchgeführt. Diese Methode basiert darauf, dass Protein-DNA-Komplexe langsamer durch ein Acrylamidgel migrieren als freie DNA. Dazu wurde das zu untersuchende Protein in steigenden Konzentrationen von 0,1 µM bis 4 µM mit 20 ng des gewünschten DNA-Fragments und 10x Bindepuffer in einem Gesamtansatz von 10 µl für 30 min bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine proteinfreie Probe. Die Proben wurden anschließend auf ein 5%-iges TBE-Acrylamidgel (5% Mini-PROTEAN[®] TBE Gel, Bio Rad) aufgetragen, welches vorab für 1 h bei einer konstanten Spannung von 120 V vorgelaufen ist. Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h. Zur Visualisierung der DNA wurde das TBE-Acrylamidgel bei RT für 15 min in 20 ml einer 0,5x TBE-Lösung, die mit 2 µl SYBR[®] Green versetzt wurde, inkubiert. SYBR[®] Green ist ein fluoreszierender

Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und unter UV-Licht (Emission: 520 nm) sichtbar gemacht werden kann. Die Visualisierung erfolgte anschließend mithilfe des Fluoreszenz-Imager (ChemoStar PC ECL, Intas).

EMSA-Ansatz:

20 ng DNA
1 μ l 10x Bindepuffer
x μ M Protein
ad 10 μ l Entsprechender Dialysepuffer

10x Bindepuffer:

500 mM Hepes
500 mM NaCl
50 mM $MgCl_2$
10 mM EDTA
10 mM DTT
10% (v/v) Glycerin
pH 7,5 (HCl)

10x TBE:

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA

2.4.13 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

Zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen wurde die Methode der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) durchgeführt. Diese Methode wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Ralf Heermann (Mikrobiologie und Weinforschung, JGU Mainz) durchgeführt und erlaubt es, Protein-Protein oder Protein-Ligand Interaktionen in Echtzeit ohne eine Markierung der entsprechenden Moleküle zu untersuchen (Fägerstam *et al.*, 1992); (Silin & Plant, 1997)). Einer der beiden Interaktionspartner (Ligand) wird dazu auf der Sensoroberfläche eines Sensorchips immobilisiert. Der andere Interaktionspartner (Analyt) wird in bestimmten Konzentrationen mit kontinuierlichem Fluss über die Sensoroberfläche geleitet. Kommt es zur Interaktion der beiden Moleküle, kann diese durch die Veränderung der Massenkonzentration auf der Oberfläche des Sensorchips detektiert werden. Die eigentliche Messgröße ist dabei der Brechungsindex der Flüssigkeit auf der Chipoberfläche. Dieser ändert sich proportional

zur Dichte der Flüssigkeit, sodass sich die Bindung von Molekülen zeitaufgelöst messen lässt. Das resultierende Sensorgramm ist eine Darstellung der Änderung des Brechungsindex in Resonanzeinheiten (*response units*, RU) gegen die Zeit (t). Ein SPR-Signal von 1000 RU entspricht einer Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm² und ist für eine bestimmte Massenänderung bei allen Proteinen gleich. Da im Responsesignal auch unspezifische Bindungen enthalten sind, müssen diese abgezogen werden. Die Differenz der Signale aus beiden Flusszellen (Fc1 und Fc2) zeigt die tatsächliche Bindung. Für die in dieser Arbeit untersuchten Interaktionsstudien wurde das Biacore T200-System (Prof. Dr. Ralf Heermann, Mikrobiologie und Weinforschung, JGU Mainz), sowie das Biacore 2000-System (Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus, Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern) und ein CM5 Chip (Carboxymethylierte Detranmatrix; Cytiva), der eine Strep-Tactin®XT- oder eine Anti-His tag Antikörper-Oberfläche besitzt, verwendet. Die Immobilisierung des Strep-Tactin®XT auf der Chipoberfläche erfolgte nach dem Twin-Strep-tag® Capture Kit (IBA) für SPR gemäß Herstellerangaben. Die Immobilisierung des Anti-His Antikörper erfolgte mithilfe des His Capture Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Für die Interaktionsmessungen wurden zwischen 400 - 1600 RU des Liganden immobilisiert und die Analyt-Konzentration variierte zwischen 1 - 2000 nM. Die Messung erfolgte in Natriumphosphatpuffer oder HBS-EP bei einer Flussrate von 10 µl/min. Nach der Assoziation von 300 s folgte eine Dissoziation von 400 s. Die Regeneration der Chipoberfläche erfolgte durch die Injektion von 3 M Guanidin Hydrochlorid.

Für die Auswertung wurden die Resonanzsignale der Referenzzelle durch Subtraktion der unspezifischen Signale korrigiert und alle Messungen auf die Basislinie normalisiert. Das daraus resultierende Sensorgramm zeigt die Veränderung des Resonanzsignals in Resonanzeinheiten (RU), aufgetragen gegen die Zeit (s). Die Auswertung der Messung und die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) erfolgten automatisch durch das BIA-Evaluierungsprogramm (Biacore T200 Evaluation Software 3.2).

Natriumphosphatpuffer:

150 ml	Lösung A
	(50 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O = 6,89 g/l)
850 ml	Lösung B
	(50 mM Na ₂ HPO ₄ = 7,09 g/l)
100 mM	NaCl
	pH 7,5

HBS-EP:

10 mM HEPES
 150 mM NaCl
 3 mM EDTA
 0,005% (v/v) Tween-20
 pH 7,4

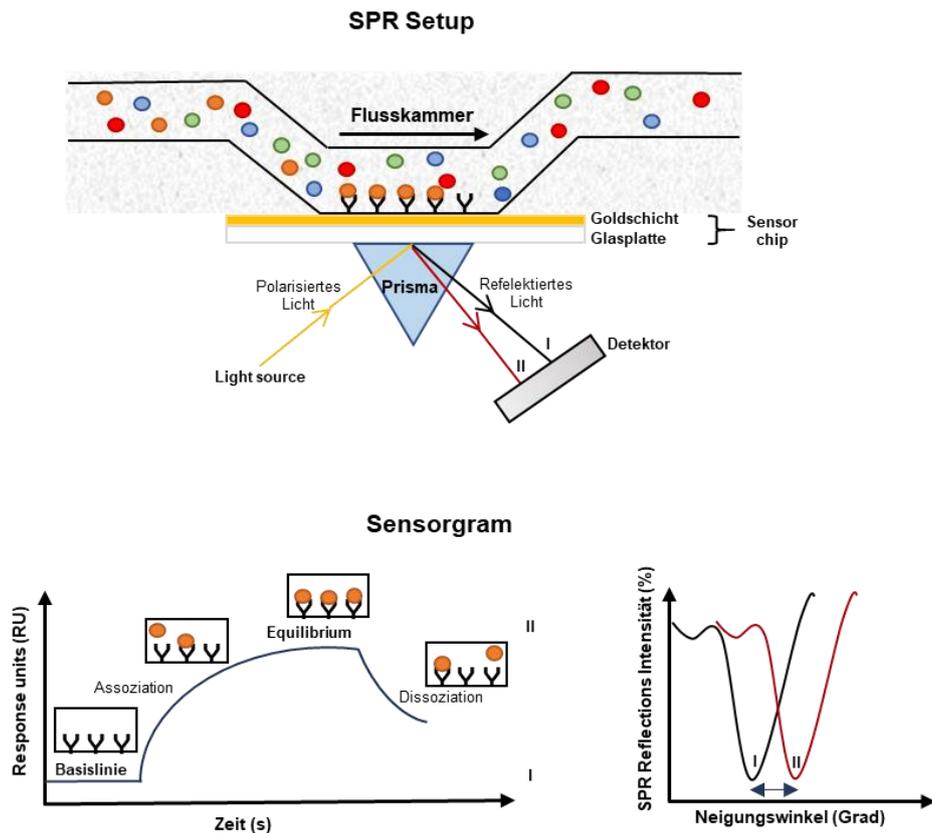


Abbildung 6 Schematische Darstellung eines typischen Aufbaus eines Oberflächenplasmonenresonanz-Experiments. Die Sensoroberfläche besteht aus einer dünnen Metallschicht (meistens Gold) auf einem Prisma. Ein Interaktionspartner (Ligand) wird auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Der andere Interaktionspartner (Analyt) wird mit kontinuierlichem Fluss über die Sensoroberfläche geleitet. Die Interaktion beider Biomoleküle lässt sich in Echtzeit durch die Veränderung des Brechungsindex des reflektierten Lichtes detektieren. Diese Änderung des Winkels ist proportional zur gebundenen Masse auf der Sensoroberfläche. Dargestellt wird das Ganze als Sensorgramm, welches die Änderung des Winkels als Funktion der Zeit angibt.

2.4.14 *In vivo* Quervernetzung (*Crosslinking*)

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen bietet die *in vivo* Quervernetzung. Dabei kann die chemische Kopplung von putativen Interaktionspartnern unter Zuhilfenahme von quervernetzenden Substanzen herbeigeführt werden. Um zu überprüfen, ob die Msr-Regulatoren mit den Sensorkinasen MsmS und RdmS interagieren, wurden die entsprechenden Plasmide für die Expression der Proteine in *E. coli* Nissle1917

transformiert. Zusätzlich wurde das in den *E. coli*-Nissle1917-Zellen fehlende T7-RNA-Polymerase Gen durch den Vektor pBBR-msc3-T7 unter Kontrolle eines *lac*-Promotors eingebracht. Für die Produktion der Proteine wurden die Zellen mit entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 100 rpm (Innova®44, New Brunswick Scientific) bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen ohne Schütteln bis zum Erreichen einer Temperatur von 17 °C kultiviert, ehe die Zugabe der Induktoren IPTG und AHT erfolgte. Nach der Produktion der Proteine ü. N. erfolgte die Zellernte (Kapitel 2.4.1.2). Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit PBS-Puffer (Kapitel 2.4.9) gewaschen, ehe die Zugabe von 30 ml Reaktionspuffer erfolgte. Nach 30-minütiger Inkubation unter ständigem Schütteln (30 rpm; Inova44®) bei RT wurden die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml Stopplösung gestoppt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert. Der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion erfolgte schließlich mithilfe von Western-Blot-Analysen (Kapitel 2.4.9).

Reaktionspuffer:

1x PBS-Puffer
5 mM Disuccinimidyl suberate (DSS)

Stopplösung:

20 mM Tris
pH 7,5 (HCl)

2.4.15 Phosphorylierungs-Assay

Die Fähigkeit der Autophosphorylierung wurde mittels radioaktiv markiertem [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP und [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP in Phosphorylierungsstudien untersucht. Dazu wurden 10 μM des Proteins mit 2,5 μl 5x Kinase Puffer und 2,5 μl 5x ATP-Mix in einem Gesamt Ansatz von 12,5 μl für 10 – 30 min inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 μl SDS-Probenpuffer versetzt mit oder ohne β -Mercaptoethanol. Zur Untersuchung der typischen Phosphatgruppenübertragung zwischen Sensorkinasen und den korrespondierenden Regulatoren wurden Transphosphorylierungs-Assays durchgeführt. Dazu wurde der Regulator in äquimolarem Verhältnis mit der zuvor autophosphorylierten Kinase inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten mit SDS-Probenpuffer terminiert. Überschüssiges ATP wurde nach der Kinasereaktion mittels Illustra TM MicroSpin™ G-50 columns, nach Angaben des Herstellers entfernt. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE separiert. Durch Auflegen des Gels auf eine Phospho-Imagerplatte konnten die Signale nach ca. 16 h mithilfe eines Phosphoimagers (Typhoon, GE Healthcare) detektiert werden.

5x Kinasepuffer:

250 mM Tris
1 mM EDTA
500 mM NaCl
25 mM MgCl₂
pH 7,5 (HCl)

5x Kinasepuffer P1:

250 mM Tris
1 mM EDTA
750 mM NaCl
250 mM KCl
25 mM MgCl₂
1 mM DTT
pH 7,5 (HCl)

5x Kinasepuffer P2:

250 mM Tris
1 mM EDTA
500 mM NaCl
250 mM KCl
10 mM MnCl₂
1 mM DTT
pH 7,5 (HCl)

5x ATP-Mix:

1,85 kBq [γ ³²P]-ATP oder [α ³²P]-ATP
1 mM ATP

2.4.16 TNP-ATP-Assay

Um zu untersuchen, ob RdmS spezifisch mit ATP interagiert, wurde das ATP-Derivat 2',3'-O-Trinitrophenyl-Adenosin-5'-triphosphat (TNP-ATP) verwendet. Dieses besitzt gegenüber dem nativen ATP den Vorteil, dass es mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden kann, da die Fluoreszenz in wässriger Lösung sehr gering ist, jedoch mit der Bindung an die Nucleotidbindestelle von Proteinen zunimmt (Hiratsuka, 2003). Um die Bindung von TNP-ATP

an die Kinase RdmS zu untersuchen, wurden 2,5 μM , 5 μM , 7,5 μM oder 10 μM Protein in Kinasepuffer mit entsprechenden Mengen an TNP-ATP versetzt und ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum in einem Bereich von 450 - 650 nm mithilfe eines Fluoreszenzspektrometers (FP-8300 fluorescence spectrometer, Jasco) und einer Quarzküvette (SUPRASIL®-Küvette, 3x3 mm, Hellma Analytics) aufgenommen. Die Anregungswellenlänge betrug 410 nm und die Spaltbreite 5 nm. Die Fluoreszenz von TNP-ATP wurde als Maximum bei 541 nm bestimmt und die TNP-ATP Konzentration betrug während der Titrationsexperimente 0 - 50 μM . Die Messungen wurden jeweils im Triplikat durchgeführt und die ermittelten Werte der Fluoreszenzemission gemittelt und durch Subtraktion der unter den gleichen Bedingungen ermittelten Werten der Pufferemission korrigiert. Da TNP-ATP über eine Eigenfluoreszenz verfügt, wurde überprüft, ob die Eigenfluoreszenz proportional zur eingesetzten Menge TNP-ATP ist und eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 7). Dabei konnte gezeigt werden, dass für die verwendeten Konzentrationen von 0 - 50 μM TNP-ATP die Eigenfluoreszenz proportional zur eingesetzten Konzentration verlief. Die erhaltene Kalibriergerade wurde genutzt, um die während des Titrationsversuchs ermittelten Emissionswerte zu korrigieren.

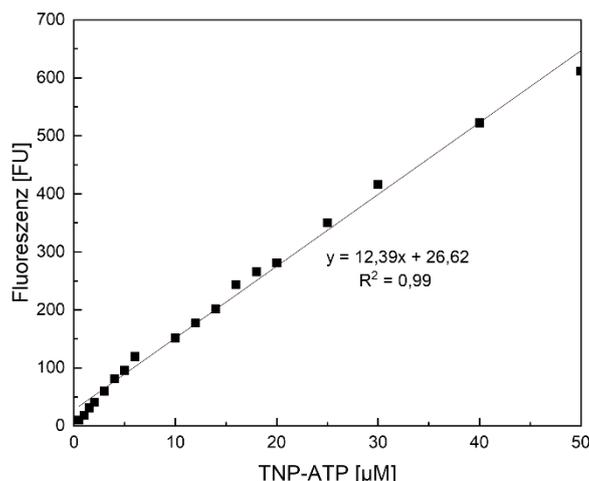


Abbildung 7. Kalibriergerade für die Eigenfluoreszenz von TNP-ATP. Fluoreszenzspektren in Bereich von 450 nm bis 650 nm, von steigenden Mengen TNP-ATP in Kinasepuffer wurden mittels Fluoreszenzspektrometer FP-8300 von Jasco detektiert. Die Anregungswellenlänge betrug 410 nm und die Fluoreszenz wurde als maximum bei 541 nm bestimmt.

Um abschließend die Bindungsaffinität zu bestimmen, wurden die aufgezeichneten Emissionsmaxima in Abhängigkeit von der TNP-ATP-Konzentrationen aufgetragen und unter Verwendung der numerischen Solver-Funktion von *Microsoft Excel* der K_D -Wert bestimmt. Der K_D -Wert entspricht jeweils der TNP-ATP-Konzentration bei halbmaximaler Fluoreszenzintensität.

2.4.17 ADP-Glo Kinase Assay

Um zu untersuchen, ob die Kinase RdmS das gebundene ATP hydrolysieren kann, wurden ADP-Glo Assays mithilfe des ADP-Glo™ Kinase Assay Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Assay basiert auf einem Lumineszenz-basierten ADP-Nachweissystem. Dabei wird, dass während der Kinasereaktion gebildete ADP in ATP umgewandelt und wird im Folgenden erneut zu ADP in einer Luciferase-Reaktion umgewandelt. Die erzeugte Lumineszenz ist proportional zur gebildeten ATP-Menge und korreliert somit mit der Kinaseaktivität. Eine Schematische Darstellung des Assay ist in Abbildung 8 dargestellt. Dieser erfolgt in zwei Schritten:

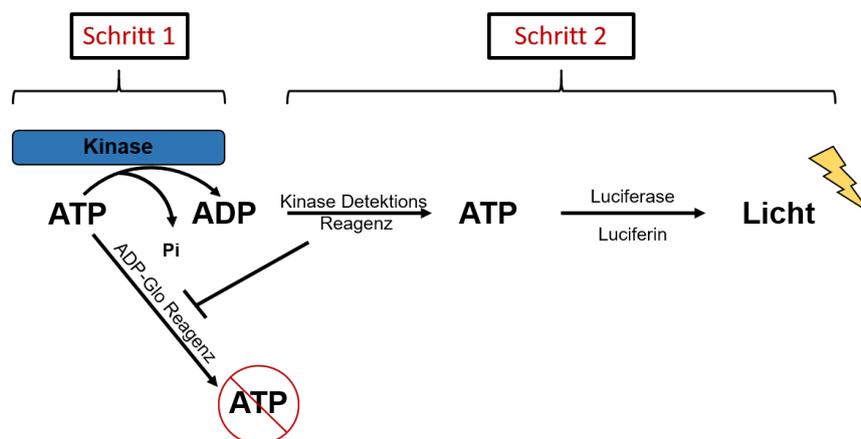


Abbildung 8. Schematischer Ablauf des ADP-Glo™ Assays. Schritt 1: Die Kinasereaktion wird durchgeführt und nicht umgesetztes ATP depletiert. Schritt 2: Das entstandene ADP wird in ATP umgewandelt und dient in einer Luciferase-Reaktion zur Generierung von Licht. Die Menge an emittiertem Licht ist proportional zur umgesetzten Menge an ATP während der Kinasereaktion.

Im ersten Schritt wird eine Kinasereaktion in weißen 96-well-Platten (Greiner LUMITRAC™ 200) durchgeführt. Dazu wurden 10 µM Protein in Kinasepuffer verdünnt und mit 2,5 mM ATP [10 µM] in einem Gesamtansatz von 25 µl für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl ADP-Glo Reagenz wurde die Kinasereaktion abgestoppt und das überschüssige ATP entfernt. Nach weiteren 40 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 25 µl Kinase Detektions Reagenz (Schritt 2) für 60 min bei Raumtemperatur. Dabei wird das Reaktionsprodukt ADP aus der Kinasereaktion zu ATP phosphoryliert und das neu gebildete ATP dient der zugegebenen Luciferase dazu, Luciferin zu Oxyluciferin umzusetzen. Die dabei entstandenen Photonen wurden schließlich mithilfe eines Luminometers (FLUOstar® Omega, BMG Labtech) detektiert und stehen in Abhängigkeit mit der Aktivität der Kinase. Alle Messungen wurden im Triplikat durchgeführt und die ermittelten Lumineszenz-Werte durch Subtraktion der unter den gleichen Bedingungen ermittelten Werten einer Blankprobe korrigiert. Um die Menge an ADP, die während der Kinasereaktion umgesetzt wurde zu quantifizieren, wurde eine Standardkurve erstellt. Diese repräsentiert die Lumineszenz [RLU, *relative light unit*] von Reaktionsansätzen

mit verschiedenen ATP zu ADP Verhältnissen, abhängig von der eingesetzten ATP Konzentration (Abbildung 9).

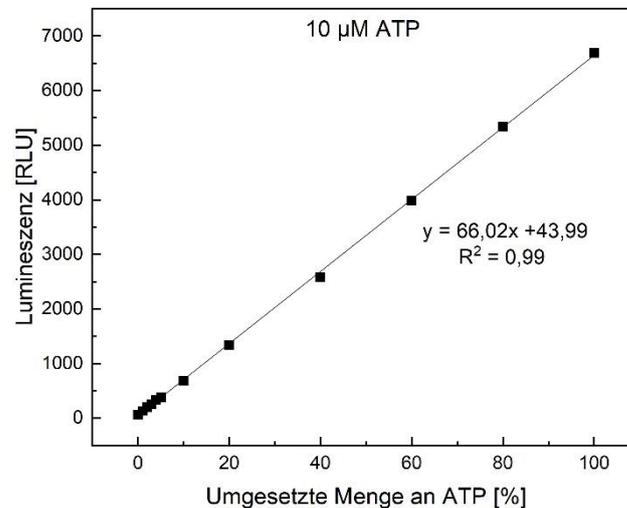


Abbildung 9. Standardkurve der Umsetzung von ATP zu ADP. Aufgetragen ist die Lumineszenz [RLU] von Reaktionsansätzen mit verschiedenen ATP zu ADP Verhältnissen, bei einer maximalen Konzentration von 10 µM ATP. Anhand der Geradengleichung lässt sich der prozentuale Umsatz an ATP während der Kinasereaktion berechnen. RLU: *relative light unit*.

5x Kinasepuffer:

250 mM Tris
1 mM EDTA
500 mM NaCl
20 mM MgCl₂
pH 7,5 (HCl)

2.4.18 Quantitative Reverse Transkriptase (qRT)-PCR

Zur Analyse der Expression der *mts*-Gene diente die Methode der quantitativen Reverse Transkriptase-PCR. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und erlaubt die quantitative Bestimmung des PCR-Produkts nach jedem Zyklus mithilfe des interkalierenden Farbstoffes SYBR® Green, der mittels Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt werden kann. Das gemessene Fluoreszenzsignal am Ende jedes Zyklus ist proportional zur Menge des amplifizierten DNA-Produktes. Für die Expressionsanalysen der *mts*-Gene diente cDNA (Kapitel 2.3.8) aus *M. acetivorans*-Kulturen, die unter verschiedenen Bedingungen (TMA, DMA, MMA und MeOH) inkubiert wurden, als Template. Die Reaktion wurde mithilfe 2x iTaq™ Universal SYBR® Green Mastermix (BioRad) gemäß

Herstellerangaben in Echtzeit am CFX3 Connect™ Real-time System thermocycler (BioRad) in klaren 96-qPCR Platten (VWR) durchgeführt.

Standard qPCR-Ansatz:

1 ng	cDNA
5 µl	2x iTaq™ Universal SYBR® Green Mastermix
0,5 µl	Primer- <i> fwd</i> [10 µM]
0,5 µl	Primer- <i> rev</i> [10 µM]
ad 10 µl	H ₂ O _{dest.}

Tabelle 13. Standard qPCR-Temperaturprogramm.

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Aktivierung der Polymerase	50 °C	10 min
2. Primäre Denaturierung	95 °C	5 min
3. Denaturierung	95 °C	10 s
4. Annealing	58 °C	20 s
5. Elongation	72 °C	10 s
6. Finale Elongation	72 °C	5 min
7. Schmelzkurve Schritt 1	95	10 s
8. Schmelzkurve Schritt 2	50 °C	5 s
9. Schmelzkurve Schritt 3	95 -50 °C	in 0,5 °C Schritten
10. Lagerung	4 °C	∞

Als Referenzgen wurde die RNA-Polymeraseuntereinheit A1 (*rpoA1*) von *M. acetivorans* verwendet und der Transkriptgehalt des jeweilig zu untersuchenden Gens wurde in Relation zu diesem normalisiert. Primereffizienztests für die verwendeten Primer (Kapitel 2.1.5) wurden von Sandra Köhler durchgeführt. Die Analysen ergaben eine Primereffizienz von 94,5% für *mtsD*, 95,7% für *mtsF* und 99,8% für *mtsH* und 94,6% für *rpoA1* (Köhler, 2021). Jede Messung wurde im Triplikat in drei Versuchsansätzen an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Zur Berechnung der Ergebnisse wurde eine relative Quantifizierung nach der vergleichenden CT-Methode vorgenommen. Dazu wurden die CT-Werte für Ziel- und Referenzgen jeweils gemittelt und die Differenz ermittelt (Δ CT). Anschließend wurden die erhaltenen Δ CT-Werte der unter Methanol kultivierten *Methanosarcina*-Stämme von denen, die auf TMA, DMA und

MMA kultiviert wurden, subtrahiert ($\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert). Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$). Ein Wert < 1 entspricht einer stärkeren und ein Wert > 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zur universellen Kontrolle. Werte $< 0,5$ wurden als Hinweis auf eine deutlich Herunterregulation, d.h. eine relevanten mRNA-Expressionverminderung des jeweiligen Gens gewertet. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet, zwecks Dokumentation jedoch an dieser Stelle aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Protein-Interaktion

Die homologen Corrinoide-/Methyltransferase-Fusionsproteine MtsD, MtsF und MtsH spielen bei der Verstoffwechslung von Methylsulfiden innerhalb der Methanogenese eine wichtige Rolle. Die Genexpression dieser Methyltransferasen wird durch die homologen Msr-Transkriptionsregulatoren MsrG, MsrF und MsrC reguliert. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Sensorkinase MsmS an der Bildung von MtsF beteiligt ist (Molitor, 2013). MsmS kodiert direkt stromaufwärts von MsrG. Das Genom von *M. acetivorans* kodiert für zwei weitere Kinasen RdmS und MA4377, die alle genomisch nahe den Msr-Regulatoren kodiert sind (Abbildung 3) (Bose *et al.*, 2009). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Kinasen zusammen mit den Regulatoren ein Signaltransduktionssystem bilden und die Expression der *mts*-Gene steuern. In klassischen bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen (ZKS) erfolgt die Signaltransduktion über eine durch transiente Interaktion herbeigeführte Phosphatgruppenübertragung zwischen der Kinase und dem Regulator. Die Kinase MA4377 ist eine membrangebundene Hybridkinase, die an einem konservierten Histidinrest autophosphoryliert wird und die Phosphorylgruppe auf die zweite fusionierte REC-Domäne und auf einen *downstream* lokalisierten alleinstehenden Receiver, MA4376, übertragen kann (Sexauer, 2021). Die beiden anderen Systeme um die Sensorkinasen RdmS und MsmS weisen im Vergleich zu bakteriellen Systemen jedoch strukturelle Unterschiede innerhalb der Output-Domäne auf. Für diese Kinasen konnte gezeigt werden, dass sie vermutlich an einem Serin- oder Tyrosinrest autophosphoryliert werden (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Außerdem fehlt den Msr-Regulatoren die für bakterielle Antwortregulatoren typische Receiver-(REC)-Domäne (Bose *et al.*, 2009). Daher kann die Signalübertragung nicht analog zu der in bakteriellen Systemen erfolgen. Neben der durch Protein-Interaktion ermöglichten Phosphatgruppenübertragung von der Kinase auf den Regulator sind auch andere Mechanismen denkbar. So könnte beispielsweise die Autophosphorylierung der Kinase die Ausbildung eines Kinase-Regulator Komplexes begünstigen oder diesen auflösen. Die Kommunikation zwischen Kinase und Regulator könnte jedoch auch durch die Ausbildung eines stabilen Kinase-Regulator Komplexen oder über die Interaktion mit einem unbekanntem Faktor (Substrat oder Protein) herbeigeführt werden. Sämtliche Mechanismen setzen jedoch eine Protein-Interaktion zwischen Kinase und Regulator voraus, die näher untersucht werden sollte.

3.1.1 Proteinreinigung der Sensorkinasen und Transkriptionsregulatoren

Um die Interaktion zwischen den Kinasen und den Msr-Regulatoren zu untersuchen, wurden die Proteine vorab heterolog in *E. coli* produziert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Die Kinasen MsmS und RdmS wurden als StrepII-tag Fusionsprotein in *E. coli* Nissle 1917 bei 17 °C und die Regulatoren MsrF, MsrG und MsrC als His-tag tragendes Fusionsprotein in *E. coli* BL21 (λ DE3) bei 30 °C produziert. Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurden sämtliche Reinigungsschritte per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 10).

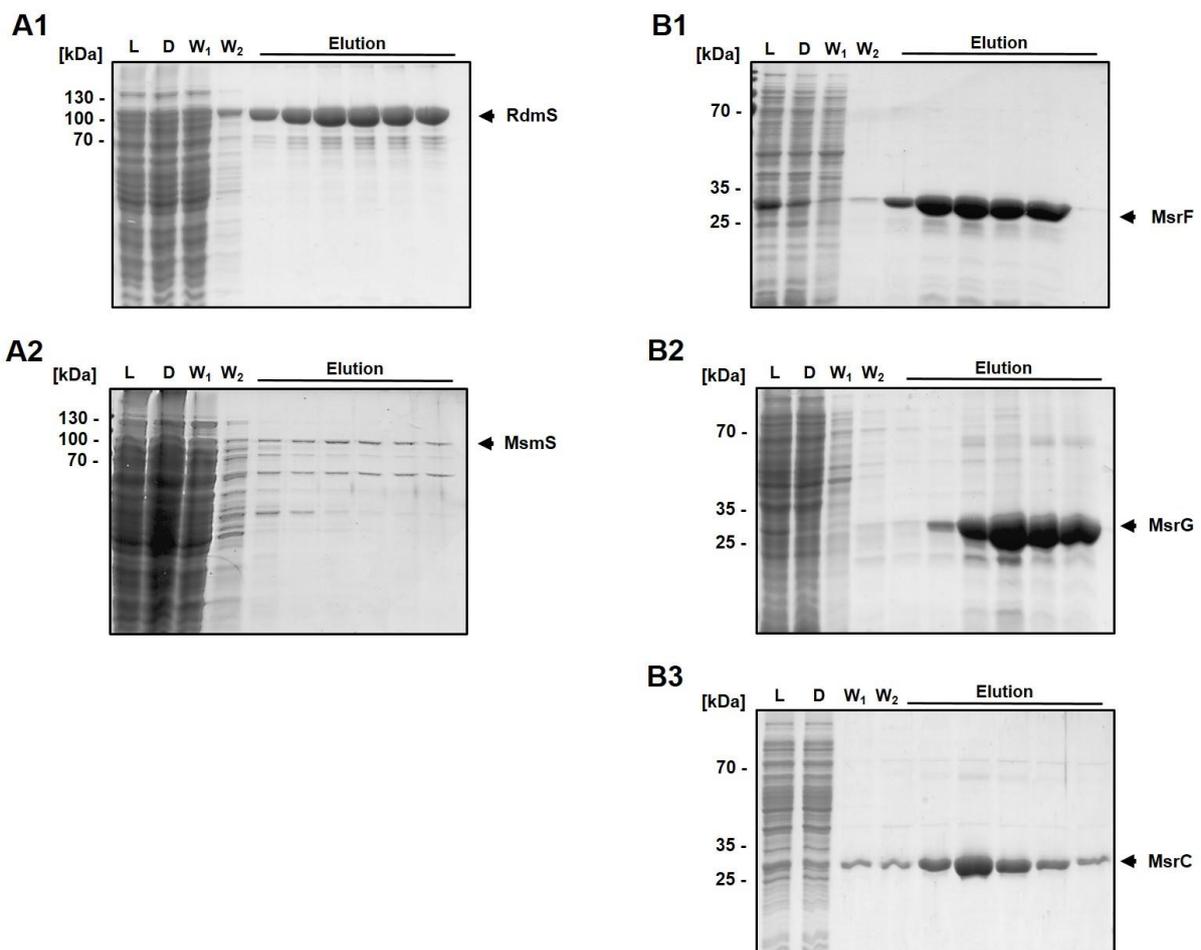


Abbildung 10. SDS-PAGE-Analyse der Proteinreinigung der Kinasen RdmS und MsmS und der Regulatoren MsrF, MsrG und MsrC mittels Affinitätschromatographie. (A1) SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Kinase RdmS (MW = 115 kDa). (A2) SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Kinase MsmS (MW= 115 kDa). (B1) SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Regulators MsrF (MW = 30 kDa). (B2) SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Regulators MsrG (MW = 30 kDa). (B3) SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Regulators MsrC (MW = 30 kDa). Die Kinasen MsmS und RdmS wurden in *E. coli* Nissle1917 und die Regulatoren MsrF, MsrG und MsrC in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen produziert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und die jeweiligen Reinigungsschritte über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Coomassie-Färbung wurden die Proteine visualisiert. L: Lysat; D: Durchlauf; W₁: 1. Waschschrift; W₂: 2. Waschschrift; Elution: Elutionsfraktionen 1-6.

Die gereinigten Kinasen RdmS (Abbildung 10 A1) und MsmS (Abbildung 10 A2) können mit einer relativen molekularen Masse von ca. 115 kDa in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Dabei ist zu erkennen, dass die Intensität in den gereinigten Elutionsfraktionen des gereinigten RdmS im Vergleich zu MsmS deutlich erhöht ist. Die gereinigten Regulatoren MsrF (Abbildung 10 B1), MsrG (Abbildung 10 B2) und MsrC (Abbildung 10 B3) können bei einer relativen molekularen Masse von ca. 30 kDa in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Zusätzlich können in allen SDS-PAGE-Analysen Proteine mit einer geschätzten molekularen Masse von ca. 70 kDa identifiziert werden, welche in durchgeführten Westernblot-Analysen gegen den StrepII-*tag* und den His-*tag* jedoch nicht detektiert werden konnten und somit vermutlich *E. coli* eigene Proteine darstellen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Untersuchung der Protein-Interaktion mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Die Untersuchung der Interaktion zwischen den Kinasen MsmS und RdmS und den Regulatoren MsrG, MsrF und MsrC, erfolgte mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie. Bei dieser Methode können intermolekulare Interaktionen zwischen Molekülen sowie die spezifischen Bindungsparameter bestimmt werden. Die Messung erfolgt zeitaufgelöst in einem Fließsystem ohne spezielle Markierung der Interaktionspartner. Zuerst wurde die Interaktion zwischen RdmS und den Regulatoren MsrG, MsrF und MsrC näher betrachtet. Dazu wurde die Kinase als Ligand via C-terminalem StrepII-*tag* auf einen CM5 Chip, der eine Strep-Tactin®XT Oberfläche besitzt, immobilisiert. Unmittelbar danach wurden die His-*tag* tragenden Regulatoren als Analyt in verschiedenen Konzentrationen über die Chip-Oberfläche geleitet. Die Assoziation wie auch die Dissoziation der Regulatoren an das immobilisierte RdmS wurde über die Zeit bestimmt und in einem Sensogramm dargestellt (Abbildung 11). Die kinetischen Parameter wurden mithilfe der Biacore T200 Evaluation Software 3.2 ermittelt (Tabelle 14). Die Messungen wurden an der JGU Mainz in der Abteilung von Prof. Dr. Heermann durchgeführt.

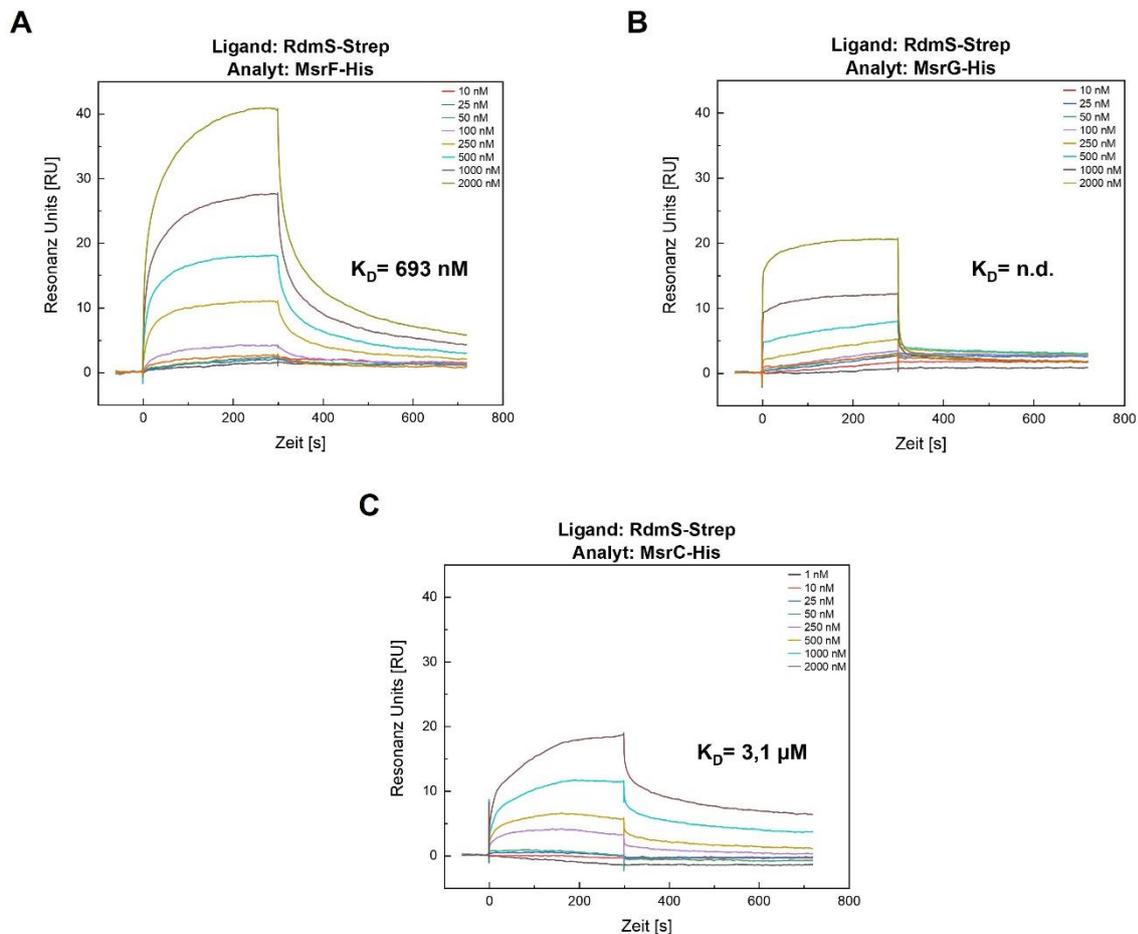


Abbildung 11. SPR-Analyse der Interaktion von RdmS mit MsrF, MsrG und MsrC. RdmS wurde als Ligand auf einen carboxymethylierten Dextran Sensorchip (CM5), der eine Strep-Tactin®XT Antikörper-Oberfläche besitzt, gekoppelt und die Regulatoren MsrF, MsrG und MsrC in unterschiedlichen Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM) mit kontinuierlichem Fluss von 30 µl/min über die Chipoberfläche geleitet. Gezeigt ist der Verlauf der Resonanzsignale (RU) über die Zeit nach Injektion der unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen. **(A)** Sensogramm der Bindung von MsrF an die immobilisierte Sensorkinase RdmS. **(B)** Sensogramm der Bindung von MsrG an die immobilisierte Sensorkinase RdmS. **(C)** Sensogramm der Bindung von MsrC an die immobilisierte Sensorkinase RdmS. Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) erfolgte mithilfe des Evaluierungsprogramm Biacore T200 Evaluation Software 3.2. Unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie ergab sich eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 0,69 µM für MsrF und 3,1 µM für MsrC. n.d.: nicht nachweisbar.

Die Auswertung der SPR-Daten zeigt eine stark konzentrationsabhängige Bindung von MsrF, an die Kinase RdmS (Abbildung 11 A). Dabei zeigt sich nach Injektion von RdmS eine Assoziationsrate von $4,83 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und nach Injektionsende eine vergleichbare Dissoziationsrate von $4,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 14). Die Einstellung des Gleichgewichtszustandes (*steady state*) kann jedoch lediglich für die niedrigen Analyt-Konzentrationen (bis ca. 250 nM) beobachtet werden (Abbildung 11 A). Daher kann bei den Messungen mit höherer Analyt-Konzentration nicht von einer 1:1 Stöchiometrie ausgegangen werden.

Das Sensogramm für MsrG zeigt direkt nach Injektionsstart eine vergleichsweise sehr schnelle Assoziationsrate ($2,92 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bis sich der *steady state* einstellt. Nach Injektionsende

regeneriert das Systems vergleichbar schnell ($k_{\text{off}} = 6,51 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um eine eher lose, unspezifische Interaktion handelt (Abbildung 11 B). Im Sensogramm von MsrC kann ebenfalls eine spezifische konzentrationsabhängige Bindung an RdmS beobachtet werden (Abbildung 11 C). Hierbei konnten vergleichbare Assoziations- und Dissoziationsrate wie für MsrF berechnet werden (Tabelle 14). Bei keiner der eingesetzten Konzentrationen kann ein Gleichgewichtszustand erreicht werden (Abbildung 11 B).

Anhand der durchgeführten SPR-Analysen konnte gezeigt werden, dass RdmS mit der Kinase MsrF und MsrG spezifisch interagiert. Die ermittelten K_D -Werte betragen für MsrF und RdmS $0,69 \mu\text{M}$ und für MsrC und RdmS $3,1 \mu\text{M}$.

Tabelle 14. Über SPR-Analysen ermittelte Bindungsaffinitäten. Die Assoziationsratenkonstante (k_{on}), die Dissoziationsratenkonstante (k_{off}), die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) und die maximale Response (R_{max}) wurde unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie (Langmuir-Bindung) mithilfe der Biacore T200 Evaluation Software 3.2 ermittelt. n.e.: nicht ermittelt.

Ligand	Analyt	$k_{\text{on}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$k_{\text{off}} [\text{s}^{-1}]$	$K_D [\mu\text{M}]$	Rmax [RU]	Model
RdmS	MsrF	$4,83 \times 10^3$	$4,5 \times 10^{-3}$	0,69	47,5	1:1
RdmS	MsrC	$2,92 \times 10^5$	$6,51 \times 10^{-4}$	3,1	3,2	1:1
RdmS	MsrG	$5,53 \times 10^2$	$1,75 \times 10^{-3}$	n.e.	50	1:1

Anschließend wurde die Interaktion der Kinase MsmS mit den Regulatoren MsrG und MsrF näher betrachtet. Diese Messungen wurden am Biacore 2000, das von der Abteilung Pflanzenphysiologie der TU Kaiserslautern bereitgestellt wurde, durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten Regulatoren als Ligand via C-terminalem His-tag auf einen CM5 Chip, der eine Anti-His Antikörper Oberfläche besitzt, immobilisiert. Unmittelbar danach wurden die StrepII-tag tragende Kinase MsmS als Analyt in verschiedenen Konzentrationen über die Chip-Oberfläche geleitet und die Sensogramme aufgenommen (Abbildung 12). Die kinetischen Parameter wurden mithilfe der BIAevaluation 3.1 Software ermittelt.

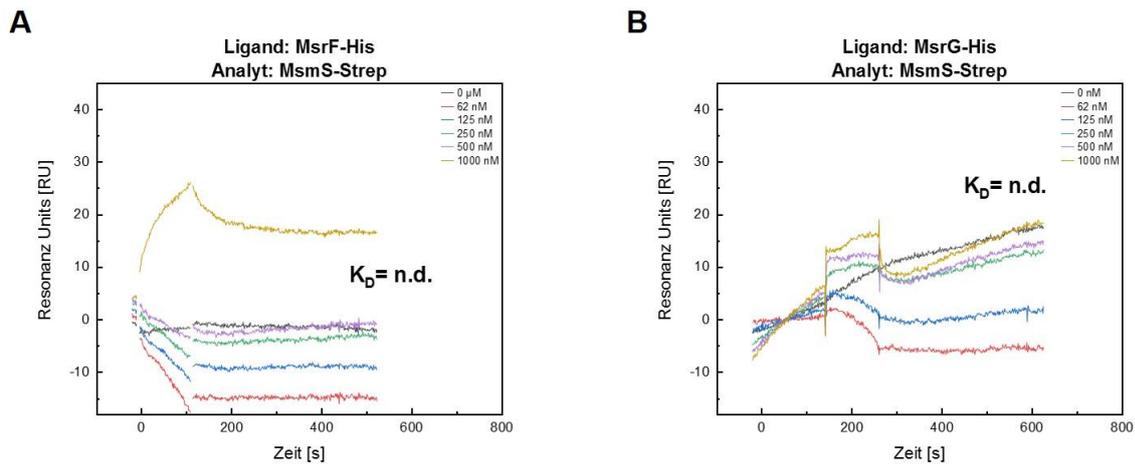


Abbildung 12. SPR-Analyse der Interaktion von MsmS mit MsrF und MsrG. MsrF und MsrG wurden als Ligand auf einen carboxymethylierten Dextran Sensorchip (CM5), der eine Anti-His tag Antikörper-Oberfläche besitzt, gekoppelt und die Kinase MsmS in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 62 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM) mit kontinuierlichem Fluss von 30 μ l/min über die Chipoberfläche geleitet. Gezeigt ist der Verlauf der Resonanzsignale (RU) über die Zeit nach Injektion der unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten. **(A)** Sensogramm der Bindung von MsmS an den immobilisierten Regulator MsrF. **(B)** Sensogramm der Bindung von MsmS an den immobilisierten Regulator MsrG. Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) erfolgte mithilfe des Evaluierungsprogramm Biacore 2000 Evaluation Software. n.d.: nicht nachweisbar.

Die Auswertung der SPR-Daten zeigt, dass für MsmS und MsrF bei der höchsten eingesetzten MsmS Konzentration von 1000 nM eine Assoziations- und Dissoziationsphase beobachtet werden kann (Abbildung 12 A), was auf eine schwache, aber signifikante Bindung hindeutet. Für MsmS und MsrC kann kein SPR-typischer Kurvenverlauf gezeigt werden. Für die höheren Analyt Konzentrationen von 250 nM - 1000 nM kann jedoch eine Änderung des Resonanzsignals detektiert werden, was auf eine Bindung hindeuten könnte (Abbildung 12 B). Die Resultate weisen auf eine mögliche Interaktion von MsmS mit den Regulatoren MsrG und MsrF hin. Die SPR-Analysen wurden anschließend mehrmals mit veränderten Pufferbedingungen und Proteinkonzentrationen wiederholt, jedoch konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden. Da die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie eine sehr sensitive Methode darstellt, müssen für eine gute Qualität der Interaktionsdaten einige Voraussetzungen erfüllt werden. Darunter fällt beispielsweise die Reinheit aller eingesetzten Proteine.

Wird die SDS-PAGE der Reinigung von MsmS näher betrachtet, sind auf der Höhe der relativen molekularen Masse von ca. 70 kDa in den Elutionsfraktionen weitere Proteine detektierbar (Abbildung 10 A2). Da die Proteinlösungen nach der Reinigung mittels Affinitätschromatographie keinem weiteren Reinigungsschritt unterzogen werden, ist davon auszugehen, dass die Verunreinigungen durch andere Proteine bei der anschließenden Konzentrationsbestimmung zu ungenauen Ergebnissen führen und folglich zu fehlerhaften SPR-Messungen.

Im nächsten Schritt sollte daher die Proteinausbeute und Qualität von MsmS gesteigert und anschließend erneut SPR-Analysen durchgeführt werden.

3.1.3 Optimierung der Proteinausbeute und Reinheit von MsmS

Um die Proteinausbeute von MsmS zu verbessern, wurden bereits einige Optimierungsversuche mit verschiedenen *E. coli*-Expressionsstämmen durchgeführt (Fiege und Punstein, 2020 unveröffentlicht). Da *M. acetivorans* einen von *E. coli* abweichenden Kodongebrauch hat, wurde zum einen der Stamm *E. coli* Nissle1917-RIL für die Produktion von MsmS verwendet. Das RIL Plasmid kodiert für zusätzliche tRNAs für die Aminosäuren Arginin (AUU, UAG), Leucin (CUA) und Isoleucin (AUA), welche den *E. coli* fremden Kodongebrauch zum Teil ausgleichen können. Des Weiteren wurde die Produktion in einem anderen bakteriellen Expressionswirt, *Vibrio natriegens* Vmax getestet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine doppelt so schnelle Wachstumsrate wie *E. coli* aus. In vergleichenden Studien konnte außerdem durch die Verwendung von Vmax sowohl die Ausbeute als auch die Löslichkeit von heterolog produzierten Proteinen deutlich gesteigert werden. (Eagon, 1962; Weinstock *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurde bei der Produktion von MsmS durchgehend eine niedrige Expressionstemperatur von 17 °C gewählt, da bekannt ist, dass die Senkung der Temperatur in der Regel zur Verlangsamung enzymatischer Reaktionen, wie beispielsweise der Translation führt, wodurch die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt wird (Terpe, 2006; Overton, 2014). Bislang führte jedoch keiner der oben genannten Optimierungsansätze zu einer signifikanten Steigerung der Proteinmenge.

Um dieses Ziel dennoch zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die mRNA-Struktur von *msmS* im Hinblick auf die Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb des codierenden Bereichs untersucht, da diese zur Verminderung der Translationsstabilität führen könnten. Die intrinsische Neigung Sekundärstrukturen innerhalb von codierenden Bereichen zu bilden, ist ein hochdynamischer Prozess und beeinflusst die Translation lediglich an wenigen Positionen. Dennoch sollte diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Durchgeführte Sequenzanalysen mittels *complexity test* (Integrated DNA Technologies; gBlocks® Gene Fragments Entry) vom codierenden Bereich von *msmS* deuten darauf hin, dass *msmS* eine Haarnadelstruktur mit der Stammsequenz CCAGGGCUUU an Position 944 und 2610 bilden könnte und eine Serie von sieben Guaninbasen (Poly(dG)) an Position 2730 aufweist, die die Sekundärstruktur der mRNA und folglich die Translationsstabilität beeinflussen könnte (Abbildung 34 Anhang).

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurde einerseits ein Basenaustausch an Position 2736 von Guanin zu Adenin in die DNA eingefügt, der die putative Haarnadelstruktur auflösen sollte und andererseits an Position 2613 von Adenin zu Guanin, um die Serie der Guaninbasen zu

unterbrechen. Bei den durchgeführten Basenaustauschen handelt es sich um sogenannte stille Mutationen im Gen, welche die translatierte Aminosäuresequenz von MsmS nicht verändern. Anschließend wurden die Proteine MsmSG2736A und MsmSA2613G in *E. coli* Nissle1917 produziert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und die Proteinausbeute mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Anhand der Ergebnisse ist ersichtlich, dass durch den Basenaustausch keine höheren Proteinausbeuten erzielt werden konnte (Tabelle 15).

Tabelle 15. Übersicht der Proteinausbeute von verschiedenen MsmS-Varianten im Vergleich mit dem MsmS-WT und RdmS. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.

	MsmS	MsmS G2736A	MsmS A2613G	RdmS
Proteinausbeute [µg/l Kulturvolumen]	132	119	136	9450

Trotz der geringen Ausbeute wurde anschließend eine Gel-Permeations-Chromatographie mit MsmS durchgeführt, um die Reinheit der Proteinlösung zu erhöhen und MsmS aus der Probe zu isolieren (Abbildung 13 A). Zur Identifizierung der von der Säule eluierten Proteine wurden diese mittels TCA aus den gewählten Elutionsfraktionen gefällt und per SDS-PAGE überprüft. Anhand der SDS-PAGE Analyse ist ersichtlich, dass die Proteine, die auf Höhe der molekularen Masse von 70 kDa identifiziert werden konnten, mittels GPC nicht von MsmS getrennt werden konnten (Abbildung 13 B).

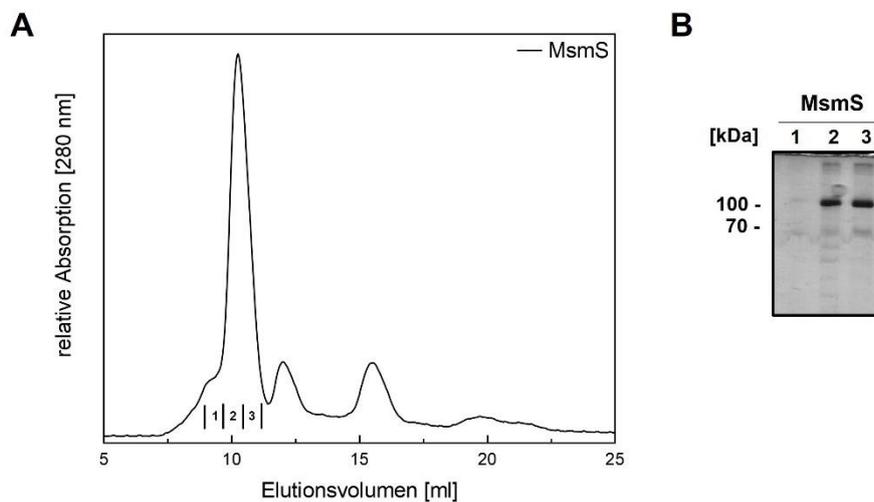


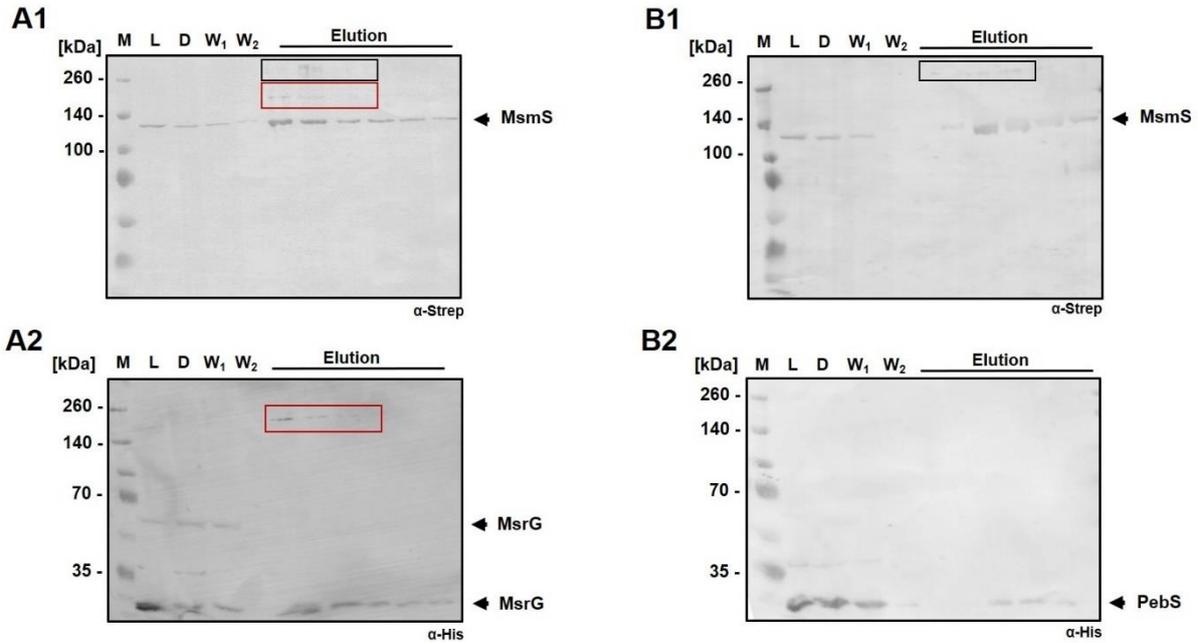
Abbildung 13. Gel-Permeations-Chromatographie von MsmS und SDS-PAGE nach TCA-Fällung. (A) Chromatogramm der präparativen GPC (Superdex® 200 Increase 10/300 GL) von MsmS. Die Absorption der Elutionsfraktionen wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. (B) SDS-PAGE-Analyse der ausgewählten Elutionsfraktionen. Mittels TCA-Fällung wurden die Proteine aus den Fraktionen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 gefällt, via SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass MsmS trotz zahlreicher Optimierungsversuche nicht in ausreichender Menge und Qualität produziert werden konnte, um weitere SPR-

Analysen durchzuführen. Um dennoch die Interaktion zwischen MsmS und den Msr-Regulatoren zu untersuchen, wurde im weiteren Verlauf eine andere Herangehensweise gewählt.

3.1.4 Untersuchung der Protein-Interaktion mittels *in vivo* Crosslinking

Neben SPR dient die *in vivo* Quervernetzung als verbreitete Methode zur Untersuchung von Protein-Interaktionen. Sie bietet die Möglichkeit transiente Wechselwirkungen zu fixieren und dadurch nachweisbar zu machen. Dabei werden kovalente Bindungen zwischen putativen Interaktionspartnern unter Zuhilfenahme von quervernetzenden Substanzen (*Crosslinker*) herbeigeführt. Um die Interaktion zwischen der Kinase MsmS und den Regulatoren MsrG, MsrF und MsrC zu untersuchen, wurden die Plasmide für die Koproduktion der His-tag tragenden Regulatoren MsrG, MsrF und MsrC und der StrepII-tag tragenden Sensorkinase MsmS (pACYC-Duet1-*msrG-msmS*; pACYC-Duet1-*msrF-msmS*, pACYC-Duet1-*msrC-msmS*) in *E. coli* Nissle1917 transformiert. Zusätzlich wurde ein Plasmid, welches das Gen für die im Genom von *E. coli* Nissle1917 fehlende T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors trägt, eingebracht. Nach der Produktion über Nacht und der Zellernte erfolgte die Zugabe des membrangängigen homobifunktionalen *Crosslinkers* Disuccinimidyl Suberat (DSS), der mit primären Aminen reagiert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Proteine mittels Strep-Tactin Sepharose gereinigt. Die Sichtbarmachung sowie der Nachweis der Protein-Interaktion erfolgte mittels Westernblot-Analysen gegen den His-tag und StrepII-tag (Abbildung 14 A und B). Als Negativkontrolle wurden die *Crosslinking*-Experimente mit MsmS und der ferredoxin-abhängigen Billinreduktase PebS aus dem Cyanophagen P-SSM2 (Dammeyer *et al.*, 2008) unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 14 B). Im Folgenden ist das Ergebnis für MsmS und MsrG und MsmS und PebS dargestellt (Abbildung 14).



C

MsmS

```

MIGVDMKLETLVNNNGPAVIFLCRAETGWPVETVTANIVRFYSPKDFISGGGLGYADIIYPADLEIAVSQFFSYVEKDYIGKDLDYKVEYREYKGEAGEHKRNGKGN
IGKDRGGYDSFTQQYRLLNKSGDVLWVEAEIKVLEEEEGKAGLFQVTVFDISRWKHTKAMPAAALDTENELKRIINSGHVIVFLWRAEPGWPVDFVSENISELGYT
PEDFTSGRIVYTDIIHPDDLNVRAEVSKNTEEGRDYFSKEYRVLAKSGEVRYVDERTLIRRNEKGEITCYQGILLDITQRKEAEELILSQNRVLERIASGASLDE
VLLLNVNVAEEMKPGLLCTVMLLDREQKRLFYGCAPSLPKLYSKAINGIQVQVNSSETAGTAAGTGKRVIVGNIMKDPFCEECEIAQKVLKACWAEPIFSSGGEV
LGVFTIYLRETRKPREEELEFIRTNAYLAGIAIEHVQAADALKESENRFRTIFDNDQLYIREPDGISYMDVNQVVVDRLGYSKEEILNMKAAEIIIPSEYWASVR
ENMQKIKAEGRIFEAGAVCKGGTVIPLEVSARIIDYGGKKTIFSVSRDITERKKAQRLNGSRLEALVKLDQAGASLKEITDFAREEAVRLTGSKLGLYLFM
DAYESTLVMHSWSDSAMESIEDKQFVYPVKSMGLWGEAVRQRKPIITNDYPAPNPLKGYPKNHVHLIRHLNIPVFDGKRIVAVAGVGNKEENYDESDVRQLTL
LMQGMWQLIQRKQLEEARLTYSGELSRANEELRSVNMKTEFVEEMMFPEKAEYGEIMDYETLYAIDSQQQKAVNTFIHYSEKLRLVDSLQYSLQLEKAGKIDYSF
EETQLKDVLSDAFLNNVFLIGEKALEVKEVSASLSEIKGDREKLTALFTALIDHAIKFTPQGGKLALEVKEEAGNVHIVIADSGRKGISKELIPLYLFDRLYQVNSD
ITRRYQGLSEGLYICKNIVDAHKEIWFEESEGLGNLMHVKLPKHGLSAWHPQFEK*
    
```

MsrG

```

MGSSHHHHHSQDAKLELLGLTFLSDKRKDLLLVERPREIEEIKNILGGTSSAIMAQIKILIGQGLIVHEREMYKLSSLGEVIVNKMDDLKTLNVYEEENRDY
WQNHNVNSVPSYLLNQIEDLGHCELVPELDRMYDLPKRIETELFKSTYLMEVSSYFSPALPSLYIELIRKGINVSLIITDPVFERFRNEYFELLEAYLNKENAN
LFCVTCNIGLASSIVTDRFLALSFFYKNGIYHNHALMSVEKDSIGWGESLFFYRKNRSPQITTSSEL*
    
```

Abbildung 14. Westernblot-Analysen des Crosslinking-Experiments zwischen der Kinase MsmS und dem Regulator MsrG sowie PebS und Sequenzabgleich der mittels massenspektrometrischer Analyse ermittelten Peptide mit der MsmS und MsrG Aminosäuresequenz. Die Kombinationen MsmS und MsrG sowie MsmS und PebS wurden in *E. coli* Nissle 1917 bei 17 °C ü. N. koproduziert. Nach der Zellernte erfolgte der *in vivo* Crosslink mit Disuccinimidyl Suberate (DSS; 7 mM (v/v)). Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und im Anschluss an die Trennung mittels SDS-PAGE per Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mittels Anti-Strep-Tactin Ap conjugate (**A1**; **B1**; α -Strep) bzw. mittels Anti-6x-His Epitop Tag- und Anti-Mouse IgG-Alkaline Phosphatase Antikörper (**A2**; **B2**; α -His) und chromogener Farbreaktion. Als Größenstandard (M) diente der Spectra TM Multicolor Broad Range Protein Ladder. L: Lysat; D: Durchlauf; W₁: 1. Waschschrift; W₂: 2. Waschschrift; Elution: Elutionsfraktionen 1-6. (**A**) Westernblot-Analyse für die Quervernetzung von MsmS und MsrG mit DSS. (**B**) Westernblot-Analyse für die Quervernetzung von MsmS und PebS mit DSS. (**C**) Sequenzabgleich der mittels massenspektrometrische Analyse ermittelten Peptide (grau hinterlegt) mit der MsmS und MsrG Aminosäuresequenz.

In den Westernblot-Analysen für die Quervernetzung von MsmS mit MsrG kann MsmS bei der berechneten molekularen Masse von 115 kDa in allen Reinigungsschritten und MsrG bei der berechneten molekularen Masse von 30 kDa in der Lysatprobe, dem Durchlauf und in den

Waschfraktionen detektiert werden. Ein weiteres Signal ist bei ca. 60 kDa im Westernblot gegen den His-tag im Lysat, dem Durchlauf und im 1. Waschschrift erkennbar, was auf die Formation von MsrG Dimeren schließen lässt. Zusätzlich können sowohl im Westernblot gegen den StrepII-tag als auch gegen His-tag in den ersten drei Elutionsfraktionen Proteine bei einer molekularen Masse größer als 140 kDa visualisiert werden, was darauf hindeutet, dass MsmS und MsrG unter den verwendeten Bedingungen mittels *Crosslinker* kovalent miteinander verbunden sind und folglich miteinander interagieren. Außerdem kann im Westernblot gegen den StrepII-tag ein weiterer Komplex bei einer molekularen Masse höher als 260 kDa in den ersten Elutionsfraktionen detektiert werden, der auf eine Verknüpfung zwischen MsmS Molekülen hindeutet (Abbildung 14 A). In den Westernblot-Analysen für die Quervernetzung von MsmS mit PebS hingegen kann MsmS bei einer molekularen Masse von 115 kDa in allen Reinigungsschritten und bei einer molekularen Masse höher als 260 kDa in den Elutionsfraktionen identifiziert werden. PebS hingegen kann ausschließlich bei der berechneten molekularen Masse von 30 kDa in der Lysatprobe, dem Durchlauf und in den Waschfraktionen identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass MsmS und PebS unter den experimentellen Bedingungen nicht miteinander interagieren (Abbildung 14 B). Um dem Proteincrosslink zwischen MsmS und MsrG zu verifizieren, wurden die Bereiche aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, mittels tryptischem In-Gel-Verdau behandelt und anschließend mittels massenspektrometrischer Analyse untersucht. Dabei konnten Peptide beider Proteine in den untersuchten Proben nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnten für MsmS 108 und für MsrG 19 Peptide nachgewiesen werden. Sequenzabgleiche der Peptide mit der Aminosäuresequenz von MsmS und MsrG (Abbildung 14 C) zeigen eine Sequenzdeckung von 70,4% für MsmS und 54,4% für MsrG.

Interaktionsanalysen mittels *in vivo* Quervernetzung von MsmS mit MsrF und MsmS mit MsrC wurden bereits durchgeführt, lieferten bislang jedoch keine aussagekräftigen Ergebnisse.

3.2 RdmS und MsmS sind keine typischen Sensorhistidinkinasen

Die Sensorkinasen MsmS und RdmS sind Multidomänen Proteine mit hoher Homologie zueinander auf Sekundärstrukturebene (60% Identität und 76% Ähnlichkeit), bestehend aus alternierenden PAS- und GAF-Domänen und einer C-terminalen HATPase-Domäne. Beide Proteine binden in der zweiten GAF-Domäne kovalent über einen Cysteinrest einen Häm-Kofaktor, der eine Vielzahl verschiedener Liganden wie DMS oder CO binden kann. *In silico* Analysen von RdmS und MsmS im Vergleich zu typischen bakteriellen Sensorhistidinkinasen (SHK) zeigten ein Fehlen der H-Box mit konserviertem Histidinrest, welcher bei der Autophosphorylierung als Phosphoakzeptor dient (Abbildung 36 Ahnang). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass MsmS und RdmS eine redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität aufweisen, die im Falle von RdmS unabhängig vom Redoxzustand des Häm-Kofaktors ist. Dünnschichtchromatographie-Analysen deuten darauf hin, dass die Kinase MsmS an einem Serin- oder Tyrosinrest(en) und die Kinase RdmS an einem Tyrosinrest(en) phosphoryliert wird (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Da Phosphorylierungen an einem Serin- oder Tyrosinrest zur Ausbildung von Phosphoesterbindungen führen, welche chemisch sehr stabil sind, ist unklar ob eine anschließende Übertragung des Phosphatrests von der Kinase auf den Regulator möglich ist. Im Folgenden sollte daher die genaue Phosphorylierungsstelle(n) innerhalb der Kinasen identifiziert und untersucht werden, inwieweit die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Interaktion der Kinase mit den Msr-Regulatoren hat. Die folgenden Experimente wurden zunächst lediglich mit der Kinase RdmS durchgeführt, da aufgrund der hohen Homologie zwischen MsmS und RdmS davon auszugehen ist, dass sie einen ähnlichen Funktionsmechanismus aufweisen.

3.2.1 Identifikation der Phosphorylierungsstelle(n) in der Kinase RdmS

Um den Bereich, in dem die Phosphorylierungsstelle(n) der Kinase RdmS liegen einzugrenzen, wurden Kinaseassays mit verkürzten Protein-Varianten durchgeführt. Da Histidinkinasen üblicherweise innerhalb der HATPase-Domäne und auch Serin/Threonin (Ser/Thr)- und Tyrosin-(Tyr)-kinasen am C-Terminus phosphoryliert werden (Marshall, 1994; Adams, 2001; Hanks, 2003; Mascher *et al.*, 2006), wurde RdmS ausgehend vom N-Terminus gekürzt. Vorerst wurden die Protein-Varianten GAF2-RdmS, bestehend aus der GAF2- und der HATPase-Domäne und HATPase-RdmS, bestehend aus der HATPase-Domäne von RdmS, in *E. coli* Nissle 1917 produziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. In anschließend durchgeführten Kinaseassays unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen mit [γ - 32 P]-ATP konnten weder für GAF2-RdmS noch für HATPase-RdmS ein Signal im Autoradiogramm detektiert werden (Abbildung 15). Dies deutet drauf hin, dass die

Phosphorylierungsstelle(n) von RdmS innerhalb der anderen PAS- und GAF-Domänen lokalisiert ist.

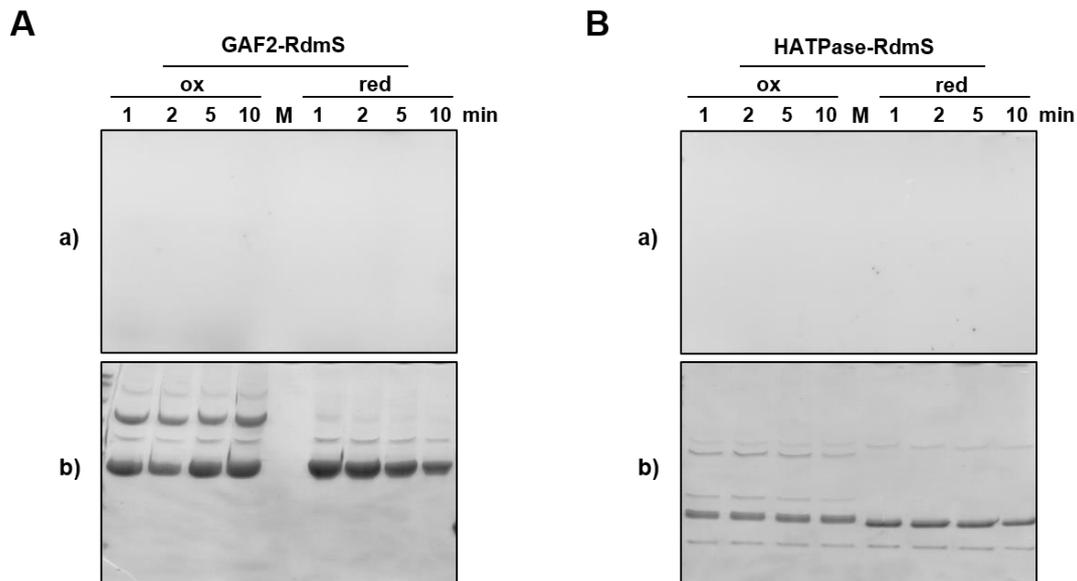


Abbildung 15. Kinaseassays von GAF2-RdmS und HATPase-RdmS mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. (A) 10 μM GAF2-RdmS wurden unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 5, 10 min) in SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol terminiert. (B) 10 μM HATPase-RdmS wurden unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 5, 10 min) in SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und über Nacht die Signale auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

Die Sensor kinase RdmS besitzt insgesamt 36 Tyrosinreste (Abbildung 35 Anhang). Vierzehn dieser Tyrosinreste konnten durch die vorangegangenen Kinaseassays der verkürzten RdmS Variante als mögliche Phosphorylierungsstelle ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, welche der verbleibenden 22 Tyrosinreste als potenzielle Phosphorylierungsstelle(n) in Frage kommen, wurden Phosphoaminosäure-Analysen mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Dazu wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigtes RdmS unter oxidierenden Bedingungen durch Zugabe von ATP mittels Kinasereaktion phosphoryliert, enzymatisch mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch über LC-MS/MS von Dr. Markus Räschle (Molekulare Genetik, TU Kaiserslautern) analysiert. Als Kontrolle diente unbehandeltes RdmS. In der massenspektrometrischen Untersuchung konnten weder Phosphotyrosin noch andere phosphorylierte Aminosäuren innerhalb der Kinase RdmS identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Detektion von über eine Kinasereaktion phosphoryliertem RdmS mittels Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin Antikörper innerhalb einer Westernblot-Analyse deuten ebenfalls nicht auf eine Phosphorylierung an einem Tyrosinrest hin. Als Negativkontrolle wurde MsrF eingesetzt und als Positivkontrollen wurde zum einen Zellysate von *Arabidopsis thaliana*

(*A. thaliana*) und zum anderen von *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), beides eukaryotische Modelorganismen, die eine Reihe von Ser/Thr- und Tyr-Kinasen zur Signaltransduktion nutzen (Hirayama & Oka, 1992; Mizoguchi *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2008), aufgetragen (Abbildung 16). Die Zellysate wurden von der Abteilung Molekulare Biotechnologie und Systembiologie der TU Kaiserslautern bereitgestellt.

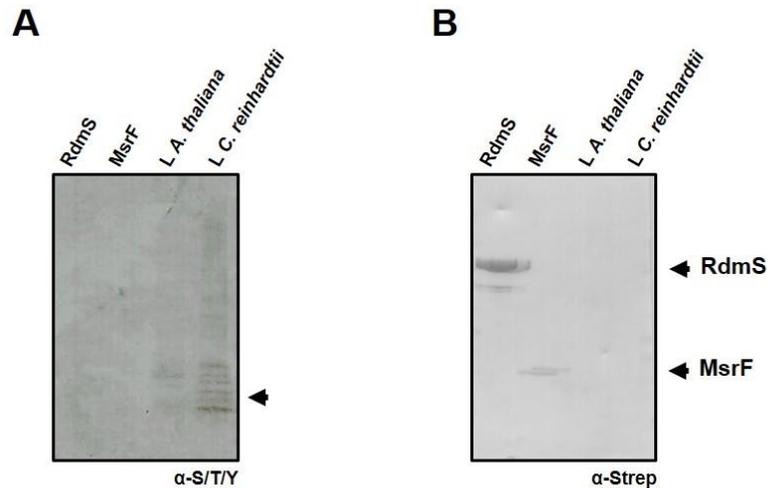


Abbildung 16. Westernblot-Analysen von phosphoryliertem RdmS, MsrF und Zellysaten gegen Phosphoserin/threonin/tyrosin Antikörper und Strep-Tactin AP[®] conjugate. 10 μ M RdmS und MsrF wurden mit ATP innerhalb einer Kinasereaktion phosphoryliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt, per Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mithilfe von Phosphoserine/threonine/tyrosine Monoclonal Antibody (α -S/T/Y) (A) oder Strep-Tactin AP[®] conjugate (α -Strep) (B) und chromogener Farbreaktion detektiert. Als Kontrolle wurde Zellysate von *Arabidopsis thaliana* (*L. A. thaliana*) und Zellysate von *Chlamydomonas reinhardtii* (*L. C. reinhardtii*) aufgetragen.

3.2.2 MsrF und RdmS zeigen unspezifische Interaktion mit ATP

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit deuten drauf hin, dass RdmS nicht wie zuvor vermutet an einem Tyrosinrest phosphoryliert wird. Da anhand der *in silico* Analysen und durchgeführter Säure-Base-Stabilitätstests (Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019) eindeutig gezeigt wurde, dass es sich auch nicht um eine Phosphorylierung an einem Histidinrest handeln kann, sollte im Weiteren die Art der Phosphorylierung von RdmS näher charakterisiert werden. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Phosphorylierung wirklich spezifischer Natur ist oder ob die Phosphorylgruppe eventuell direkt von der Kinase auf den Regulator MsrF übertragen werden kann, wurden Transphosphorylierungsassays durchgeführt. Diese wurden sowohl mit RdmS und MsrF als auch mit MsmS und MsrG durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten Kinasen mittels Kinaseassay unter oxidierenden Bedingungen mit [γ -³²P]-ATP für 10 min autophosphoryliert und anschließend für unterschiedliche Zeitspannen mit dem jeweiligen Regulator inkubiert. Überschüssiges ATP wurde nach der Kinasereaktion mittels Gelfiltrationssäule entfernt. Eine Übertragung der radioaktiv markierten Phosphorylgruppe von der Kinase auf den Regulator sollte in diesem Ansatz durch die Abnahme der Signalintensität

der Kinase bei gleichzeitiger Signalzunahme des Regulators über die Inkubationszeit deutlich werden. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der die autophosphorylierte Kinase ohne Zugabe des Regulators enthielt und ein Ansatz mit dem entsprechenden Regulator, der mittels Kinaseassay behandelt wurde (Abbildung 17).

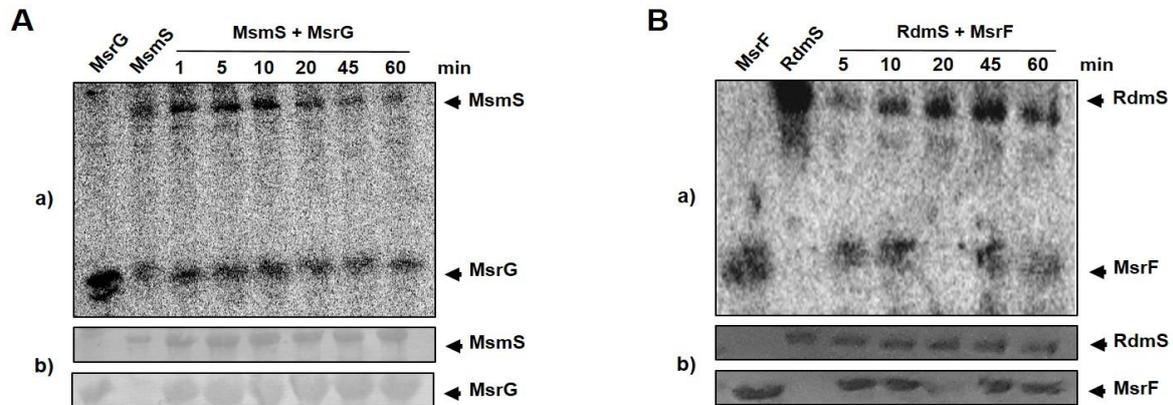


Abbildung 17. Transphosphorylierungsassay von MsmS mit MsrG und RdmS mit MsrF unter oxidierenden Bedingungen. 10 μ M der Kinasen MsmS und RdmS und als Kontrolle 10 μ M der Regulatoren MsrG und MsrF wurden unter oxidierenden Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 10 min phosphoryliert. Für die Transphosphorylierung wurden zur phosphorylierten Kinase MsmS 10 μ M des Regulators MsrG (A) und zur phosphorylierten Kinase RdmS 10 μ M des Regulators MsrF (B) hinzugegeben und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten (1, 5, 10, 20, 45, 60 min) in SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und über Nacht die Signale auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

Die Kinasen MsmS und RdmS zeigen, wie bereits durch vorangegangene Studien gezeigt, ein Signal im Autoradiogramm (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Für die Regulatoren MsrG und MsrF kann ebenfalls unabhängig von zugegebener, autophosphorylierter Kinase ein Signal im Autoradiogramm detektiert werden (Abbildung 17). Die Msr-Regulatoren besitzen einer *helix-turn-helix*-(HTH)-Motiv und eine Domäne bisher unbekannter Funktion die sogenannte DUF1724-Domäne, jedoch keine ATP-bindende-Domäne, die für ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse von Bedeutung ist. Um zu verifizieren, dass das detektierte Signal spezifisch ist und die Regulatoren somit Autophosphorylierungsaktivität aufweisen, wurden Kinaseassays mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ unter oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Unter Zuhilfenahme von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ sollte im Autoradiogramm kein Signal detektiert werden können, da bei der Kinasereaktion das Gamma-Phosphat des ATP abgespalten und auf einen Aminosäurerest innerhalb des Proteins übertragen wird. Die Ergebnisse sind exemplarisch für den Regulator MsrF gezeigt (Abbildung 18).

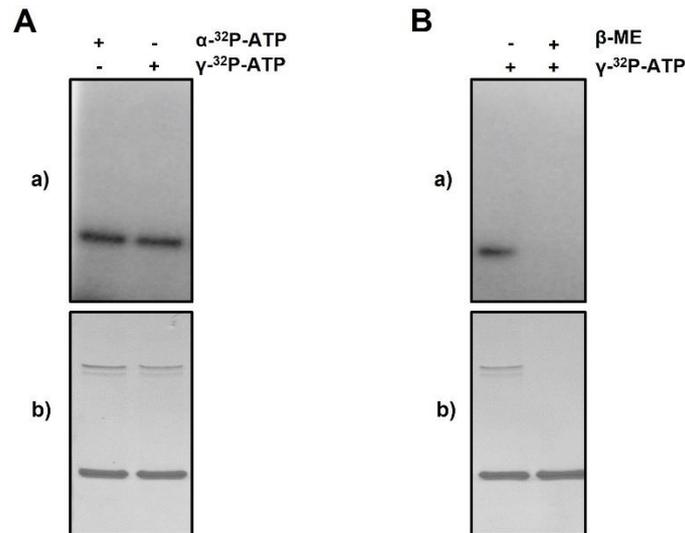


Abbildung 18. Phosphorylierungsassay von MsrF mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. (A) 10 μM MsrF wurden unter oxidierenden Bedingungen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach 10 min in SDS-Probenpuffer ohne $\beta\text{-Mercaptoethanol}$ terminiert. (B) 10 μM MsrF wurden unter oxidierenden Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach 10 min in SDS-Probenpuffer mit oder ohne $\beta\text{-Mercaptoethanol}$ terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale über Nacht auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

Nach der Autoradiographie kann sowohl für das Phosphorylierungsassay von MsrF mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als auch mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ein Signal detektiert werden (Abbildung 18 A). Dies deutet darauf hin, dass die Regulatoren keine Autophosphorylierungsaktivität besitzen und es sich um eine unspezifische Bindung von ATP an die Proteine handelt.

In früheren Studien (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019) konnte gezeigt werden, dass RdmS und MsmS lediglich unter oxidierenden Bedingungen phosphoryliert werden und somit eine redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität aufweisen. Dabei wurden sowohl in der Kinasereaktion als auch im verwendeten SDS-Probenpuffer, um die Reaktion zu terminieren, auf reduzierende Reagenzien wie Dithiothreitol (DTT) oder $\beta\text{-Mercaptoethanol}$ verzichtet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Phosphorylierungsstudien wurden folglich unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Um zu überprüfen, ob diese experimentellen Bedingungen einen Einfluss auf das Resultat der Assays haben, wurden nun erneut Kinaseassays unter oxidierenden Bedingungen durchgeführt. Die Reaktion wurde diesmal jedoch in SDS-Probenpuffer, der sowohl mit als auch ohne das reduzierende Reagenz $\beta\text{-Mercaptoethanol}$ versetzt wurde, terminiert, um auszuschließen, dass dies einen Einfluss auf das Resultat des Phosphorylierungsassays hat. Anhand des Autoradiogramms ist ersichtlich, dass lediglich die Probe, die mit Probenpuffer ohne $\beta\text{-Mercaptoethanol}$ abgestoppt wurde, ein Signal aufweist (Abbildung 18 B) und somit die Wahl des Probenpuffers im Fall von MsrF einen Einfluss zeigt.

Anschließend sollte geprüft werden, ob die unspezifische ATP Interaktion und der Einfluss von β -Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer ebenfalls für die Kinase RdmS beobachtet werden kann. Dazu wurden von RdmS Kinaseassays unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und in Ab- und Anwesenheit von β -Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer durchgeführt (Abbildung 19).

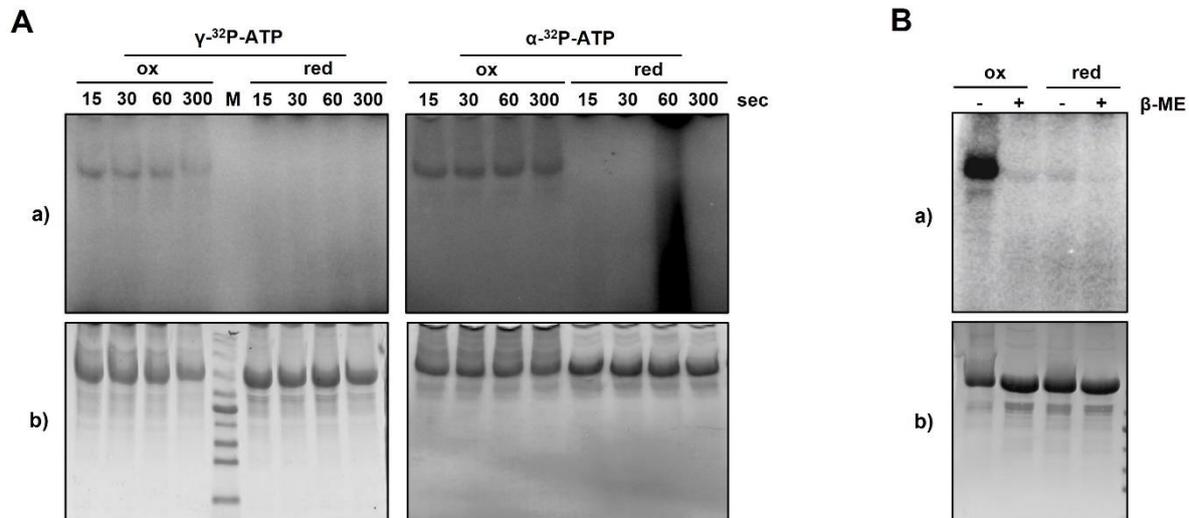


Abbildung 19. Kinaseassays von RdmS mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. (A) 10 μM RdmS wurden unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 60, 300 s) in SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol terminiert. (B) 10 μM RdmS wurden unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach 10 min in SDS-Probenpuffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale über Nacht auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

Analog zu den Ergebnissen mit dem Regulator MsrF, konnte auch für RdmS ein Signal im Autoradiogramm unter oxidierenden Bedingungen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ identifiziert werden (Abbildung 19 A). Diese Beobachtung kann für RdmS ebenfalls ausschließlich in der Abwesenheit von β -Mercaptoethanol gemacht werden (Abbildung 19 B), was auf eine unspezifische Interaktion des Proteins mit ATP hindeutet.

3.2.3 ATP zeigt unspezifische Interaktion mit verschiedenen Proteinen

Anhand von Phosphorylierungsassays mit alternativen Proteinen ohne bekannte Autophosphorylierungsaktivität sollte untersucht werden, inwieweit es sich bei der für die Kinasen RdmS und den Regulator MsrF beobachtete unspezifische Interaktion mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ unter oxidierenden Bedingungen um ein generelles Phänomen oder einen für RdmS und MsrF spezifischen Effekt handelt. Dafür wurden die Proteine Albumin und Carboanhydrase aus *Bos taurus* (66 kDa und 30 kDa), Alkoholdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (36 kDa)

und β -Amylase aus *Ipomoea batatas* (56 kDa) verwendet. Als Kontrolle diente die bakterielle Sensorhistidinkinase BphP aus *Pseudomonas aeruginosa*, für die eine spezifische Autophosphorylierung am Histidinrest der Position 513 bekannt ist (Tasler *et al.*, 2005). Die Variante BphP-H513A weist einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Alanin an Position 513 auf und zeigt somit keine Autophosphorylierungsaktivität mehr. Die Proteine wurden wie zuvor mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ phosphoryliert und die Reaktion nach 30 min in Probenpuffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol terminiert (Abbildung 20).

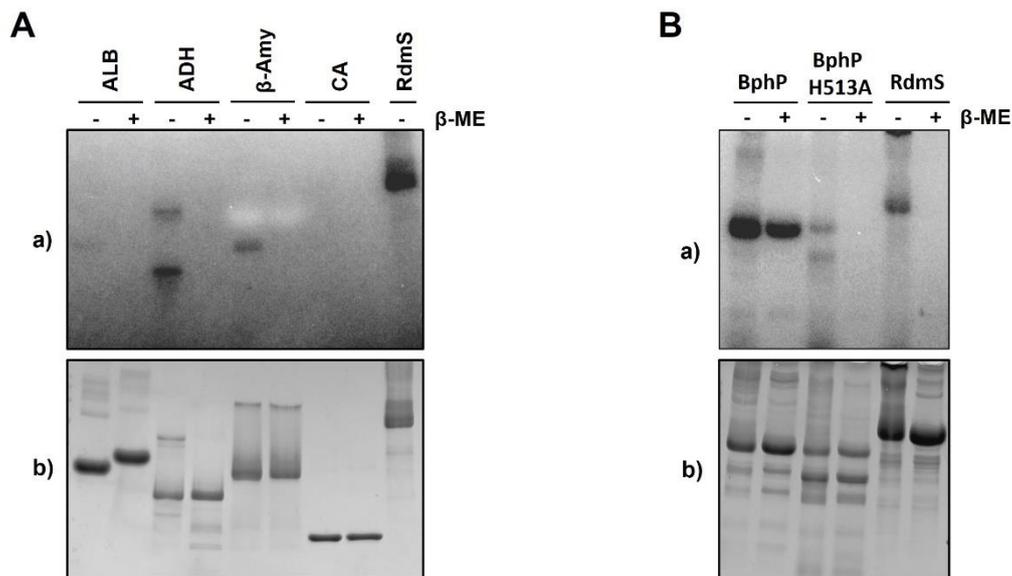


Abbildung 20. Phosphorylierungsassay mit verschiedenen Standardproteinen und der bakteriellen Sensorhistidinkinase BphP aus *P. aeruginosa* unter oxidierenden Bedingungen. Jeweils 10 μM der Standardproteine Albumin (ALB), Alkoholdehydrogenase (ADH), β -Amylase (β -Amy), Carboanhydrase (CA), RdmS, BphP und BphPH513A wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ unter oxidierenden Bedingungen inkubiert und die Reaktion nach 10 min in SDS-Probenpuffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale über Nacht auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (A) Phosphorylierungsassay von Standardproteinen und RdmS unter ox. Bedingungen. (B) Phosphorylierungsassay von BphP, BphPH513A und RdmS unter ox. Bedingungen. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

Das Autoradiogramm zeigt für alle getesteten Proteine, mit Ausnahme der Carboanhydrase, ein Signal sofern dem Probenpuffer kein β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde (Abbildung 20). Das BphP-WT Protein zeigt sowohl bei Anwesenheit als auch bei Fehlen von β -Mercapthoethanol im Probenpuffer ein Signal im Autoradiogramm. Im Vergleich dazu konnte für die Variante BphP H513A lediglich für den Ansatz ohne β -Mercapthoethanol ein schwaches Signal detektiert werden (Abbildung 20 B).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass verlässliche Aussagen über die Autophosphorylierungsaktivität von Kinasen nur gemacht werden kann, wenn diese in Gegenwart von reduzierenden Reagenzien untersucht werden.

3.3 Die Kinase RdmS bindet und hydrolysiert ATP

Aufgrund der vorangegangenen Analysen kann davon ausgegangen werden, dass weder RdmS noch MsmS die zuvor beschriebene redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität aufweisen. Da *in silico* Analysen von RdmS und MsmS jedoch typische Sequenzmotive für die Bindung von ATP zeigen (Abbildung 36 Anhang) und ATP Bindung sowie dessen Hydrolyse Voraussetzung für Kinasen ist, sollte dies im Folgenden untersucht werden.

3.3.1 Charakterisierung der Interaktion von RdmS mit TNP-ATP

Um eine mögliche Interaktion von RdmS mit ATP zu identifizieren, wurde das ATP-Derivat 2'-(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosin 5'-triphosphat (TNP-ATP) verwendet. So kann die Bindung an Proteine mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Liegt die Trinitrophenyl-Verbindung gebunden an Proteine abgesondert von der wässrigen Lösung in hydrophoberer Umgebung vor, führt dies zum Anstieg der Fluoreszenzintensität (Stewart *et al.*, 1998; Woodbury *et al.*, 2021). Untersuchungen bezüglich der Bindung von ATP an Kinasen konnten so beispielsweise für CheA (Stewart *et al.*, 1998; Bilwes *et al.*, 2001) und EnvZ (Plesniak *et al.*, 2002) durchgeführt werden.

Zusätzlich zur Interaktion von RdmS mit TNP-ATP wurden Fluoreszenzemissionsspektren von TNP-ATP mit der Kinase MA4377 aus *M. acetivorans* als Positivkontrolle durchgeführt. MA4377 ist eine membranständige Hybridkinase bakteriellen Ursprungs, die spezifisch am Histidinrest an Position 497 autophosphoryliert wird (Sexauer, 2021). Für die Untersuchungen wurde eine verkürzte Variante (MA4377PKR1R2), bestehend aus PAS-, HisKA- und den beiden REC-Domänen R1 und R2, verwendet. Zunächst wurden Fluoreszenzemissionsspektren von Reaktionsansätzen mit TNP-ATP in An- und Abwesenheit von gereinigtem RdmS, MA4377PKR1R2 und als negativ Kontrolle zusätzlich von MsrF aufgenommen (Abbildung 21).

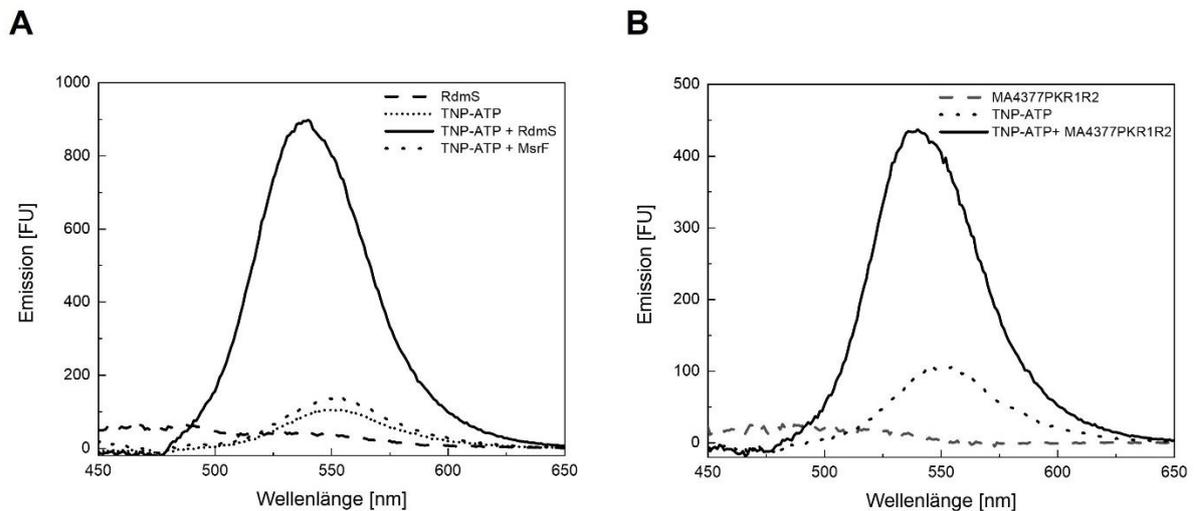


Abbildung 21. Fluoreszenz-Emissionsspektren von TNP-ATP in An- und Abwesenheit von RdmS, MsrF und MA4377PKR1R2. Für die Messungen wurden 5 μM TNP-ATP mit jeweils 5 μM RdmS, MsrF und MA4377PKR1R2 in entsprechendem Puffer versetzt und Fluoreszenz-Emissionsspektren mit dem Fluoreszenzspektrometer FP-8300 (Jasco) nach 1 min detektiert. Die Anregungswellenlänge lag bei 410 nm. **(A)** Fluoreszenz-Emissionsspektrum von TNP-ATP in An- und Abwesenheit von RdmS sowie MsrF. **(B)** Fluoreszenz-Emissionsspektrum von 5 μM TNP-ATP in An- und Abwesenheit von MA4377PKR1R2.

Das Fluoreszenzemissionsspektrum von TNP-ATP zeigt eine 9-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von RdmS (Abbildung 21 A) und eine 4,5-fache Zunahme in Anwesenheit von MA4377PKR1R2 (Abbildung 21 B). Zusätzlich kann eine leichte blauverschobene Abweichung des Absorptionsmaximums in Gegenwart der beiden untersuchten Proteine beobachtet werden (Abbildung 21). Hingegen ist in Anwesenheit von MsrF kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Das Fluoreszenzspektrum ähnelt dem des Reaktionsansatzes mit TNP-ATP ohne Proteinzugabe (Abbildung 21 A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RdmS einen spezifischen Komplex mit dem ATP-Derivat bildet und somit ATP binden kann.

In einem weiteren Schritt wurde die Bindungsaffinität zwischen TNP-ATP und RdmS in Form der Gleichgewichtsdissoziationskonstante mittels Fluoreszenz-basierter Titration bestimmt. Dazu wurde zu einer konstanten RdmS Konzentration von 2,5 μM , 5 μM oder 7,5 μM eine variable Konzentration an TNP-ATP (0 - 50 μM) hinzutitriert, ein Fluoreszenzemissionsspektrum aufgenommen und die Emission bei 541 nm bestimmt (Abbildung 41). Als Positivkontrolle wurde das Titrations-Experiment ebenfalls mit MA4377PKR1R2 durchgeführt. In Tabelle 16 sind die unter Verwendung der numerischen *Solver*-Funktion von *Microsoft Excel* errechneten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten gemittelt über jeweils drei Messungen dargestellt. Der berechnete K_D -Wert lag für die Kinase RdmS bei 3,8 μM und für die Kinase MA4377 bei 5,3 μM . Sie wichen damit geringfügig voneinander ab, lagen jedoch beide im selben niedrig mikromolaren Größenbereich.

Tabelle 16. Bindungsaffinitäten von RdmS mit TNP-ATP und MA4377PKR1R2 mit TNP-ATP. Die K_D -Werte der Fluoreszenz-Emissionsspektroskopisch-basierten Titration wurde unter Verwendung der numerischen Solver-Funktion von *Microsoft Excel* berechnet. Die Ergebnisse wurden über drei unabhängige Messungen gemittelt.

Protein	K_D [μM]
RdmS	$3,8 \pm 0,7$
MA4377PKR1R2	$5,3 \pm 0,3$

3.3.2 Charakterisierung der ATP-Hydrolyseaktivität von RdmS

Mithilfe des ATP-Derivats konnte gezeigt werden, dass die Kinase RdmS ATP binden kann. Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob das gebundene ATP auch hydrolysiert wird. Dazu wurden ADP-Glo-Kinaseassays durchgeführt, die auf einem Lumineszenz-basierte ADP-Nachweissystem beruhen. Wie im vorangegangenen Experiment diente die Kinase MA4377 als Positivkontrolle und als Negativkontrollen dienten jeweils ein Ansatz ohne Protein und ein Ansatz mit hitzeinaktiviertem RdmS (Abbildung 22). Zudem wurde eine Standardkurve der Umsetzung von ATP zu ADP aufgenommen, die als Kalibriergerade zur Quantifizierung des ATP Umsatzes während der Kinasereaktion verwendet wurde (Abbildung 9).

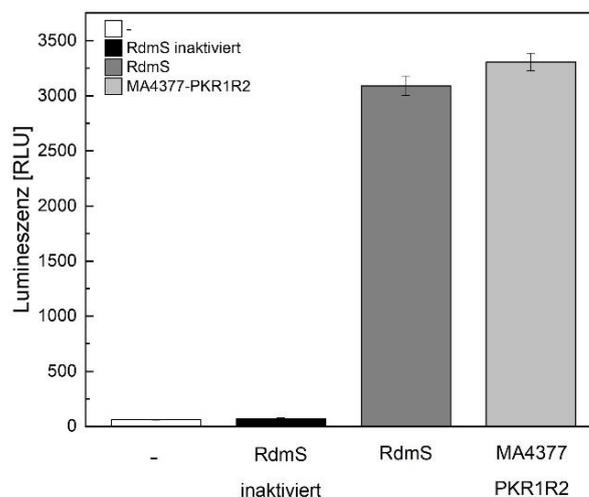


Abbildung 22. ATP-Hydrolyseaktivität von RdmS und MA4377PKR1R2. Gemäß Protokoll des ADP-Glo™ Kinase Assay Kits (Promega) wurden 10 μM RdmS und 10 μM MA4377PKR1R2 mit 10 μM ATP in einem Kinaseansatz von 25 μl für 30 min inkubiert. Durch Zugabe des ADP-Glo™ Reagenz wurde im Anschluss an die Kinasereaktion unverbrauchte ATP eliminiert und gebildetes ADP wiederum in ATP umgewandelt. Das anschließend über eine Luciferase-Reaktion generierte Lumineszenzsignal wurde im FLUOstar® Omega microplate reader (BMG Labtech) gemessen. Das Lumineszenzsignal ist dabei proportional zu der während der Kinasereaktion produzierten ADP Menge und korreliert somit mit der Kinaseaktivität von RdmS, bzw. MA4377PKR1R2. Als Negativkontrollen fugierten Ansätze ohne Proteinzugabe (-) und durch Hitze inaktiviertes RdmS (RdmS inaktiviert). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Kinasereaktionen. RLU: *relative light unit*.

RdmS und MA4377PKR1R2 zeigen im Vergleich zu den Negativkontrollen einen deutlichen Anstieg des Lumineszenzsignals, was auf die Fähigkeit der Proteine gebundenes ATP zu hydrolysieren, hindeutet (Abbildung 22). Unter Berücksichtigung der Kalibriergerade

(Abbildung 9) wurde der ATP Umsatz für RdmS und MA4377PKR1R2 berechnet. RdmS war in der Lage 46% des eingesetzten ATPs zu ADP umzusetzen und für MA4377PKR1R2 lag der Umsatz bei 50%.

Durch die vorangegangenen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Kinase RdmS ATP binden und dieses auch hydrolysieren kann. Da jedoch keine Autophosphorylierungsaktivität bestätigt werden konnte, stellt sich unmittelbar die Frage: Wer oder was ist der Phosphoakzeptor?

3.3.3 Wer oder was ist der Phosphoakzeptor von RdmS?

Von eukaryotischen Proteinkinasen ist bekannt, dass diese durch andere Kinasen phosphoryliert werden können oder die Phosphatgruppe des ATP auf andere *downstream* lokalisierte Kinasen, Regulatoren, Adapterproteine oder Substrate übertragen können (Taylor *et al.*, 2012). Betrachtet man die genomische Umgebung von RdmS und MsmS genauer (Abbildung 3) liegen die Gene, die für die Regulatoren MsrF und MsrG kodieren, direkt *downstream*. Andere potenzielle Phosphoakzeptorproteine können in unmittelbarer genomischer Umgebung nicht identifiziert werden. Daher sollte unter reduzierenden Bedingungen zunächst überprüft werden, ob nach der ATP-Hydrolyse die Phosphorylgruppe direkt auf MsrF übertragen wird. Da auch nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Phosphatrest auf eine der anderen Kinasen übertragen werden kann und die Kinase MA4377 möglicherweise in das in dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktionsnetzwerk involviert sein könnte wurden zusätzlich Assays durchgeführt, mit denen eine gegenseitige Phosphorylierung der Kinasen RdmS und MA4377 untersucht wurde.

Die Phosphorylierungsassays wurden für diesen Zweck unter reduzierenden Bedingungen durch die Zugabe von DTT im Kinasepuffer und β -Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer durchgeführt. Zunächst wurde der Phosphorylgruppentransfer von RdmS auf MsrF bzw. auf MA4377PKR1R2 (verkürzte Variante von MA4377, bestehend aus PAS- und HisKA-Domäne, sowie den fusionierten REC-Domänen REC1 und REC2) sowie die Übertragung der Phosphorylgruppe von der Kinase MA4377PKR1R2 auf RdmS getestet. Weiterhin wurde überprüft, ob ein Signal detektiert werden kann, wenn das Lysat von *M. acetivorans*-Kulturen mit den jeweiligen Kinasen innerhalb der Phosphorylierungsreaktion inkubiert wurde, um mögliche weitere Phosphoakzeptoren zu identifizieren. Als Kontrolle dienten je einen Ansatz, der das Protein ohne potentiellen Phosphoakzeptor enthielt und die Kinase BphP (Abbildung 23). Zusätzlich wurde die Kinasereaktion nicht wie in vorangegangenen Assays für eine gewisse Zeit vorinkubiert ehe der Reaktionspartner hinzugegeben wurde, sondern diese wurden unmittelbar nach der Entfernung des überschüssigen ATP mittels Gefiltrationssäule, dazugeben.

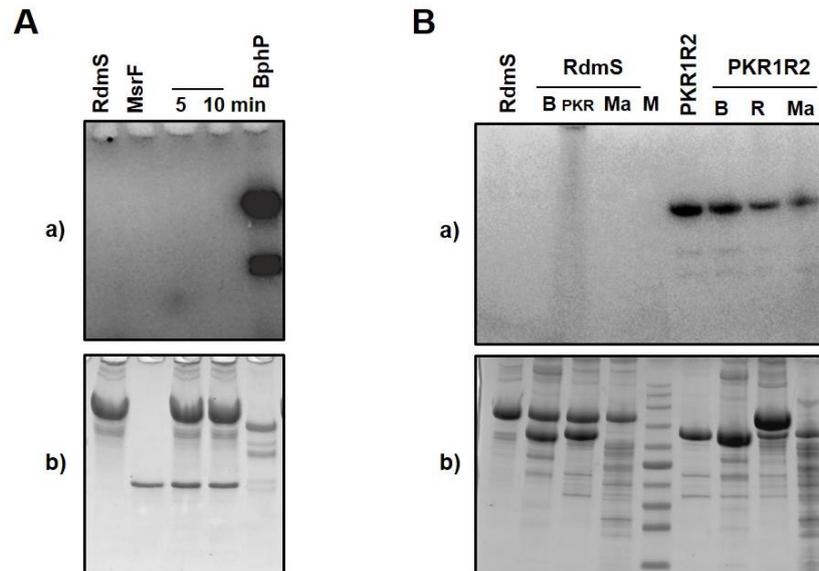


Abbildung 23. Transphosphorylierungsassays von RdmS mit verschiedenen Proteinen unter reduzierenden Bedingungen. (A) Transphosphorylierungsassay von RdmS mit MsrF unter reduzierenden Bedingungen. (B) Transphosphorylierungsassay von RdmS mit BphP, MA4377PKR1R2 (PKR) und Lysat von *M. acetivorans* (Ma) und MA4377PKR1R2 (PKR1R2) mit BphP, RdmS (R) und Lysat von *M. acetivorans* unter reduzierenden Bedingungen. 10 μ M der phosphorylierten Kinase wurden zu 10 μ M des jeweiligen Proteins gegeben und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten (5, 10 min in **A**; und 10 min in **B**) in SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und über Nacht die Signale auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels. Für die Lysatprobe wurde *M. acetivorans* in HS-Medium supplementiert mit 125 mM Methanol angezogen.

Für das Phosphorylierungsassay von RdmS mit dem Regulator MsrF kann unter den gewählten Bedingungen kein Signal im Autoradiogramm detektiert werden (Abbildung 23 A). Die Kinase MA4377PKR1R2 weist Autophosphorylierungsaktivität auf, jedoch kann kein Signal für eines der anderen Proteine identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass die Phosphorylgruppe weder auf RdmS noch auf BphP oder eines der Proteine aus dem Zelllysat von *M. acetivorans* unter den getesteten Bedingungen übertragen wird (Abbildung 23 B rechts). Für die Kinase RdmS kann unter den getesteten Bedingungen ebenfalls keine Übertragung der Phosphatgruppe auf eines der untersuchten Proteine ermittelt werden (Abbildung 23 B links).

3.4 Untersuchung der Transkriptionsregulation durch die Msr-Regulatoren

Die Transkriptionsregulatoren MsrC, MsrF und MsrG gehören zur archaeellen Msr-Familie regulatorischer Proteine, deren N-terminale Region Ähnlichkeiten zu bakteriellen ArsR-Regulatoren aufweisen. Die Regulatoren bestehen aus einem N-terminalen HTH-Motiv und einer C-terminal fusionierten Domäne unbekannter Funktion (DUF1724-Domäne), die ausschließlich innerhalb der Domäne der *Archaea* gefunden werden kann. Außerdem fehlt ihnen eine für bakterielle Antwortregulatoren typische REC-Domäne (Bose *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2009). Die Msr-Proteine können zudem exklusiv innerhalb des Phylums der *Euryarchaeota*, in der Klasse der *Halobacteria*, *Methanobacteria*, *Archaeoglobi* und *Methanomicrobia* gefunden werden. Obwohl die Mehrzahl dieser *Archaea* ein bis zwei Msr-Vertreter im Genom kodieren, kann ein erheblicher Anteil innerhalb der Familie der *Methanosarcinacea* ausgemacht werden. So besitzt *M. acetivorans* 25 Msr-Vertreter, 16 können in *Methanosarcina bakeri* und 20 in *Methanosarcina mazei* Gö1 identifiziert werden. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Msr-Proteine MsrG, MsrF und MsrC wurden bereits fünf weitere Vertreter, die ebenfalls in den C1-Metabolismus von *M. acetivorans* involviert sind, näher untersucht. Diese umfassen die methanolspezifischen Methyltransferaseregulatoren MsrA, MsrB, MsrD und MsrE (Bose & Metcalf, 2008) und den Methylmercaptopropionatregulator MsrH (Fu & Metcalf, 2015).

Für MsrG, MsrF und MsrC konnte bereits ein Einfluss auf die Regulation der Genexpression der methylsulfidspezifischen Methyltransferasen MtsD, MtsH und MtsF gezeigt werden. Dabei aktiviert MsrG die Expression von *mtsH*, MsrF die Expression von *mtsD* und MsrC die Expression von *mtsF* (Bose *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus der Transkriptionsregulation dieser Methyltransferasen ist jedoch noch unklar. Daher sollte in dieser Arbeit die Wechselwirkung der Msr-Regulatoren mit den Promotorbereichen der jeweiligen *mts*-Gene unabhängig von dem Einfluss der Kinasen näher untersucht werden.

3.4.1 MsrF und MsrG bilden keine Heterodimere

Von den Msr-Regulatoren MsrA/MsrB und MsrD/E ist bekannt, dass diese als Heterodimer direkt an die Zielpromotoren der für die methanolspezifischen Methyltransferase MtaCB1 und MtaCB2 kodierenden Gene binden und dort die Transkription aktivieren (Bose *et al.*, 2009; Lopez Munzo, 2017). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch die Regulatoren MsrF und MsrG für die bereits eine Interaktion mit den Kinasen RdmS und MsmS nachgewiesen wurde, für die Regulation ihrer jeweiligen Zielgene Heterodimere ausbilden. Dies wurde mithilfe von

Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) sowie SPR-Analysen untersucht. Mittels analytischer GPC sollte zunächst der Oligomerisierungsgrad von MsrF und MsrG, jeweils alleine und zusammen in einem äquimolaren Verhältnis untersucht werden. Dazu wurde vorab eine Eichgerade (Abbildung 39 Anhang) mit bekannten Markerproteinen erstellt, um über diese den hydrodynamischen Radius und somit den Oligomerisierungszustand der Proteine festzustellen. Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt und über die GPC aufgetrennt. Zur Identifizierung der von der Säule eluierten Proteine wurden diese mittels TCA aus den gewählten Elutionsfraktionen gefällt und per SDS-PAGE überprüft (Abbildung 24 A und B). Für die SPR -Analysen wurde das gereinigte MsrG via C-terminalem His-*tag* auf einen CM5 Chip, der eine Anti-His Antikörper Oberfläche besitzt, immobilisiert. Unmittelbar danach wurden der StrepII-*tag* tragende Regulator MsrF in verschiedenen Konzentration über die Chip-Oberfläche geleitet und Sensogramme aufgenommen (Abbildung 24 C).

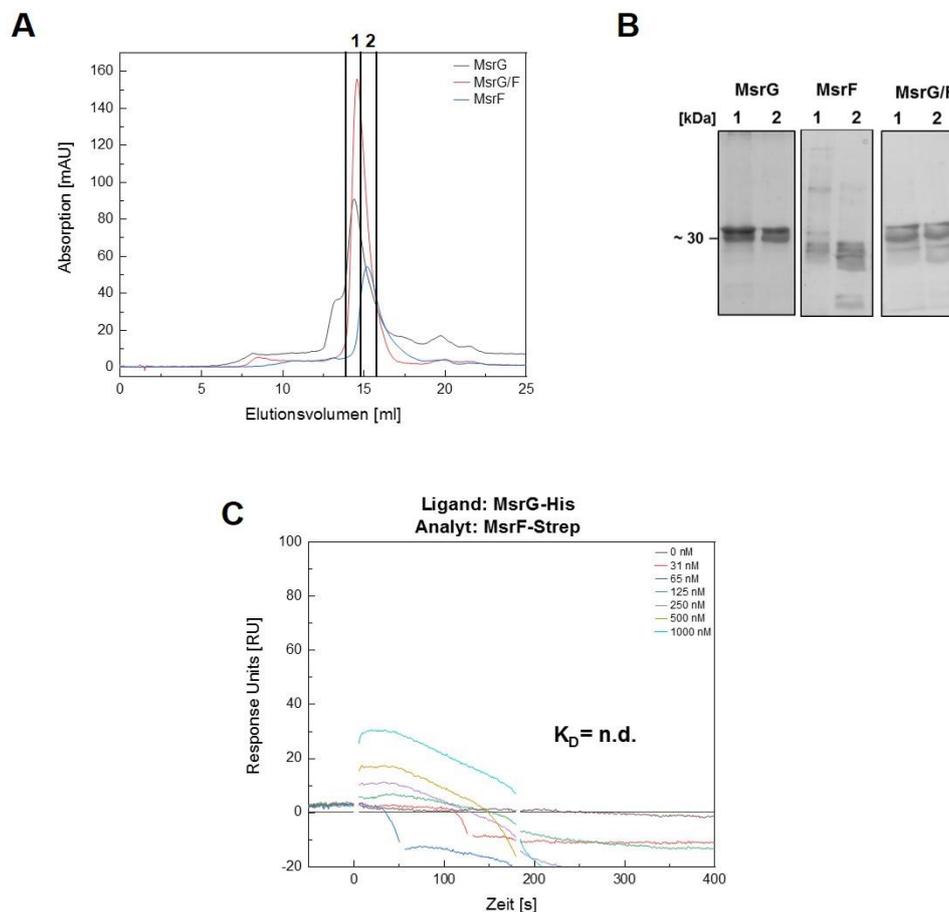


Abbildung 24. Untersuchung des Oligomerisierungsgrades von MsrF und MsrG und SPR-Analyse der Interaktion von MsrG mit MsrF. (A) Chromatogramm der analytischen GPC (Superdex® 200 Increase 10/300 GL) von MsrG (schwarz), MsrF (blau) und MsrG mit MsrF im Verhältnis 1:1 (rot). Die Absorption der Elutionsfraktionen wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. (B) SDS-PAGE-Analyse der ausgewählten Elutionsfraktionen. Mittels TCA-Fällung wurden die Proteine aus den Fraktionen 1 und 2 gefällt, via SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. (C) SPR-Analyse der Interaktion von MsrG mit MsrF. MsrG wurde als Ligand auf einen carboxymethylierten Dextran Sensorchip (CM5), der eine Anti-His tag Antikörper-Oberfläche besitzt gekoppelt und MsrF in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM, 31 nM, 62 nM 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM) mit kontinuierlichem Fluss von 30 µl/min über den Chip geleitet. Gezeigt ist der Verlauf der Resonanzsignale (RU) über die Zeit nach Injektion.

In der Gel-Permeations-Chromatographie eluiert MsrG bei einem Volumen von 14,5 ml und MsrF bei einem Volumen von 15 ml von der Säule (Abbildung 24 A). Durch Vergleiche mit der Eichgerade lässt sich eine Masse von ca. 31 kDa für MsrG und 38 kDa für MsrF ableiten (Abbildung 39 Anhang), welches mit der berechneten (MW = 31 kDa) und per SDS-Gel (Abbildung 24 B) ermittelten Masse eines Monomers übereinstimmt. MsrG und MsrF in einem äquimoralen Verhältnis eluieren mit einem Volumen von ca. 14,8 ml von der Säule (Abbildung 24 A), was einer Masse von ca. 35 kDa entspricht. Damit formen MsrG und MsrF unter den getesteten Bedingungen ausschließlich Monomere und es werden keine höheren Oligomere gebildet. Auch mittels SPR-Analyse konnte keine Interaktion der beiden Regulatoren nachgewiesen werden (Abbildung 24 C), was darauf hindeutet, dass die Regulatoren unter den getesteten Bedingungen keine Heterodimere bilden.

3.4.2 Electrophoretic mobility shift assays von MsrF mit der Promotorregion von *mtsD*

Mithilfe der *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) sollte überprüft werden, ob eine direkte Bindung der Msr-Regulatoren an die Promotorbereiche der *mts*-Gene stattfindet. Dazu wurden die rekombinant produzierten und mittels Affinitätschromatographie gereinigten Msr-Regulatoren in steigenden Konzentrationen eingesetzt und mit DNA-Fragmenten, die den Promotorbereich der jeweiligen *mts*-Gene abdecken, inkubiert. Um die Binderegion einzugrenzen, wurden sukzessiv kleiner werdende DNA-Fragmente verwendet, die eine Größe von ca. 400 bp bis 100 bp besitzen und mittels PCR amplifiziert wurden. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Proteinzugabe. Zunächst wurde die Interaktion des Regulators MsrF mit den Promotorbereich von *mtsD* untersucht (Abbildung 25).

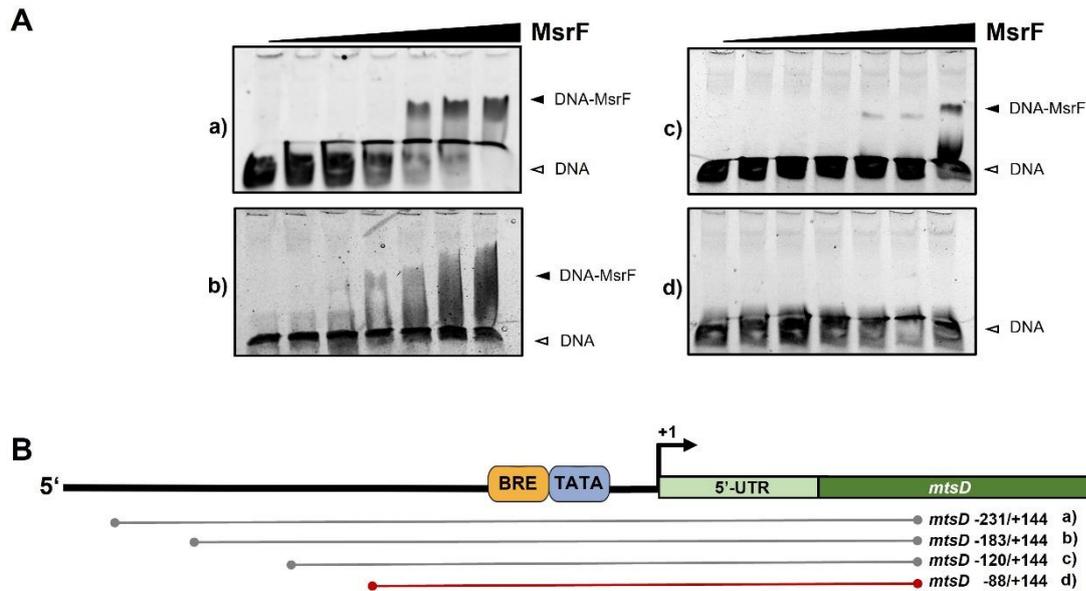


Abbildung 25. EMSA von MsrF und verschiedenen DNA-Fragmenten der *mtsD*-Promotorregion. (A) EMSA von MsrF mit den verschiedenen DNA-Fragmenten der *mtsD*-Promotorregion. Die DNA-Fragmente, die den Promotorbereich von *mtsD* umfassen, wurden mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Für die Bindestudien wurden jeweils 20 ng der amplifizierten DNA-Fragmente mit steigenden MsrF-Konzentrationen (0 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,3 μ M, 0,4 μ M, 0,6 μ M, 0,8 μ M) 30 min bei RT inkubiert und über ein TBE-Acrylamidgel (5% v/v) aufgetrennt. Die DNA wurde mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR[®] Green markiert und die Emission nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 600 nm detektiert. a) EMSA mit dem *mtsD* -231/+144 Fragment und steigenden MsrF-Konzentrationen. b) EMSA mit dem *mtsD* -183/+144 Fragment und steigenden MsrF-Konzentrationen. c) EMSA mit dem *mtsD* -120/+144 Fragment und steigenden MsrF-Konzentrationen. d) EMSA mit dem *mtsD* -88/+144 Fragment und steigenden MsrF-Konzentrationen. (B) *mtsD*-Promotorregion mit den jeweils verwendeten DNA-Fragmenten. BRE: BRE-Element (gelb); TATA: TATA-Box (blau); +1: Transkriptionsstart; 5'-UTR: 5' untranslatierte Region (hellgrün); *mtsD*-Gen (grün). DNA-Fragmente, für die eine Bindung mit dem Regulator nachgewiesen wurde, sind in grau und DNA-Fragmente, für die keine Bindung nachgewiesen wurde, sind in rot dargestellt.

Das *mtsD*-231/+144 Fragment stellt mit 375 bp das längste getestete *mtsD*-Promotorfragment dar, das den Promotorbereich von -231 bis +144 abdeckt und neben den Sequenzen für das BRE-Element und die TATA-Box die Sequenz der 5'-UTR und Teile des kodierenden Bereichs von *mtsD* enthält. Die EMSA für die Bindung von MsrF an das *mtsD*-231/+144 Fragment zeigen, dass mit zunehmender MsrF Konzentration, der Anteil an freier DNA abnahm, während der Anteil gebundener DNA (DNA-MsrF) zunahm (Abbildung 25 Aa). Zu erkennen ist dies durch die Änderung des Laufverhaltens des eingesetzten DNA-Fragments in den hochmolekularen Bereich des Gels im Vergleich zum Reaktionsansatz ohne Proteinzugabe. Für die Fragmente *mtsD*-183/+144 und *mtsD*-120/+144, die ausgehend vom 5'-Ende verkürzt wurden, kann mit zunehmender MsrF Konzentration ebenfalls eine Verschiebung der DNA in den hochmolekularen Bereich beobachtet werden (Abbildung 25 Ab und Ac). Für das Fragment *mtsD*-88/+144, das ausgehend von 5'-Ende eine um 143 bp verkürzte Variante des *mtsD*-231/+144 darstellt, kann keine Änderung des Laufverhaltens der DNA festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass dieses DNA-Fragment nicht mehr durch MsrF gebunden

werden kann (Abbildung 25 Ad). Daher muss sich die Erkennungssequenz von MsrF im *mtsD*-Promotor im Bereich zwischen -231 und -88 stromaufwärts des Transkriptionsstarts befinden.

Um die Spezifität der MsrF-Bindung an den *mtsD*-Promotorbereich zu verifizieren, wurden Kontrollexperimente mit Heringssperma-DNA als Kompetitor durchgeführt. Dazu wurde EMSA mit dem *mtsD*-231/+144 Fragment, für das eine Bindung von MsrF bestätigt werden konnte, durchgeführt und einzelsträngige Heringssperma-DNA im Überschuss hinzugegeben (Abbildung 26 A). Würde es sich um eine unspezifische Interaktion von MsrF mit der *mtsD*-DNA handeln, würde durch die Zugabe der Heringssperma-DNA der Anteil des MsrF-DNA-Komplexes im Gel abnehmen.

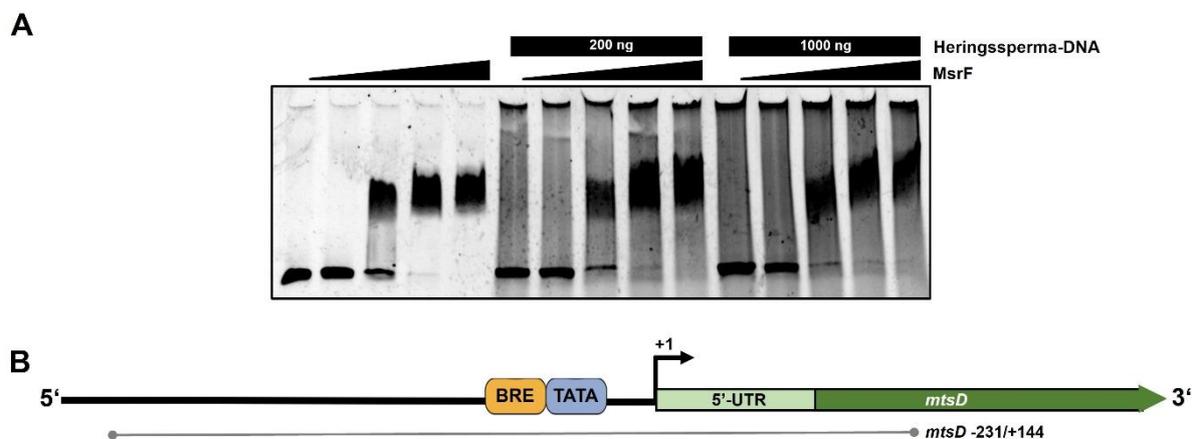


Abbildung 26. EMSA von MsrF und der *mtsD*-Promotorregion und Heringssperma DNA. (A) EMSA von MsrF mit dem *mtsD* -231/+144 Fragment. Das DNA-Fragmente das den Promotorbereich von *mtsD* umfasst, wurde mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Für die Bindestudien wurden 20 ng des amplifizierten DNA-Fragmentes mit steigenden MsrF-Konzentrationen (0 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,6 μ M, 0,8 μ M) und jeweils 0 ng, 200 ng oder 1000 ng einzelsträngiger Heringssperma-DNA als Kompetitor für 30 min bei RT inkubiert und über ein TBE-Acrylamidgel (5% v/v) aufgetrennt. Die DNA wurde mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR[®] Green markiert und die Emission nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 600 nm detektiert. (B) *mtsD*-Promotorregion mit dem verwendeten DNA-Fragmenten. BRE: BRE-Element (gelb); TATA: TATA-Box (blau); +1: Transkriptionsstart; 5'-UTR: 5' untranslatierte Region (hellgrün); *mtsD*-Gen (grün).

Die Auswertung des EMSA-Experiments, bei der die spezifische Bindung von MsrF an den *mtsD*-Promotorbereich untersucht werden sollte zeigt, dass die Zugabe der Heringssperma-DNA keine Veränderung in der Komplexbildung zwischen MsrF und dem untersuchten *mtsD*-Promotor-Fragment im Vergleich zum Ansatz ohne Kompetitor-DNA hervorruft (Abbildung 26 A). Daher kann eine unspezifische Interaktion von MsrF mit dem *mtsD*-Promotorbereich ausgeschlossen werden.

3.4.3 Electrophoretic mobility shift assays von MsrG mit der Promotorregion von *mtsH*

Durch Bose *et al.*, (2009) konnte gezeigt werden, dass der Regulator MsrG einen Einfluss auf die Expression von *mtsH* hat. Daher sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob für den Regulator MsrG ebenfalls eine Bindung mit dem *mtsH*-Promotorbereich beobachtet werden kann. Dazu wurden EMSA mit rekombinant produziertem und mittels Affinitätschromatographie gereinigtem MsrG in steigenden Konzentrationen mit DNA-Fragmenten, die den *mtsH*-Promotorbereich abdecken, inkubiert. (Abbildung 27).

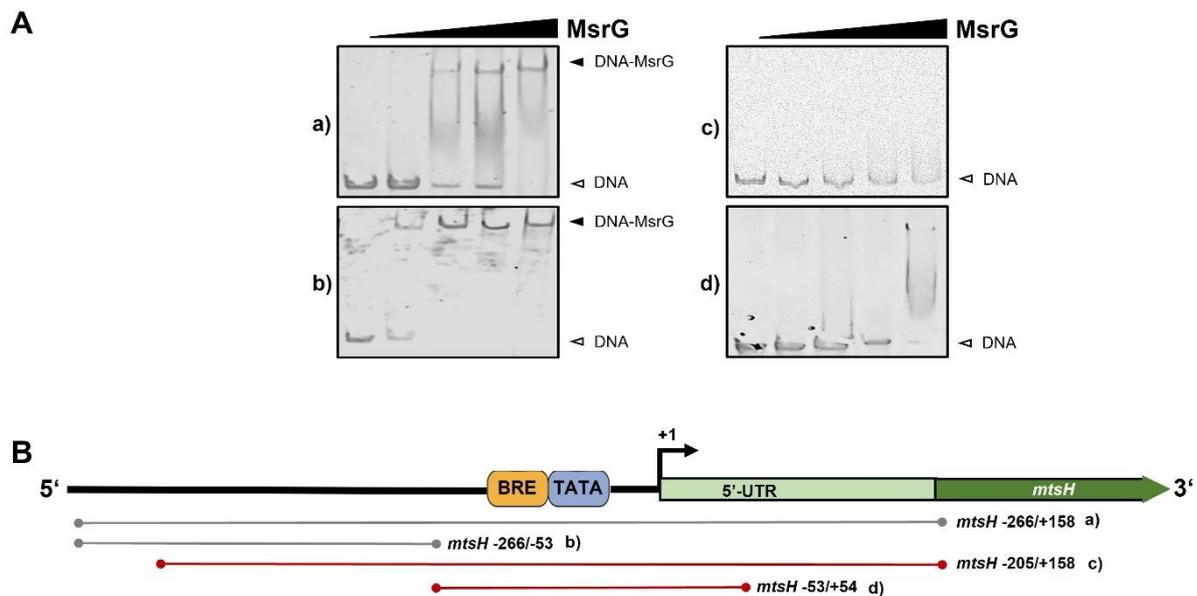


Abbildung 27. EMSA von MsrG und verschiedenen DNA-Fragmenten der *mtsH*-Promotorregion. (A) EMSA von MsrG mit den verschiedenen DNA-Fragmenten der *mtsH*-Promotorregion. Die DNA-Fragmente, die den Promotorbereich von *mtsH* umfassen, wurden mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Für die Bindestudien wurden jeweils 20 ng der amplifizierten DNA-Fragmente mit steigenden MsrG-Konzentrationen (0 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M) 30 min bei RT inkubiert und über ein TBE-Acrylamidgel (5% v/v) aufgetrennt. Die DNA wurde mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR[®] Green markiert und die Emission nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 600 nm detektiert. a) EMSA mit dem *mtsH* -266/+158 Fragment und steigenden MsrG-Konzentrationen. b) EMSA mit dem *mtsH* -266/-53 Fragment und steigenden MsrG-Konzentrationen. c) EMSA mit dem *mtsH* -205/+158 Fragment und steigenden MsrG-Konzentrationen. d) EMSA mit dem *mtsH* -53/+54 Fragment und steigenden MsrG-Konzentrationen. (B) *mtsH*-Promotorregion mit den jeweils verwendeten DNA-Fragmenten. BRE: BRE-Element (gelb); TATA: TATA-Box (blau); +1: Transkriptionsstart; 5'-UTR: 5' untranslatierte Region (hellgrün); *mtsH*-Gen (grün). DNA-Fragmente, für die eine Bindung mit dem Regulator nachgewiesen wurde, sind in grau und DNA-Fragmente, für die keine Bindung nachgewiesen wurde, sind in rot dargestellt. Die Gelbilder wurden aus der Masterarbeit von L. Blasius übernommen (Blasius, 2016).

Das *mtsH*-266/+158 Fragment stellt mit 424 bp das längste getestete *mtsH*-Promotorfragment dar, das den Promotorbereich von -266 bis +158 abdeckt und neben den Sequenzen für das BRE-Element und die TATA-Box die Sequenz der 5'-UTR enthält. Das EMSA für die Bindung von MsrG an das *mtsH*-266/+158 Fragment zeigt, dass mit zunehmender MsrG Konzentration der Anteil an freier DNA abnahm, während der Anteil gebundener DNA (DNA-MsrG) zunahm (Abbildung 27 Aa). Für das *mtsH*-266/-53 Fragment, welches ausgehend vom 3'-Ende um

211 bp verkürzt wurde und lediglich einen Bereich stromaufwärts des BRE Elements abdeckt, kann ebenfalls eine Verschiebung der DNA in den hochmolekularen Bereich bereits ab der niedrigsten MsrG Konzentration beobachtet werden (Abbildung 27 Ab). Für das Fragment *mtsH*-205/+158, das ausgehend vom 5'-Ende eine um 61 bp verkürzte Variante des *mtsH*266/+158 Fragment darstellt, konnte keine DNA-Bindung durch MsrG nachgewiesen werden (Abbildung 27 Ac). Das Gleiche gilt für das Fragment *mtsH*-53/+54, das den Bereich vom BRE-Element stromaufwärts bis in mitten der 5'-UTR abdeckt (Abbildung 27 Ad). Die Bindestelle von MsrG im *mtsH*-Promotor kann daher auf einen Bereich zwischen -266 und -205 stromaufwärts des Transkriptionsstarts eingegrenzt werden. Anhand durchgeführter Kontrollexperimente konnte ebenfalls eine unspezifische Interaktion von MsrG mit dem *mtsD*-Promotorbereich ausgeschlossen werden (Blasius, 2016).

3.4.4 Electrophoretic mobility shift assays von MsrC mit der Promotorregion von *mtsF*

Durch die vorangegangenen Analysen konnte bereits eine spezifische Bindung von MsrF mit *mtsD*-Promotorbereich und von MsrG mit der *mtsH*-Promotorregion nachgewiesen werden. Daher sollte im nächsten Schritt die Interaktion von MsrC mit dem Promotorbereich von *mtsF* überprüft werden. Dazu wurden EMSA mit rekombinant produziertem und mittels Affinitätschromatographie gereinigtem MsrC und DNA-Fragmenten, die den *mtsF*-Promotorbereich abdecken, durchgeführt (Abbildung 28).

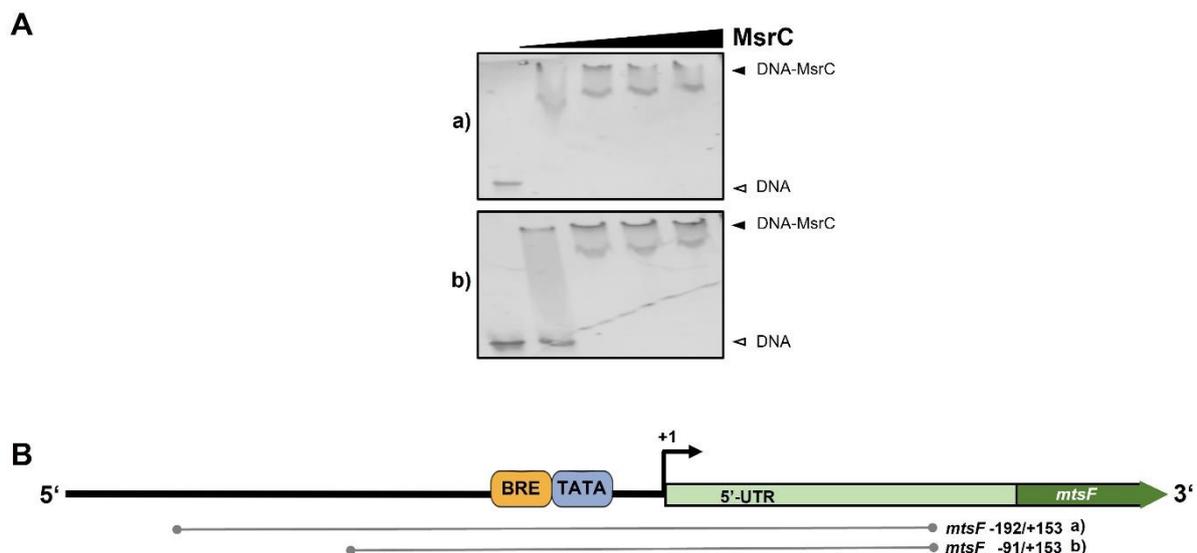


Abbildung 28. EMSA von MsrC und verschiedenen DNA-Fragmenten der *mtsF*-Promotorregion. (A) EMSA von MsrC mit den DNA-Fragmenten der *mtsF*-Promotorregion. Die DNA-Fragmente, die den Promotorbereich von *mtsF* umfassen, wurden mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Für die Bindestudien wurden jeweils 20 ng der amplifizierten DNA-Fragmente mit steigenden MsrC-Konzentrationen (0 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M) 30 min bei RT inkubiert und über ein TBE-Acrylamidgel (5% v/v) aufgetrennt. Die DNA wurde mithilfe des fluoreszierenden

Farbstoffes SYBR® Green markiert und die Emission nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 600 nm detektiert. **a)** EMSA mit dem *mtsF* -192/+153 Fragment und steigenden MsrC-Konzentrationen. **b)** EMSA mit dem *mtsF* -91/+153 Fragment und steigenden MsrC-Konzentrationen. **(B)** *mtsF*-Promotorregion mit den jeweils verwendeten DNA-Fragmenten. BRE: BRE-Element (gelb); TATA: TATA-Box (blau); +1: Transkriptionsstart; 5'-UTR: 5' untranslatierte Region (hellgrün); *mtsF*-Gen (grün). DNA-Fragmente, für die eine Bindung mit dem Regulator nachgewiesen wurde, sind in grau dargestellt.

Die getesteten DNA-Fragmente *mtsF*-192/+153 und *mtsF*-91/+153, die den Promotorbereich von *mtsF* abdecken und neben den Sequenzen für das BRE-Element und die TATA-Box Teile der Sequenz der 5'-UTR enthalten, unterschieden sich lediglich um ca. 100 bp am 5'-Ende. Beide DNA-Fragmente konnten durch MsrC gebunden werden, was sich an der Abnahme der freien DNA äußert (Abbildung 28 Aa und Ab). EMSA mit verkürzten DNA-Fragmenten wurden bereits durchgeführt, lieferten bislang jedoch keine aussagekräftigen Ergebnisse. Aufgrund der gezeigten EMSA kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Erkennungssequenz von MsrC ebenfalls stromaufwärts des Transkriptionsstartes lokalisiert liegt.

3.4.5 Electrophoretic mobility shift assays von MsrF mit der Promotorregion von *mtsH*

Transkriptionsregulatoren binden in der Regel mit ihrer DNA-Bindedomäne an spezifische Erkennungssequenzen im Ziel Promotorbereich. Durch die vorangegangenen EMSA konnte die Bindestelle für MsrF im *mtsD*-Promotor auf einen 143 bp großen Bereich bei Position -231 und -88 stromaufwärts des Transkriptionsstarts begrenzt werden. Die Bindestelle von MsrG im *mtsH*-Promotor kann auf einen Bereich zwischen -266 und -205 stromaufwärts des Transkriptionsstarts eingegrenzt werden. Für MsrC kann lediglich die Bindung an den *mtsF*-Promotor bestätigt werden. In weiterführenden Experimenten sollte überprüft werden, ob die Regulatoren die Fähigkeit besitzen, an einen der anderen Promotorbereiche zu binden. Dazu wurden EMSA mit gereinigtem MsrF und dem *mtsH*-266/+29 DNA-Fragment, für das bereits eine Interaktion mit MsrG gezeigt werden konnte, durchgeführt (Abbildung 29).

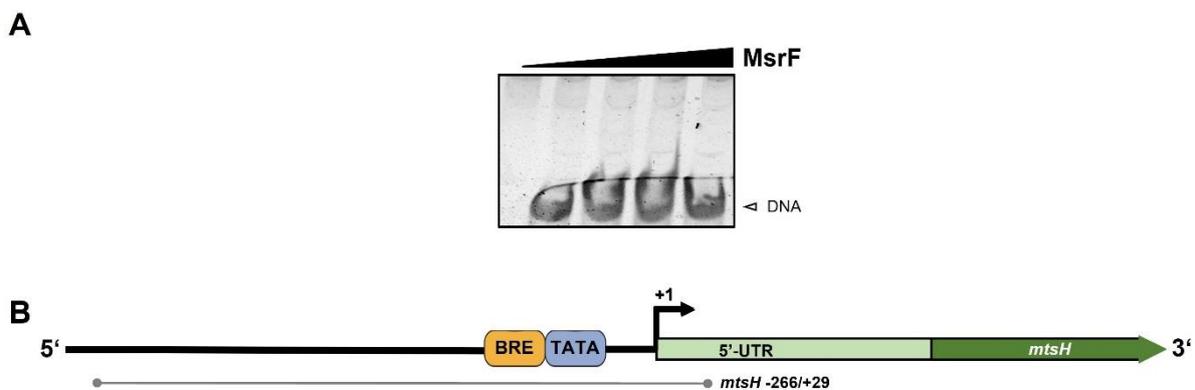


Abbildung 29. EMSA von MsrF und der *mtsH*-Promotorregion. (A) EMSA von MsrF mit dem *mtsH*-266/+29 DNA-Fragmenten. Das DNA-Fragmente, das den Promotorbereich von *mtsH* umfassen, wurden mittels PCR

Ergebnisse

amplifiziert und gereinigt. Für die Bindestudien wurden jeweils 20 ng des amplifizierten DNA-Fragmentes mit steigenden MsrF-Konzentrationen (0 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,8 μ M) 30 min bei RT inkubiert und über ein TBE-Acrylamidgel (5% v/v) aufgetrennt. Die DNA wurde mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR[®] Green markiert und die Emission nach Bestrahlung mit UV-Licht bei 600 nm detektiert. **(B)** *mtsH*-Promotorregion mit dem verwendeten DNA-Fragment. BRE: BRE-Element (gelb); TATA: TATA-Box (blau); +1: Transkriptionsstart; 5'-UTR: 5' untranslatierte Region (hellgrün); *mtsH*-Gen (grün).

Für das Fragmente *mtsH*-266/+29, das den *mtsH*-Promotobereich von -266 bis +29 abdeckt und neben den Sequenzen für das BRE-Element und die TATA-Box einen Teil der Sequenz der 5'-UTR enthält, konnte keine Bindung durch MsrF nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Msr-Regulatoren lediglich an die Promotorregionen der von ihnen *downstream* codierenden *mts*-Gene binden können und nicht in der Lage sind, mit den anderen Promotorbereichen zu interagieren. Jedoch sollten weitere EMSA durchgeführt werden, um diese Annahme zu unterstützen.

4 Diskussion

4.1 RdmS und MsmS zeigen keine redoxabhängige Autokinaseaktivität

Die Sensorkinasen MsmS und RdmS aus *M. acetivorans* besitzen auf Aminosäureebene eine hohe Sequenzähnlichkeit und zeigen auch auf struktureller Ebene einen vergleichbaren Aufbau. So besitzen beide Kinasen alternierende PAS- und GAF-Domänen, wobei in der jeweils letzten PAS-Domäne ein Häm-Kofaktor kovalent gebunden ist. In der C-terminal gelegenen Histidin-ähnlichen Kinase-Domäne fehlt sowohl MsmS als auch RdmS, der konservierte, für bakterielle Kinasen typische, Histinrest. Durch *in silico* Analysen konnten bislang keine weiteren homologen Kinasen in *M. acetivorans* identifiziert werden. Auch die Sensorkinase MA4377, die ebenfalls nahe der Msr-Regulatoren kodiert ist, unterscheidet sich signifikant von MsmS und RdmS und konnte jüngst als membrangebundene Hybridkinase bakteriellen Ursprungs identifiziert werden (Sexauer, 2021). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden sowohl MsmS als auch RdmS als Redoxsensoren beschrieben, welche eine redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität an Serin- oder Tyrosinresten aufweisen (Molitor, 2013; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die genaue(n) Phosphorylierungsstelle(n) innerhalb der Kinasen identifiziert werden. Durch massenspektroskopische- und Westernblot-Analysen mit der Sensorkinase RdmS konnten jedoch weder Phosphotyrosin(e) noch andere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Anschließend durchgeführte Kontrollexperimente weisen darauf hin, dass RdmS und womöglich auch MsmS unspezifisch mit ATP interagieren (Abbildung 19), sodass davon auszugehen ist, dass sie nicht die zuvor beschriebene redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität aufweisen. Vielmehr zeigen alle in dieser Arbeit getesteten Proteine wie beispielsweise die Proteinvariante der Sensorhistidinkinase BphP (BphPH513A) aus *P. aeruginosa*, die keine Autophosphorylierung mehr aufweisen dürfte (Tasler *et al.*, 2005) und auch Proteine, die keine bekannte physiologische Interaktion mit ATP eingehen, unter den verwendeten experimentellen oxidierenden Bedingungen in der Abwesenheit von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer ein Signal im Autoradiogramm (Abbildung 20). Dies lässt darauf schließen, dass unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen die bei Fiege und Frankenberg-Dinkel (2019) und Molitor *et al.*, (2013) Verwendung fanden, alle Proteine unspezifisch mit ATP interagieren und dass reduzierende Reagenzien wie Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol für das Ergebnis des Kinaseassays von großer Bedeutung sind.

Betrachtet man die Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Proteine genauer ist auffällig, dass die Carboanhydrase welche keine unspezifische Interaktion mit ATP zeigt, das einzige verwendete Protein ist, welches keine Cysteinreste aufweist (Abbildung 37 Anhang). Unter der Annahme, dass β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken im Protein reduzieren kann und dadurch die Proteinstruktur verändert wird, liegt die Vermutung nahe, dass Cysteinreste und die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine in irgendeiner Form für die beobachtete unspezifische Interaktion mit ATP verantwortlich sein könnten.

RdmS besitzt insgesamt 12 Cysteinreste (Abbildung 35 Anhang), wobei der Häm-Kofaktor kovalent über den Cysteinrest an Position 620 gebunden ist. Durchgeführte Ellmanassays von RdmS bestätigen das Vorhandensein von Disulfidbrücken unter oxidierenden Bedingungen innerhalb des Proteins (Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019). Daher könnten die verbleibenden 11 Cysteinreste bei der Bildung von Disulfidbrücken involviert sein. Da jeder Cysteinrest einen Partner für die Bildung einer Disulfidbrücke benötigt, wurden fünf Cysteinreste, die sowohl in der Kinase RdmS als auch in der Kinase MsmS konserviert vorliegen, ausgetauscht. Der Aminosäureaustausch gegen die Aminosäure Serin erfolgte an den Positionen 22, 300, 376, 514 und 933 (Abbildung 35 Anhang). Phosphorylierungsassays unter oxidierenden Bedingungen, terminiert in SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol der Quintupel-Variante von RdmS im Vergleich zum WT-Protein zeigten, kein Signal im Autoradiogramm (Orth, 2020). Diese Beobachtung deutet ebenfalls darauf hin, dass die unspezifische Interaktion des ATP mit den Proteinen auf die Bildung von Disulfidbrücken und die damit einhergehenden Strukturveränderung zurückzuführen ist. Zusätzlich wird diese Hypothese durch zwei weitere Experimente unterstützt. Zum einen durch Kinaseassays der verkürzten RdmS Protein-Varianten (Abbildung 15) in denen beide Varianten kein Signal im Autoradiogramm zeigten, wobei GAF2-RdmS zwei und HATPase-RdmS lediglich einen Cysteinrest besitzt (vgl. Abbildung 35 Anhang). Zum anderen durch Phosphorylierungsassays von RdmS, unter oxidierenden Bedingungen terminiert in SDS-Probenpuffer, dem Harnstoff als Denaturierungsmittel zugesetzt wurde (Abbildung 40 Anhang). Dabei zeigte sich, dass unter Verwendung dieses Probenpuffers ein Signal im Autoradiogramm detektiert werden kann. Harnstoff ist eine chaotrope Substanz, die im Gegensatz zu DTT und β -Mercaptoethanol lediglich nicht kovalente Bindungen im Protein unterbricht und folglich bleiben gebildete Disulfidbrücken im Protein erhalten.

Dass ATP eine unspezifische, nicht kovalente Interaktion mit nativ gefalteten Proteinen eingehen kann, konnte jüngst auch durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Vor allem bei relativ niedrigen Proteinkonzentrationen von 50 μ M, physiologischen Salz- und Magnesiumkonzentrationen und physiologischen ATP zu Protein Verhältnissen konnte eine unspezifische Interaktion des ATP sowohl mit nativ gefalteten, als auch mit intrinsisch

ungeordneten Proteinen nachgewiesen werden. Dabei spielen sowohl der amphiphile Charakter von ATP sowie die Fähigkeit der flexiblen Konformationsänderung eine Schlüsselrolle, die es dem ATP erlaubt generell mit der Proteinoberfläche zu interagieren (Nishizawa *et al.*, 2021). Der genaue Reaktionsmechanismus bleibt hierbei jedoch weitgehend unklar. Zudem wiesen die von Nishizawa *et al.*, (2021) verwendeten Proteine keine Cysteinreste auf, die bei der Formation von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Es konnte aber eine Beteiligung von Lysin- und Argininresten an der unspezifischen Interaktion mit ATP nachgewiesen werden (Nishizawa *et al.*, 2021), welche auch in allen in dieser Arbeit getesteten Proteinen vorkommen. Allerdings weisen Proteine, die ATP spezifisch binden, ebenfalls eine Reihe konservierter Lysin- und Argininreste in der ATP-Bindedomäne auf und angesichts der negativen Ladung von $Mg-ATP^{2-}$ ist es nicht erstaunlich, dass diese positiv geladenen Aminosäuren bei der Interaktion eine Rolle spielen (Saraste *et al.*, 1990).

Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann festgehalten werden, dass ATP generell in der Lage ist, mit Proteinen zu interagieren. Verlässliche Aussagen über Autophosphorylierungsaktivitäten von Kinasen können nur erbracht werden, wenn die Terminierung der Kinaseassays in Gegenwart von reduzierenden Reagenzien durchgeführt wird, die kovalente Bindungen innerhalb des getesteten Proteins auflösen. Die zuvor beschriebene redoxabhängige Autophosphorylierungsaktivität von RdmS und MsmS konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, die von Molitor *et al.*, (2013) und Fiege und Frankenberg-Dinkel (2019) beschriebenen Phosphorylierungen sind vielmehr als unspezifische ATP-Protein Interaktionen einzustufen. Es bleibt jedoch die Frage offen, wie stabil diese unspezifische ATP-Interaktion mit RdmS und MsmS ist, da selbst nach Hydrolyse von RdmS in einer Dünnschichtchromatographie ein, mit dem verwendeten Tyrosinstandard korrespondierendes, radioaktives Signal nachgewiesen werden konnte (Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019).

4.2 RdmS und MsmS sind atypische Sensorkinasen

Auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen ist davon auszugehen, dass weder RdmS noch MsmS redoxabhängige Sensorkinasen darstellen. Eine umfassende Sequenz- und Strukturanalyse der beiden Kinasen sollte daher im Rahmen dieser Arbeit Aufschluss über die Funktionsweise der Kinasen und deren zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen ermöglichen. Dazu wurden die HATPase-Domänen von RdmS und MsmS näher betrachtet. Aminosäuresequenz Alignments der HATPase-Domäne von MsmS und RdmS, verglichen mit der HATPase-Domäne von typischen SHK aus *Bacteria* und *Methanomicrobia*, zeigten, dass die HATPase-Domänen beider Kinasen alle gängigen konservierten Sequenzmotive (N-, G1-,

F-, G2-Box) für eine katalytische ATP-bindende-Domäne, die unter anderem für Bindung und Hydrolyse von ATP von Bedeutung sind, besitzen (Abbildung 36 Anhang). Eine hohe Ähnlichkeit zu typischen Proteinkinasen, die ein katalytisches Zentrum aus 11 konservierten Sequenzmotiven besitzen (Hanks & Hunter, 1995; Taylor & Kornev, 2011) konnte jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte, wie bereits in vorangegangenen Studien, das Fehlen der typischen Histidin-tragenden H-Box in RdmS und MsmS bestätigt werden (Molitor, 2013; Fiege, 2019; Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019).

Weiterführende BlastP-Analysen der HATPase-Domäne von MsmS und RdmS gegen *Bacteria* zeigten, dass innerhalb der Domäne der *Bacteria* ebenfalls Kinasen identifiziert werden können, deren H-Box sich nicht an der für sie typischen Position innerhalb der HATPase-Domäne befindet. Der Histidinrest liegt in diesen Kinasen weiter N-Terminal in der sogenannten P1-Domäne lokalisiert (Bilwes *et al.*, 1999). Allerdings kann aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Phosphorylierungsassays ausgeschlossen werden, dass dies für MsmS und RdmS der Fall ist. Mittels Proteinstrukturvorhersagetool Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) konnte zudem die bakterielle Kinase DivL aus *Caulobacter crescentus*, die auf Sekundärstrukturebene eine deutliche Ähnlichkeit (22 % Identität) zu MsmS und RdmS aufweist, ausgemacht werden. DivL wurde im Jahre 1999 als Pseudohistidinkinase identifiziert, die anstelle des konservierten Histidinrestes eine Tyrosinrest aufweist (Wu *et al.*, 1999). Die erste Charakterisierung deutete darauf hin, dass das denaturierte und rückgefaltete DivL eine Autophosphorylierungsaktivität am Tyrosinrest aufweist. Nachfolgende biochemische Untersuchungen konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Durch ATP-Bindestudien mit dem ATP-Derivat TNP-ATP konnte zudem nur eine sehr schwache Bindung von ATP an die Kinase nachgewiesen werden, weshalb postuliert wurde, dass DivL nicht als konventionelle Kinase fungiert.

Weitere BlastP-Analysen der HATPase-Domäne gegen *Archaea* zeigten, dass innerhalb der Domäne der *Archaea* neben RdmS und MsmS eine Vielzahl an Kinasen vorkommen, die ebenfalls keine H-Box aufweisen. Diese werden jedoch oft als Histidinkinasen klassifiziert. Werden alle als Histidinkinasen klassifizierte Kinasen innerhalb von 218 sequenzierten archaeellen Genomen (Stand 2017) betrachtet, ist auffällig, dass im Phylum der *Crenarchaeota* (44 untersuchte Genome) keine einzige Histidinkinase gefunden werden kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass ZKS ihren Ursprung in *Bacteria* haben und über horizontalen Gentransfer auf die *Archaea* übertragen wurden (Koretke *et al.*, 2000; Ulrich *et al.*, 2005; Galperin *et al.*, 2018). Das Phylum der *Euryarchaeota* (149 untersuchte Genome), zu dem auch *M. acetivorans* gehört, weist mit 1963 hingegen mit Abstand die meisten Histidinkinasen auf (vgl. Tabelle 17 Anhang; Galperin *et al.*, 2018). Dabei korreliert die Anzahl an Histidinkinasen jedoch nur geringfügig mit der Genomgröße. *M. acetivorans* und

Methanocella paludicola die innerhalb des Phylums der *Euryarchaeota* der Klasse der *Methanomicrobia* zugeordnet werden, besitzen mit jeweils 51 die meisten Histidinkinasen innerhalb aller sequenzierter archaeellen Genome (Tabelle 17). Dabei besitzt *M. paludicola* ein zirkuläres Genom mit einer Größe von ca. 2,96 Megabasenparen, wohingegen *M. acetivorans* mit ca. 5.75 Mbp das größte bisher bekannte sequenzierte Genom besitzt (Galagan *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2011).

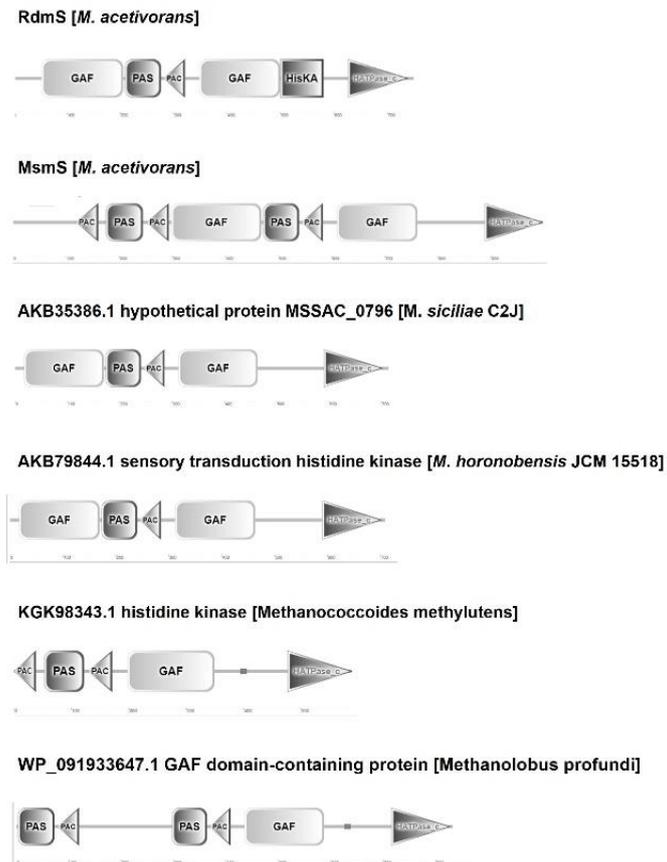


Abbildung 30. Vorhergesagte Domänenstruktur der Sensorkinasen ohne H-box innerhalb der *Methanomicrobia*. Die Domänenvorhersage erfolgte mittels SMART (www.smart.embl-heidelberg.de). Gezeigt sind die Domänenvorhersagen für RdmS und MsmS aus *M. acetivorans*, MSSAC0796 aus *M. siciliae*, AKB78343.1 aus *M. horonobensis*, KGK98343.1 aus *Methanococcoides methylutens* und WP091933647.1 aus *Methanobus profundus*. GAF: GAF-Domäne; PAS: PAS-Domäne; PAC: PAC-Domäne; HisKA: Histidinkinase-Domäne; HATPase_c: HATPase-Domäne.

Aminosäure-Sequenzalignments der 51 identifizierten Histidinkinasen aus *M. acetivorans* zeigten neben RdmS und MsmS eine weitere Kinase (MA3066) ohne H-Box. Diese Beobachtung konnte auch für andere Vertreter innerhalb der *Methanomicrobia* gemacht werden. So konnten beispielsweise für *Methanosarcina siciliae* (C2J), welcher ebenfalls eine Reihe verschiedener Substrate für die Methanogenese nutzen kann, insgesamt 43 Histidinkinasen identifiziert werden, von denen fünf ebenfalls keine H-Box aufweisen (Tabelle 17 Anhang). Dazu gehören MSSAC1776, MSSAC2044, MSSAC2975 (CheA), MSSAC4337 und MSSAC0717. Strukturanalysen einiger Vertreter dieser atypischen Kinasen mittels

Expsy (ScanProsite), Smart und NCBI zeigen, dass sie einen sehr ähnlichen strukturellen Domänenaufbau aufweisen. Wie RdmS und MsmS besitzen auch sie alternierende PAS- und GAF-Domänen sowie eine C-terminale HATPase-Domäne (Abbildung 30).

Weiterführende Analysen zeigen, dass Kinasen, in denen das konservierte Histidin fehlt, in der Domäne der *Archaea* lediglich innerhalb der Klasse der *Methanomicrobia* vorgefunden werden können und dass diese Besonderheit innerhalb dieser Klasse weitverbreitet zu sein scheint. Zudem bleibt zu beachten, dass die Msr-Regulatoren ebenfalls ausschließlich im Phylum der *Euryarchaeota* vorgefunden werden können. In Anbetracht dessen, dass ein Großteil (5 von derzeit 8 beschriebenen Ordnungen) der methanogenen *Archaea* in die Klasse der *Methanomicrobia* eingeordnet werden und die in dieser Arbeit untersuchten Kinasen an der Regulation von Stoffwechsellenzymen der Methanogenese beteiligt sind, wäre es interessant zu überprüfen, ob andere atypische Kinasen ebenfalls an der Regulation von Stoffwechsellenzymen beteiligt sind und somit konservierte Signaltransduktionssysteme innerhalb der *Methanomicrobia* vorliegen. Um diese Hypothese zu prüfen wurde beispielsweise die Kinase MSSIT0767 aus *M. siciliae* (T4/M), welche keine H-Box besitzt und auf Aminosäureebene mit 93,5 % Identität eine hohe Homologie zu RdmS aufweist, näher betrachtet. Die genomische Lokalisation von MSSIT0767 ähnelt den in dieser Arbeit untersuchten Signaltransduktionssystemen, da es mit Genen assoziiert vorliegt, die für einen Regulator sowie eine Methyltransferase kodieren. *Downstream* von MSSIT0767 liegen MSSIT0766 und MSSIT0763 lokalisiert (Abbildung 31). MSSIT0766 codiert für ein hypothetisches Protein, bestehend aus einer HTH- und DUF1724-Domäne, analog zu MsrF, und MSSIT0763 codiert für ein Protein, welches einer Dimethylsulfid/corrinoid-Methyltransferase, analog zu MtsD, zugeordnet werden kann. Diese Beobachtung untermauert die Hypothese, dass innerhalb der *Methanomicrobia* konservierte Signaltransduktionssysteme an der Regulation von Stoffwechsellenzymen beteiligt sind und sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

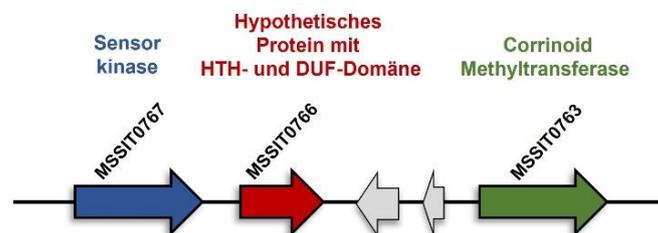


Abbildung 31. Genetische Anordnung des putativen Signaltransduktionssystems in *M. siciliae* (T4/M). Schematisch dargestellt sind die Positionen der Gene, die für die putative methylsulfidspezifische Methyltransferase (MSSIT0763, grün), relativ zum Gen des putativen Transkriptionsregulator mit HTH- und DUF1724-Domäne (MSSIT0766, rot) und relativ zum Gen der Sensorkinase (MSSIT0767, blau) (nach Köhler, 2021).

4.3 RdmS bindet und hydrolysiert ATP

Die Sensorkinasen RdmS und MsmS besitzen keine Autophosphorylierungsaktivität, weisen jedoch alle gängigen konservierten Sequenzmotive für ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse auf. Unter Zuhilfenahme des ATP-Derivats TNP-ATP konnte die Bindung von ATP an die Kinase RdmS nachgewiesen werden sowie die Bindungsaffinität bestimmt werden. Dabei konnte für RdmS ein K_D -Wert von $3,8 \mu\text{M}$ ermittelt werden (Abbildung 41 Anhang). Dieser liegt verglichen mit K_D -Werten prototypischer HK im Bereich zwischen $0,5 - 3 \mu\text{M}$ (Stewart *et al.*, 1998; Plesniak *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2005; Shrivastava *et al.*, 2007) ebenfalls im niedrig mikromolekularen Bereich. Für die Hybridkinase MA4377 aus *M. acetivorans*, die an einem konservierten Histidinrest autophosphoryliert wird (Sexauer, 2021) konnte ein ähnlicher K_D -Wert ermittelt werden. Mittels ADP-Glo™-Kinaseassays konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass das durch RdmS gebundene ATP hydrolysiert wird (Abbildung 22). Dadurch erfüllt RdmS alle Voraussetzungen, um als Kinase die Phosphorylierung von Proteinen zu katalysieren. Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Kinaseassays kann ausgeschlossen werden, dass RdmS Autophosphorylierungsaktivität besitzt und anhand von Phosphorylierungsassays mit dem Regulator MsrF der direkt *downstream* von *rdmS* kodiert und für den eine Interaktion mit der Kinase nachgewiesen werden konnte (vgl. Kapitel 4.4), kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass der Regulator als Phosphoakzeptor dient (Abbildung 23).

Von eukaryotischen Proteinkinase ist bekannt, dass diese in Signalkaskaden organisiert sind und entweder durch andere Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert werden können oder dass sie selbst die Phosphorylierung von Adapterproteinen, Substraten oder anderen *downstream* lokalisierten Kinasen katalysieren. Die Proteinkinase B aus höheren Eukaryoten beispielsweise spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse und wird zum einen durch die Phosphoinositide-dependent-Kinase-1 und einer weiteren Kinase an bestimmten Aminosäureresten phosphoryliert und dadurch aktiviert (Alessi & Cohen, 1998). Zum anderen ist die Proteinkinase B selbst in der Lage eine Reihe andere Substrate wie Proteine, Transkriptionsfaktoren oder Metabolite zu phosphorylieren (Manning & Cantley, 2007). Aufgrund der durchgeführten Phosphorylierungsassays mit RdmS und der Hybridkinase MA4377, für die ein Einfluss auf die Expression von *mtsF* gezeigt werden konnte (Lopez Munzo, 2017), kann ausgeschlossen werden, dass diese Kinasen sich gegenseitig phosphorylieren (Abbildung 23).

Zudem konnten mittels Phosphorylierungsassays von RdmS mit Lysatproben von *M. acetivorans*, welcher mit Methanol im Medium kultiviert wurde, keine weiteren Phosphoakzeptoren identifiziert werden (Abbildung 23). Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit die Phosphorylierung möglicher Phosphoakzeptoren nur bedingt untersucht und

generelle physiologische Parameter außer Acht gelassen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass RdmS ein bislang unbekanntes Protein (Diskutiert in Kapitel 4.6) phosphoryliert das im untersuchten Signaltransduktionsnetzwerk von Bedeutung ist. Daher sollten in weiterführenden Analysen *Pulldown*-Assays mit RdmS und ggf. mit MsmS aus *M. acetivorans* durchgeführt werden, um mögliche Phosphoakzeptoren zu identifizieren. Handelt es sich jedoch um eine transiente Interaktion, könnte alternativ dazu ein *peptide library screening* (Hutti *et al.*, 2004) durchgeführt werden. Diese Methode erlaubt die Identifizierung von Aminosäureresten, die die potenzielle Phosphorylierungsstelle umgeben, um anschließend mit Hilfe des putativen Phosphorylierungsmotivs Proteindatenbanken auf mögliche Phosphoakzeptoren zu screenen.

Darüber hinaus wäre es denkbar, dass neben Proteinen auch Metabolite durch RdmS phosphoryliert werden, wie es beispielsweise für die Hexokinase oder die Phosphoglyceratkinase1 gezeigt wurde (Scrutton & Utter, 1968; Evans *et al.*, 1981). Diese phosphorylierten Metabolite könnten dann ebenfalls eine zentrale Rolle im Signaltransduktionsprozess spielen. Es sollte jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass die Phosphorylierung des Zielproteins spezielle Bedingungen benötigen könnte, wie beispielsweise die Anwesenheit von spezifischen Metaboliten oder anderer Faktoren. Die Proteinkinase C wird beispielsweise erst in Anwesenheit von Calciumionen und weiterer Faktoren aktiviert und phosphoryliert daraufhin ihre Zielproteine (Takai *et al.*, 1979).

4.4 RdmS und MsmS interagieren mit den Msr-Regulatoren

In klassischen bakteriellen ZKS kommt es nach der Signalperzeption durch die Sensorkinase zu einer, durch transiente Interaktionen mit ihrem korrespondierenden Regulator herbeigeführte, Phosphatgruppenübertragung zwischen den beiden Proteinen. Das in dieser Arbeit untersuchte System aus *M. acetivorans* weicht jedoch von diesen typischen bakteriellen Systemen ab. So zeigt RdmS entgegen der bisherigen Annahme keine Autophosphorylierungsaktivität, ist jedoch in der Lage ATP zu binden und zu hydrolysieren. Ein Phosphorylgruppentransfer auf den Regulator MsrF konnte unter den getesteten Bedingungen bisher ausgeschlossen werden. Daher muss die Signalübertragung auf andere Weise erfolgen. Neben der durch Protein-Interaktion ermöglichten Phosphatgruppenübertragung von der Kinase auf den Regulator, analog zur Situation in *Bacteria*, sind auch andere Mechanismen denkbar. So könnte die Kommunikation zwischen Kinase und Regulator durch die Ausbildung eines stabilen Kinase-Regulator-Komplexes oder über die Interaktion mit einem bisher unbekanntem Faktor (Substrat oder Protein) herbeigeführt werden. Sämtliche mögliche Signaltransduktionsmechanismen und die Annahme, dass die

Kinasen MsmS und RdmS mit den Msr-Regulatoren ein Signaltransduktionssystem bilden, setzen jedoch eine grundlegende Protein-Protein-Interaktion voraus, die in dieser Arbeit mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie und *in vivo Crosslinking* untersucht wurde.

Durch die *in vivo* Crosslinking-Experimente konnte die Interaktion zwischen der Kinase MsmS und dem direkt *downstream* kodierten Regulator MsrG nachgewiesen und anhand massenspektroskopischer Analysen bestätigt werden (Abbildung 14). Mittels SPR-Analysen konnte die Interaktion von RdmS mit den beiden Regulatoren MsrF und MsrC charakterisiert werden (Abbildung 11). Die anschließend mithilfe des Biacore Evaluierungsprogramms ermittelten Bindungsaffinitäten wurden unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie (Langmuir-Bindung) für alle SPR-Messungen berechnet (Tabelle 14). Vor allem für die Messungen bei höheren Analytkonzentrationen konnte jedoch kein Gleichgewichtszustand erreicht werden, was vermutlich auf eine verminderte Integrität oder Dimerisierungseffekte des Liganden auf der Chipoberfläche zurückzuführen ist. Somit kann für die Messungen bei höheren Analytkonzentrationen nicht von einer 1:1 Stöchiometrie ausgegangen werden. Unter Berücksichtigung dessen kann es bei der Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante zu Abweichungen vom tatsächlichen K_D -Wert kommen. Diese Abweichungen sind jedoch höchstwahrscheinlich so geringfügig, dass davon ausgegangen werden kann, dass der tatsächliche K_D -Wert ebenfalls im niedrig mikromolaren Bereich liegt, was mit ermittelten K_D -Werten für die Interaktion von prototypischen Histidinkinasen mit ihren korrespondierenden Regulatoren übereinstimmt (Cai & Inouye, 2002; Willett *et al.*, 2013). So konnte beispielsweise für die Kinase EnvZ und dem korrespondierenden Regulator OmpR aus *E. coli* ein K_D -Wert von 1,96 μM bestimmt werden und für das ZKS CrdS-CrdA aus *Myxococcus xanthus* ein K_D -Wert von 1,4 μM (Yoshida *et al.*, 2002; Willett *et al.*, 2013)

Anhand parallel durchgeführter Bacterial-Two-Hybrid Analysen konnte ergänzend zu den in dieser Arbeit bestätigten Interaktionen eine Interaktion der Kinase RdmS mit dem Regulator MsrG und der Kinase MsmS mit den Regulatoren MsrF und MsrC nachgewiesen werden (Fiege & Frankenberg-Dinkel, 2019; Fiege, 2019). MsmS und RdmS sind demnach in der Lage, mit allen drei Msr-Regulatoren zu interagieren, weshalb angenommen werden kann, dass das untersuchte Signaltransduktionsnetzwerk ein Multi-Komponenten-System darstellt und die Proteine miteinander kreuzregulieren. *Crosstalk* zwischen Proteinen konnte bereits für eine Reihe von ZKS gezeigt werden, wie beispielsweise für die ZKS EnvZ-OmpR und ArcBA aus *E. coli*, HssRS und HitRS aus *Bacillus anthracis* oder dass archaelle ZKS Fill/FillR1/FillR2, das Gene der Methanogenese in *Methanosaeta harundinacea* reguliert (Matsubara *et al.*, 2000; Mike *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

Durch Fiege, 2019 konnte zudem in weiterführenden Protein-Interaktionsstudien mit dem Regulator MsrG und verkürzten MsmS Protein-Varianten ermittelt werden, dass eine Interaktion lediglich zwischen MsrG und dem Vollängen Protein möglich ist. Aus typischen bakteriellen ZKS ist bekannt, dass die regulatorische Domäne des Antwortregulators, die das Phosphorylaspartat umgibt, mit der Histidin-Phosphotransfer-(DHP)-Domäne der Kinase interagiert (Hoch & Varughese, 2001; Zschiedrich *et al.*, 2016). Das in dieser Arbeit untersuchte System unterscheidet sich jedoch wesentlich vom bakteriellen Pendant, da weder Autophosphorylierungsaktivität für die Kinasen, noch eine Phosphatgruppenübertragung von RdmS auf den Regulator MsrF nachgewiesen wurde und die Msr-Regulatoren zudem keinen konservierten Asparatrest aufweisen. Die Interaktion zwischen Kinase und Regulator muss daher auf andere Weise stattfinden und könnte beispielsweise über die DUF1724-Domäne und eine der PAS-Domänen erfolgen. PAS-Domänen können eine wichtige Rolle für Protein-Protein-Interaktionen spielen, wie bereits für den bHLH/PAS Dioxinrezeptor-Arnt-Transkriptionsfaktor Komplex gezeigt wurde (Lindebro *et al.*, 1995).

Da die Interaktion von allen drei Msr-Regulatoren mit den Kinasen MsmS und RdmS nachgewiesen wurde, diese aber nicht simultan stattfinden kann, bleibt die Frage offen in wieweit die Regulatoren um die Interaktion mit der Kinase konkurrieren. Für das ZKS KdpD/KdpE, dass die K⁺-Homöostase in *E. coli* reguliert, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Phosphotransferaseprotein PtsN in nicht phosphorylierter Form mit dem Regulator KdpE um die Bindung mit der Kinase konkurriert (Mörk-Mörkenstein *et al.*, 2017).

Über zusätzlich durchgeführte SPR-Analysen mit der Kinase RdmS und dem Regulator MsrF in Anwesenheit von ATP konnte zudem ausgeschlossen werden, dass durch die Kinase gebundenes ATP einen Einfluss auf die Interaktion mit den Regulatoren hat (Daten nicht gezeigt). Da sowohl MsmS als auch RdmS einen Häm-Kofaktor kovalent in der zweiten GAF-Domäne gebunden haben und dieser möglicherweise in der Lage ist neben CO oder NO auch die potenziellen Substrate der Methyltransferasen MtsH, MtsD und MtsF zu binden, sollte in weiterführenden Experimenten getestet werden, ob sich die Affinität zwischen Kinase und Regulator verändert, wenn entsprechende Substrate durch den Häm-Kofaktor gebunden werden. Dazu könnten SPR-Analysen in Anwesenheit von DMS (Substrat für MtsD/H/F), Methylmercapthopropionat (Substrat für MtsH) und Methanthiol (Substrat für MtsF), durchgeführt werden (Oelgeschläger & Rother, 2009; Fu & Metcalf, 2015).

4.5 Die Transkriptionsregulation der *mts*-Gene

Die homologen Corrinoid/Methyltransferasefusionsproteine MtsH, MtsD und MtsF spielen bei der Verstoffwechslung von Methylsulfiden während der Methanogenese eine wichtige Rolle und werden auf transkriptioneller Ebene durch die homologen Transkriptionsfaktoren MsrG, MsrF und MsrC reguliert (Bose *et al.*, 2009).

MsrG, MsrF und MsrC gehören zur archaellen Msr-Familie regulatorischer Proteine. Diese besitzen ein *helix-turn-helix*-(HTH)-Motiv, das charakteristisch für DNA-bindende Proteine ist und eine Domäne bisher unbekannter Funktion (DUF1724). Die Domäne DUF1724 ist einzigartig für Archaea und lässt sich nur am C-terminus der Msr-Proteine finden (Bose & Metcalf, 2008; Bose *et al.*, 2009).

Die für die Methyltransferasen MtsH, MtsD und MtsF kodierenden Gene weisen eine für Archaea typische Promotorstruktur auf. Das 5'-Ende der mRNA konnten mittels 5'-RACE durch Bose *et al.*, 2009 bestimmt werden und die Transkriptionsstartpunkte liegen, wie für *Archaea* typisch, an Purinbasen. Im Falle von *mtsH* und *mtsD* konnte ein Guanin und im Falle von *mtsF* ein Adenin identifiziert werden (Abbildung 38 Anhang). Zudem konnte in allen Promotorbereichen die TATA-Box ca. 25 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (TTS) ausgemacht werden. Auffällig ist, dass sich oberhalb der TATA-Box anstelle des konventionellen purinreichen BRE-Elements, eine pyrimidinreiche Sequenz (66%) befindet. Diese kann jedoch dem BRE-Element zugeordnet werden (Bose *et al.*, 2009). Zusätzlich kann im Promotor aller drei *mts*-Gene eine relativ lange 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) ausgemacht werden. Diese besitzt eine Größe von 89 bp für *mtsD*, 145 bp für *mtsH* und 272 bp für *mtsF* ausgehend vom Startcodon (ATG) (Bose *et al.*, 2009) (Abbildung 38 Anhang). Lange 5'-UTRs konnten bereits in einer Reihe von in die Methanogenese involvierter Gene ausgemacht werden. Darunter fallen unter anderem die Transkripte der methanolpepezifischen Methyltransferasen MtaB1, MtaB2 und MtaC3 aus *M. acetivorans* und die Transkripte von *mtaCB*, *mtmCB* und *mtmCBPorf1* aus *M. barkeri* (Sauer *et al.*, 1997; Burke *et al.*, 1998). Über die genaue Funktion der genannten 5'-UTRs ist bislang nichts bekannt, sie könnten jedoch, wie bereits für eine Reihe von Pro- und Eukaryoten gezeigt, durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen eine Rolle bei der Regulation der Translation spielen.

Für MsrG-, MsrF- und MsrC-Deletionsmutanten konnte eine verminderte Transkription der jeweiligen *downstream* kodierten *mts*-Gene beobachtet werden (Abbildung 3). Daher wird vermutet, dass MsrG als Transkriptionsaktivator von *mtsH*, MsrF als Transkriptionsaktivator von *mtsD* und MsrC als Transkriptionsaktivator von *mtsF* fungiert (Bose *et al.*, 2009). Da der genaue Mechanismus der Transkriptionsregulation jedoch unbekannt ist, wurde mittels *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) die physikalische Interaktion von gereinigten Msr-

Regulatoren mit den Promotorbereichen der *mts*-Gene untersucht. Diese Untersuchungen wurden unabhängig vom Vorhandensein der Sensorinasen RdmS und MsmS durchgeführt für die bereits die Interaktion mit den Msr-Regulatoren bestätigt werden konnte (vgl. Kapitel 4.4). Durch die EMSA konnte die Bindestelle für MsrF im *mtsD*-Promotor auf einen 143 bp großen Bereich bei Position -231 und -88 stromaufwärts des Transkriptionsstarts begrenzt werden (Abbildung 25). Die Bindestelle von MsrG im *mtsH*-Promotor konnte auf einen Bereich zwischen -266 und -205 stromaufwärts des Transkriptionsstarts eingegrenzt werden (Abbildung 27). Für MsrC konnte lediglich die Bindung an den *mtsF*-Promotor bestätigt werden, da für beide getestete DNA-Fragmente eine Verschiebung in den hochmolekularen Bereich beobachtet werden konnte (Abbildung 28). Die potentielle Bindestelle von MsrC muss folglich im Bereich zwischen -192 und +153 in *mtsF*-Promotor liegen.

Die Position der Bindestelle kann Hinweise über eine reprimierende bzw. aktivierende Funktion der Transkriptionsregulatoren auf das Zielgen geben. Die Wirkungsweise von Transkriptionsrepressoren besteht im Wesentlichen darin, die Rekrutierung der RNAP zu blockieren oder das Binden der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (TBP, TFB) zu verhindern. Dabei binden sie vorwiegend an überlappende Sequenzen mit der TATA-Box oder dem BRE-Element. Aktivatoren hingegen binden bevorzugt stromaufwärts des BRE-Elements an die DNA und stimulieren die Rekrutierung der RNAP und der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (Geiduschek & Ouhammouch, 2005). Die mithilfe der EMSA identifizierten Bereiche der potenziellen Bindestellen der Regulatoren MsrF und MsrG stromaufwärts des BRE-Elements deuten somit drauf hin, dass diese entsprechend der Hypothese von Bose *et al.*, (2009) als Transkriptionsaktivatoren fungieren.

Zusätzlich bestätigen weiterführende Experimente, dass es sich bei der Bindung von MsrF und MsrG an die Promotorbereiche von *mtsD* und *mtsH* um eine spezifische Bindung handelt, da es im Falle von MsrF durch die Zugabe von Heringssperma-DNA im Überschuss zu keiner Veränderung im Laufverhalten der DNA kam (Abbildung 26) und im Falle von MsrG als Negativkontrollen DNA-Fragmente aus *pcyX* einer Ferredoxin-abhängigen Billinreduktase aus dem marinem Metagenom (Ledermann *et al.*, 2016) und *dmsA* der katalytischen Untereinheit einer Dimethylsulfoxid-Reduktase aus *E. coli* (Ray *et al.*, 2003), nicht gebunden werden konnten (Blasius, 2016). Dies verdeutlicht, dass die Msr-Regulatoren in der Lage sind, spezifisch DNA zu binden und diese Bindung höchstwahrscheinlich, wie bereits für eine Reihe anderer Regulatoren beschrieben, durch die N-terminale HTH-Domäne vermittelt wird (Nelson, 1995).

Die N-terminale Region der Msr-Regulatoren weisen eine hohe Ähnlichkeit zur ArsR-Familie bekannter bakterieller Regulatoren auf (Oelgeschläger & Rother, 2009). Transkriptionsfaktoren der ArsR-Familie fungieren größtenteils als Repressoren und

ermöglichen es Bakterien auf Stress, verursacht durch Schwermetallionen, zu reagieren (Wu & Rosen, 1991; Chauhan *et al.*, 2009). Die Bindung von Metallionen durch die Metallbindestelle dieser Regulatoren, verhindert deren Bindung an die DNA, wodurch die Expression der jeweiligen Gene induziert wird (Bairoch, 1993; Busenlehner *et al.*, 2003). Neben den Transkriptionsrepressoren der ArsR-Familie gibt es auch Transkriptionsaktivatoren von ArsR-Typ. Diese erkennen ein konserviertes Sequenzmotiv in Form eines *inverted repeats* im Promotor des Zielgens und aktivieren beispielsweise die Expression von *dosR*, *phoP* und *groEL2* in *Mycobacterium tuberculosis* oder *Mycobacterium smegmatis* (Robinson *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012). Diese Aktivatoren liegen *in vitro* als Dimere vor und erkennen das spezifische Sequenzmotiv GGTG NN TGCA NN CACC (Gao *et al.*, 2011).

mtsD	--CCGGCTGGT-AAGACCCACTATCCGATCAAAGGCTTTGATCAGATGAAAGCCTCTGAT	57
mtsH	-----CCTGAAATAGGGCATTGATATTATCAAAGCGTTTGATAAATCTCGGGTTTCTTCC	55
mtsF	CACCCTCAAAAATTAGCAGGTACTATTTTCCCAGAGATATGGGGTTTTCCAACCCCGAA	60
	* * * * *	
mtsD	CAAATGAGAGTTCCACACGAGATCAGAAA-----AGTTAACAAA	96
mtsH	TTTATTTCATGGTCCGTGTCGAGGTCAGGGTCTGGAGCTATTCAGGG---GTGCTTTCAAT	112
mtsF	TAAAACTTCATGCTTGCAA----AAAGGCCGAGAACGCAAAAGCTAAAGAAACAACAAA	116
	* * * * *	
mtsD	ATCAG-----AAATATTACCGGATCAGG-----CAAATTTATAATATCAGG	138
mtsH	ATCAAACCTCCTTGAATCCTCGAAGTCTGTTAACATCAAAAGCTTCGAAAATATTGGG	172
mtsF	TTTCCCCTGGTTCTAAAATTAGAAGTCTAGTAAAAATCCATTCCACGCAAAAATATAAAG	176
	* * * * *	
mtsD	ACAATTCACCGAATTAAGCATCAGGAGAGAGGTTAACTGCGTTAATCAGATCTCTGCGT	198
mtsH	AAATAAGTTCTTATCAA-AAGGCCGAGAAAATCAGATATATGAGGAAAAACGCTATCGG	231
mtsF	AAAACATATTTTTCCG---GGAGGGAAAAAATGCCCTGAATCAAAAACACTGTCCG	233
	* * * * *	
mtsD	TTATGTTATATGTTTGCAGTTAATGTATCATCG--	232
mtsH	TTATGCTATATATTAGCCAGTGTATATTAATATTG	267
mtsF	TTAAGCTATATACCATAGAGTCAATCTGTCATTA--	267
	*** * ***** ** * **	

Abbildung 32. Alignment der Promotoreregion -267 bis +1 von *mtsD*, *mtsH* und *mtsF* und mögliche Bindestellen im *mtsD*- und *mtsH*-Promotorbereich. Identische Basen sind mit einem * gekennzeichnet. Die mittels EMSA identifizierten Bindestellen für MsrF im *mtsD*-Promotorbereich (Position -231 bis -88), für MsrG im *mtsH*-Promotorbereich (Position -266 bis -205) und für MsrC im *mtsF*-Promotorbereich (Position -192 bis -34) sind in grau gekennzeichnet. Der Transkriptionsstart ist in orange, die TATA-Box in blau, das BRE-Element in gelb und das mögliche Bindemotiv im *mtsD*- bzw. *mtsH*-Promotor in grün markiert.

Es wurden DNA-Alignments der Promotorbereiche von *mtsH*, *mtsD* und *mtsF* erstellt, um Hinweise auf putative Erkennungssequenzen zu bekommen (Abbildung 32). Zusätzlich wurden BLAST-Analysen der entsprechenden Bereiche und ein Logo-Assay unter der Verwendung von WebLogo tool (Crooks *et al.*, 2004) erstellt (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich der Promotorregionen ist jedoch kein konserviertes Sequenzmotiv zu erkennen, das dem der ArsR-Regulatoren ähnelt. Allerdings kann im Promotorbereich von *mtsD* und *mtsH* die Sequenz ATCAA-xxxxxx-TTGAT ausgemacht werden, die als putatives Bindemotiv in Frage kommen könnte (Abbildung 32). Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine mögliche

Bindestelle handelt, könnten weiterführend EMSA mit verkürzten DNA-Fragmenten, denen die putative Bindestelle fehlt und DNase Footprint-Analysen durchgeführt werden. Da nur bestimmte DNA-Bereiche in den EMSA untersucht wurden, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die Msr-Regulatoren weitere Bindestellen weiter *up-* bzw. *downstream* aufweisen. Mittels der Proteinstrukturanalyse Tools HHpred (MPI Bioinformatics Toolkit; (Biegert *et al.*, 2006) und Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) konnte zudem gezeigt werden, dass MsrG, MsrF und MsrC strukturell eine hohe Homologie zum Transkriptionsregulator TrmBL2 aus *Pyrococcus furiosus* aufweisen. TrmBL2 gehört zur TrmB Familie archaeeller Transkriptionsregulatoren, die zumeist aus einer HTH-Domäne und/oder einer Effektor-bindedomäne bestehen und sowohl als Aktivatoren, als auch als Repressoren fungieren (Gindner *et al.*, 2014). Als Aktivatoren erkennen sie dabei verschiedene DNA-Bindemotive *upstream* des BRE-Elements. Zudem konnte die Beteiligung von Proteinen der TrmB-Familie an der Transkriptionsregulation von Stoffwechsellzymen während Nährstoffknappheit nachgewiesen werden. TrmB aus *Halobacterium salinarum* beispielsweise reguliert neben der Expression von Genen der Glykolyse und des TCA-Zyklus auch die Biosynthese seiner eigenen Kofaktoren (Schmid *et al.*, 2009). Daher wäre es interessant zu testen, ob die Msr-Proteine noch andere Zielgene regulieren und ob sie eventuell sogar ihre eigene Transkription regulieren. Die durchgeführten EMSA mit MsrF und dem *mtsH*-Promotorbereich deuten bislang jedoch nicht darauf hin, dass die Msr-Regulatoren an die jeweiligen Promotorbereiche der anderen *mts*-Gene binden (Abbildung 29). Es muss allerdings bedacht werden, dass hier lediglich ein DNA-Fragment, welches den Promotor von *mtsH* im Bereich von -266 bis +29 abdeckt getestet wurde. Die Möglichkeit, dass MsrF im *mtsH*-Promotor eventuell weiter *upstream* oder im Promotor anderer Zielgene bindet besteht dennoch. Für den Regulator MsrC wurde bereits postuliert, dass dieser neben *mtsF* auch die Expression von *mtaCB2* aktiviert (Bose & Metcalf, 2008). Daher sollten weitere EMSA durchgeführt werden um diese Möglichkeit näher zu überprüfen. Als globaler Ansatz könnte zudem die Methode des Chip-Seq. herangezogen werden, die es erlaubt, Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* unter physiologischen Bedingungen festzustellen, und so putative Bindestellen in anderen Promotorbereichen zu identifizieren.

Ein Großteil der DNA-bindenden Proteine in *Archaea* gehören zur Lrp/AsnC- Familie bakterieller Regulatoren, deren Prototyp das *leucin responsive regulatory protein* Lrp aus *E. coli* ist (Newman *et al.*, 1992; Calvo & Matthews, 1994; Brinkman *et al.*, 2003). Lrp Regulatoren besitzen, wie die Msr-Proteine ein N-terminales HTH-Motiv, sowie eine Effektor-Bindedomäne. Durch Sequenz-Analysen konnten einige Homologe dieser Regulatoren in archaellen Genomen identifiziert werden. Neben Lrp14 aus *S. solfataricus* und LrpA aus *Pyrococcus woesei* die als Transkriptionsrepressoren dienen indem sie die Bindung der allgemeinen

Transkriptionsfaktoren oder die Rekrutierung der RNAP durch Bindung an den eigenen Transkriptionsstart verhindern (vergleiche Kapitel 1.3), konnten auch Aktivatoren des Lrp-Typs identifiziert werden. Dazu zählen die homologen Transkriptionsfaktoren Ptr1 und Ptr2 aus *Methanococcus jannaschii*. Ptr2 aktiviert die Transkription des rb2 Promotors indem er dem TBP das Binden an die degenerierte TATA-Box erleichtert (Geiduschek & Ouhammouch, 2005). Da die Promotoren der *mts*-Gene ebenfalls kein konventionelles purinreiches BRE-Element besitzen, könnte die Transkriptionsregulation einen dem Ptr2 ähnlichen Mechanismus aufweisen, indem sie die allgemeinen Transkriptionsfaktoren bei der Bindung an die jeweiligen Promotorelemente unterstützen. Zudem ist auffällig das Ptr1 und Ptr2 sehr unterschiedliche Erkennungssequenzen im Zielpromotor aufweisen. Beide Regulatoren erkennen palindromische Konsensussequenzen, die sich jedoch in ihrer Sequenz und Struktur unterscheiden (Brinkman *et al.*, 2003). Zielpromotoren anderer Lrp-ähnlicher Proteine weisen ebenfalls mehrere Bindestellen auf, die keine offensichtlichen inverted repeats darstellen (Calvo & Matthews, 1994; Napoli *et al.*, 1999; Brinkman *et al.*, 2000). Im Sequenzalignment der *mts*-Promotorregionen konnte lediglich ein putatives Bindemotiv im Promotor von *mtsH* und *mtsD* ausgemacht werden (Abbildung 32). Die Msr-Regulatoren könnten jedoch trotz hoher Homologie zueinander, analog zu den Lrp-ähnlichen Proteinen, ebenfalls mehrere unterschiedliche Bindestellen aufweisen.

Von Mitgliedern der MsrF-Familie ist bekannt, dass diese als Heterodimer miteinander interagieren und als transkriptionelle Aktivatoren fungieren. Dazu zählen die Regulatoren MsrA/B und MsrG/E, die an die Promotorbereiche der methanolspezifischen Methyltransferasen MtaCB1 und MtaCB2 binden (Bose & Metcalf, 2008; Lopez Munzo, 2017). Mittels EMSA konnte gezeigt werden, dass MsrG, MsrF und MsrC jeweils ohne einen Interaktionspartner in der Lage sind spezifisch an die Promotorbereiche der jeweiligen *mts*-Gene zu binden. Eine Heterodimerbildung zwischen den Regulatoren konnte mittels GPC und SPR-Experimenten im selben Puffersystem wie das der EMSA, jedoch in Abwesenheit von DNA nicht beobachtet werden (Abbildung 24). EMSA mit MsrG und MsrF in einem äquimolaren Verhältnis konnten keine Änderungen im Laufverhalten der DNA herbeiführen (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man die genomische Anordnung der Msr-Proteine genauer wird deutlich, dass MsrA/B und MsrD/E konträr zu MsrG, MsrF und MsrC in genetisch gebunden Paaren auf der DNA kodieren (Bose & Metcalf, 2008), was die experimentelle Beobachtung, dass sie keine Heterodimere bilden bestärkt. Zudem sind sowohl in *Bacteria* als auch in *Archaea* nur wenige Regulatoren beschrieben, die als Heterodimere ihre Zielgene regulieren (Al-Bassam *et al.*, 2014; Lopez Munzo, 2017). Jedoch wurde lediglich die Bindung zwischen MsrG und MsrF untersucht und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Regulatoren in anderen Paarungen miteinander interagieren und an die DNA binden.

Desweiteren könnten die Regulatoren an andere Promotorbereiche als die bislang getesteten von *mtsH* und *mtsD* binden und lediglich dort Heterodimere bilden. Zudem bleibt die Frage offen, ob MsrG, MsrF und MsrC wirklich als Monomere oder als Dimere an die DNA binden. Die GPC deutet darauf hin, dass MsrG und MsrF in Lösung unter den gewählten Bedingungen Monomere ausbilden (Abbildung 24 A). Die Westernblot-Analyse des *in vivo Crosslinking* Experiments zeigen jedoch, dass MsrG vermutlich Dimere ausbildet (Abbildung 14 A2). Die meisten Transkriptionsregulatoren binden als Dimere oder in höheren Oligomerisierungszuständen an die DNA. Beispielsweise die für Methanogene spezifischen Regulatoren MsvR und MreA (Mitglied der TrmB-Familie), die als Dimere an der Regulation von Genen für oxidativen Stress und Genen der Methanogenese involviert sind (Karr, 2010; Reichlen *et al.*, 2012). Daher sollten eine GPC in Anwesenheit der DNA-Fragmente und *in vivo Crosslinking* Experimente durchgeführt werden, um eventuell einen Hinweis zu bekommen, ob die Regulatoren unter diesen Bedingungen Dimere ausbilden.

Die gezeigten DNA-Protein-Interaktionen wurden zudem nur bedingt unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden generelle physiologische Parameter, aber auch die Interaktion der Regulatoren mit den Kinasen außer Acht gelassen. Wird in Betracht gezogen, dass MsrG, MsrF und MsrC sowohl mit der Kinase MsmS und RdmS interagieren und diese ein Singaltransduktionsnetzwerk bilden, muss in Anwesenheit der Kinasen mit einer Modifikation der Regulatoren gerechnet werden, die das Bindeverhalten der Proteine an die DNA ebenfalls beeinflussen könnte (Diskutiert in Kapitel 4.6).

4.6 Der putative Mechanismus der Signaltransduktion

Werden alle bisherigen Untersuchungsergebnisse zusammengeführt, kann folgendes putatives Modell für das in dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktionssystem aufgestellt werden:

Die Methyltransferase-Fusionsproteine MtsH, MtsD und MtsF werden transkriptionell und posttranskriptionell über die Anwesenheit von Methylsulfiden wie Methanthiol, Dimethylsulfid und Methylmercaptopropionat reguliert (Fu & Metcalf, 2015). Die Sensorkinasen MsmS und RdmS könnten die Verfügbarkeit dieser Substrate beispielsweise über den kovalent gebundenen Häm-Kofaktor wahrnehmen. Wird das entsprechende Substrat von der Kinase erkannt, könnte sich entweder ein bestehender Protein-Komplex aus Sensorkinase und Regulator auflösen oder die Kinasen mit dem passenden Msr-Regulator interagieren. Der dadurch aktivierte Regulator könnte anschließend spezifisch die Expression der korrespondierenden Methyltransferase aktivieren, wodurch das Substrat der Methanogenese zugänglich gemacht werden kann (Abbildung 33 A). Nimmt die Kinase hingegen kein

adäquates Substrat wahr, könnte es zur ATP-abhängigen Phosphorylierung eines bislang unbekanntem Faktors kommen, der entweder mit dem an die DNA gebundenen Msr-Regulator interagiert oder mit dem Msr-Regulator um die DNA-Bindestelle konkurriert, wie beispielsweise für das ZKS KdpD/KdpE gezeigt (vgl. Kapitel 4.4). Folglich würde sich der Regulator von der DNA lösen und die Expression der *mts*-Gene nicht länger aktivieren (Abbildung 33 B).

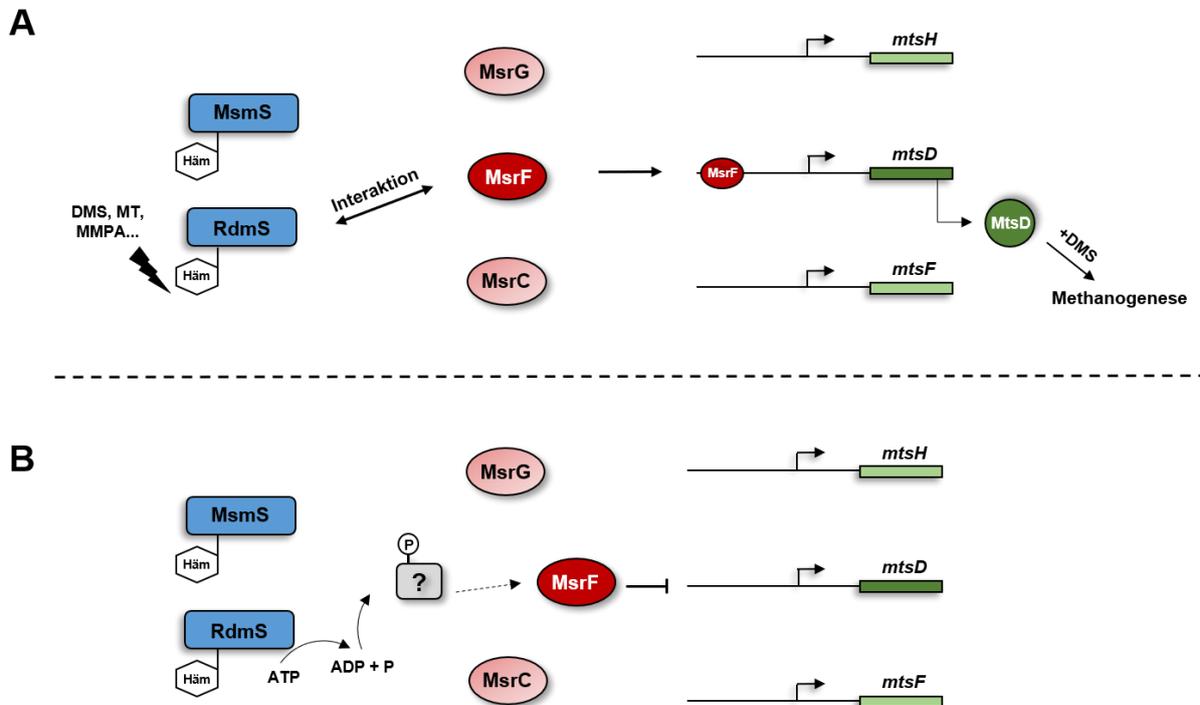


Abbildung 33: Model des putativen Signaltransduktionsmechanismus basierend auf den in dieser Arbeit erhaltenden Daten. Schematisch dargestellt sind die Kinasen MsmS und RdmS in Blau, die Regulatoren MsrG, MsrF und MsrC in Rot und die Gene der Methyltransferasen *mtsH*, *mtsD* und *mtsF* in Grün. (A) Nimmt die Kinase ein bestimmtes Signal in Form von Substraten (DMS, MMPA, usw.) der Methyltransferasen wahr, kommt es entweder zu Auflösung eines bestehenden Protein-Regulator-Komplexes oder zur Interaktion mit dem entsprechenden Regulator. Dieser kann daraufhin spezifisch an den Promotorbereich der korrespondierenden Methyltransferase binden und deren Expression aktivieren. Das ursprünglich durch die Kinase wahrgenommenen Substrat kann dann der Methanogenese zugänglich gemacht werden. (B) Nimmt die Kinase kein adäquates Substrat wahr, kommt es zur ATP-abhängigen Phosphorylierung eines bislang unbekanntem Faktors (?), der das Binden des Regulators an die DNA verhindert.

Ähnliche regulatorische Prozesse konnten bereits für Signaltransduktionssysteme aus *Bacillus subtilis* oder *E. coli* gezeigt werden. Die Stressantwort in *B. subtilis* wird zum Beispiel über den Sigmafaktor σ^B reguliert. Dieser liegt in nicht gestressten Zellen gebunden an die Kinase RsbW (Anti-Sigmafaktor) in inaktivierter Form vor. RsbW ist zudem in der Lage, ein weiteres Protein den Anti-Anti-Sigmafaktor RsbV zu phosphorylieren. Wird ein entsprechendes Signal wahrgenommen, kommt es zur Dephosphorylierung von RsbV. Dieser bildet in der unphosphorylierten aktiven Form einen Komplex mit der Kinase RsbW, der Sigmafaktor σ^B wird frei und ist dann in der Lage, zusammen mit der RNAP an die Promotorregionen der entsprechenden Zielgene zu binden (Benson & Haldenwang, 1992; Mittenhuber, 2002). Der

Transkriptionsfaktor CtrS, bestehend aus einer HTH- und DUF-Domäne, wird beispielsweise von der korrespondierenden Kinase McsB an Argininresten innerhalb der DNA-Bindedomäne phosphoryliert und ist dann nicht mehr in der Lage an die DNA zu binden (Fuhrmann *et al.*, 2009). Ein weiteres Beispiel stellt das bereits zuvor beschriebene ZKS KdpD/KdpE dar, welches die K⁺-Homöostase in *E. coli* reguliert (vgl. Kapitel 4.4). Liegt das Phosphotransferaseprotein PtsN in nicht phosphorylierter Form vor, bindet dieser an die korrespondierende Kinase KdpD und blockiert damit die Bindung des Regulators KdpE and KdpD. KdpE wird folglich nicht durch KpdD phosphoryliert und ist somit nicht in der Lage, seine Zielgene zu aktivieren (Mörk-Mörkenstein *et al.*, 2017). Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass trotz weitreichender Untersuchungen eine Reihe an Fragen, die das in dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktionssystem betreffen, offenbleiben, wie beispielsweise: Nehmen die Kinasen verschiedene Signale wahr oder komplementieren sie sich gegenseitig? Liegen Kinase und Regulator in einem festen Komplex vor oder interagieren diese erst nach der Signalperzeption miteinander? Wie wird entschieden, mit welchem Regulator die Kinasen interagieren? Wer oder was ist der Phosphoakzeptor? Daher sollten weitere Analysen durchgeführt werden, um den genauen Funktionsmechanismus des Signaltransduktionsnetzwerkes in *M. acetivorans* aufzudecken und Signaltransduktion in *Archaea* im Allgemeinen besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Die Sensorkinasen MsmS und RdmS aus dem methanogenen Archaeon *M. acetivorans* liegen mit Genen, die für die Regulatoren der Msr-Familie, MsrG, MsrF und MsrC, kodieren, assoziiert im Genom vor und sind an der Regulation der methylsulfidspezifischen Methyltransferasen MtsH, MtsD und MtsF beteiligt, die für die Verstoffwechslung von Methylsulfiden innerhalb der Methanogenese von Bedeutung sind. Diese Systeme eignen sich bestens, um die Signaltransduktion in *Archaea* im Allgemeinen besser zu verstehen und wurden daher im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert.

Im Vorfeld wurden die Sensorkinasen MsmS und RdmS als Häm-basierte Redoxsensoren beschrieben, die an Serin- oder Tyrosinresten phosphoryliert werden. Entgegen dieser Annahme konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RdmS keine Autokinaseaktivität aufweist und dass die in vorangegangenen Studien identifizierten Phosphorylierungen auf unspezifische Interaktionen der Proteine mit ATP unter den getesteten Bedingungen zurückzuführen sind. ATP-Binde- und Hydrolyseassays konnten allerdings zeigen, dass RdmS in der Lage ist, ATP zu binden und dieses auch zu hydrolysieren. Aufgrund der genomischen Organisation wurde daher ein Phosphatgruppentransfer von RdmS auf den Regulator MsrF untersucht. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden und auch andere Phosphoakzeptor konnten im Zuge dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie und *in vivo* Crosslinking-Experimenten konnte die Interaktion der Sensorkinase RdmS mit den Regulatoren MsrF und MsrC und die Interaktion der Sensorkinase MsmS mit dem Regulator MsrG bestätigt werden. Auf Grundlage dieser und vorangegangener Analysen sind die Kinasen jeweils in der Lage, mit allen drei Msr-Regulatoren zu interagieren, weshalb angenommen werden kann, dass das untersuchte Signaltransduktionssystem ein Multi-Komponenten-System darstellt und die Kinasen und Regulatoren miteinander kreuzregulieren.

Durchgeführte *Electrophoretic mobility shift assays* zeigen, dass MsrG, MsrF und MsrC spezifisch an die Promotorbereiche der *mts*-Gene binden. Dabei konnte eine Bindung jeweils nur an den *mts*-Promotorbereich identifiziert werden, der mit dem jeweiligen *msr*-Gene assoziiert auf dem Genom vorliegt. Die Bindestellen von MsrF im *mtsD*-Promotor und die Bindestelle von MsrG im *mtsH*-Promotor konnten zudem auf einen ca. 140 bp bzw. 60 bp großen Bereich stromaufwärts des Transkriptionsstarts begrenzt werden und legen beiden Regulatoren somit eine Rolle als Transkriptionsaktivator nahe. Durch Sequenzvergleiche konnte in diesen Bereichen zudem das putative Bindemotiv ATCAA-xxxxxx-TTGAT ausgemacht werden, welches jedoch in weiterführenden Analysen bestätigt werden muss.

6 Summary

The sensor kinases MsmS and RdmS from the methanogenic archaeon *M. acetivorans* are associated with genes encoding the regulators of the Msr family, MsrG, MsrF and MsrC, in the genome and are involved in the regulation of the methylsulfide-specific methyltransferases MtsH, MtsD and MtsF, which are important for the metabolism of methyl sulfides within methanogenesis. These systems are best suited to better understand signal transduction in archaea in general and were therefore characterized in more detail in this work. In the past, the sensor kinases MsmS and RdmS were described as heme-based redox sensors that are phosphorylated on serine or tyrosine residues. Contrary to this assumption, it could be shown in this work that RdmS does not have autokinase activity and that the phosphorylations identified in previous studies are due to unspecific interactions of the proteins with ATP under the tested conditions. However, ATP-binding and hydrolysis assays showed that RdmS is able to bind and hydrolyze ATP. Based on the genomic organization, a phosphate group transfer from RdmS to the regulator MsrF was therefore examined. However, this could not be confirmed and other phosphoacceptors could also not be identified in the course of this work. The interaction of the sensor kinase RdmS with the regulators MsrF and MsrC and the interaction of the sensor kinase MsmS with the regulator MsrG were confirmed by surface plasmon resonance spectroscopy and *in vivo* crosslinking experiments. Based on these and previous analyses, the kinases are each able to interact with all three Msr-regulators, suggesting that the studied signal transduction system is a multi-component system and that the kinases and regulators cross-regulate with each other. *Electrophoretic mobility shift assays* have shown that MsrG, MsrF and MsrC specifically bind to the promoter regions of the *mts*-genes. In each case, binding could only be identified in the *mts*-promoter region associated with the respective *msr*-gene in the genome. In addition, the binding sites of MsrF in the *mtsD*-promoter and the binding site of MsrG in the *mtsH*-promoter could be limited to an approximately 140 bp and 60 bp large region upstream of the transcription start, respectively, suggesting that both regulators act as transcription activators. In addition, the putative binding motif ATCAA-xxxxxx-TTGAT could be identified in these areas by sequence comparisons, which however must be confirmed in further analyses.

References

- Adams, J. A. (2001).** Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical Reviews* **101**, 2271–2290.
- Aivaliotis, M., Macek, B., Gnad, F., Reichelt, P., Mann, M. & Oesterhelt, D. (2009).** Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in the archaeon *Halobacterium salinarum*-a representative of the third domain of life. *PLoS one* **4**, e4777.
- Al-Bassam, M. M., Bibb, M. J., Bush, M. J., Chandra, G. & Buttner, M. J. (2014).** Response regulator heterodimer formation controls a key stage in *Streptomyces* development. *PLoS genetics* **10**, e1004554.
- Alessi, D. R. & Cohen, P. (1998).** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Current Opinion in Genetics and Development*, 55–62.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Research* **27**, 4658–4670.
- Aravind, L. & Ponting, C. P. (1997).** The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trend in Biochemical Sciences* **22**, 458–459.
- Ashby, M. K. (2006).** Distribution, structure and diversity of "bacterial" genes encoding two-component proteins in the Euryarchaeota. *Archaea* **2**, 11–30.
- Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R. P. & Dickerson, R. E. (1996).** Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**, 11053–11061.
- Bairoch, A. (1993).** A possible mechanism for metal-ion induced DNA - protein dissociation in a family of prokaryotic transcriptional regulators. *Nucleic Acids Research* **21**, 2515.
- Baliga, N. S., Goo, Y. A., Ng, V. W., Hood, L., Daniels, C. J. & DasSarma, S. (2000).** Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Molecular Microbiology* **36**, 1184–1185.
- Bartlett, M. S., Thomm, M. & Geiduschek, E. P. (2000).** The orientation of DNA in an archaeal transcription initiation complex. *Nature Structural Biology* **7**, 782–785.
- Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E. & Silverman, M. R. (1993).** Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology* **9**, 773–786.

- Bell, S. D., Brinkman, A. B., van der Oost, J. & Jackson, S. P. (2001).** The archaeal TFIIE α homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Reports* **2**, 133–138.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2001).** Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 208–213.
- Bell, S. D., Magill, C. & Jackson, S. P. (2001).** Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochemical and Society Transactions*, 392–395.
- Benson, A. K. & Haldenwang, W. G. (1992).** Bacillus subtilis sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2330–2334.
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Söding, J. & Lupas, A. N. (2006).** The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Research* **34**, W335-9.
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. & Simon, M. I. (1999).** Structure of CheA, a Signal-Transducing Histidin Kinase. *Cell*, 131–141.
- Bilwes, A. M., Quezada, C. M., Croal, L. R., Crane, B. R. & Simon, M. I. (2001).** Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nature Structural Biology* **8**, 353–360.
- Blasius, L. (2016).** *Die Rolle des regulators MsrG als Teil eines Zwei-Komponenten-Systems in Methanosarcina acetivorans*. Technische Universität Kaiserslautern: Masterarbeit.
- Blaut, M. (1994).** Metabolism of methanogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 187–208.
- Bose, A., Kulkarni, G. & Metcalf, W. W. (2009).** Regulation of putative methyl-sulphide methyltransferases in Methanosarcina acetivorans C2A. *Molecular Microbiology* **74**, 227–238.
- Bose, A. & Metcalf, W. W. (2008).** Distinct regulators control the expression of methanol methyltransferase isozymes in Methanosarcina acetivorans C2A. *Molecular Microbiology* **67**, 649–661.
- Bose, A., Pritchett, M. A. & Metcalf, W. W. (2008).** Genetic analysis of the methanol- and methylamine-specific methyltransferase 2 genes of Methanosarcina acetivorans C2A. *Journal of Bacteriology* **190**, 4017–4026.
- Bourret, R. B. (2010).** Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 142–149.

- Brinkman, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., Heus, E. de, Lebbink, J. H., Thomm, M., Vos, W. M. de & van der Oost, J. (2000).** An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38160–38169.
- Brinkman, A. B., Ettema, T. J. G., Vos, W. M. de & van der Oost, J. (2003).** The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular Microbiology* **48**, 287–294.
- Burke, S. A., Lo, S. L. & Krzycki, J. A. (1998).** Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology* **180**, 3432–3440.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2003).** The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 131–143.
- Cai, S. J. & Inouye, M. (2002).** EnvZ-OmpR Interaction and Osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 24155–24161.
- Calvo, J. M. & Matthews, R. G. (1994).** The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **58**, 466–490.
- Cavicchioli, R., ed. (2007).** *Archaea*. Washington DC: ASM Press.
- Chauhan, S., Kumar, A., Singhal, A., Tyagi, J. S. & Krishna Prasad, H. (2009).** CmtR, a cadmium-sensing ArsR-SmtB repressor, cooperatively interacts with multiple operator sites to autorepress its transcription in *Mycobacterium tuberculosis*. *The FEBS Journal* **276**, 3428–3439.
- Cho, H. Y., Cho, H. J., Kim, Y. M., Oh, J. I. & Kang, B. S. (2009).** Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 13057–13067.
- Cohen, P. (1989).** The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 453–508.
- Costa, K. C. & Leigh, J. A. (2014).** Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology* **29**, 70–75.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. (2004).** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research* **14**, 1188–1190.

- Dammeyer, T., Hofmann, E. & Frankenberg-Dinkel, N. (2008).** Phycoerythrobilin synthase (PebS) of a marine virus. Crystal structures of the biliverdin complex and the substrate-free form. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 27547–27554.
- Denig, L. (2020).** *Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf das Phytochrom PaBphP von Pseudomonas aeruginosa.* Rheinischen Friedrichs-Wilhelms-Universität Bonn: Masterarbeit.
- Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. (1996).** Pathways of energy conversion in methanogenic archaea. *Archives of Microbiology* **165**, 149–163.
- Derouiche, A., Cousin, C. & Mijakovic, I. (2012).** Protein phosphorylation from the perspective of systems biology. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 585–590.
- Desjardins, P. & Conklin, D. (2010).** NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments* **45**, 1–5.
- Eagon, R. G. (1962).** Pseudomonas Natrigenes, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes. *Journal of Bacteriology* **83**, 736–737.
- Esser, D., Pham, T. K., Reimann, J., Albers, S. V., Siebers, B. & Wright, P. C. (2012).** Change of carbon source causes dramatic effects in the phospho-proteome of the archaeon Sulfolobus solfataricus. *Journal of Proteome Research* **11**, 4823–4833.
- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P. & Tyson, G. W. (2019).** An evolving view of methane metabolism in Archaea. *Nature Reviews Microbiologie* **17**, 219–232.
- Evans, P. R., Farrants, G. W., Hudson, P. J. & Britton, H. G. (1981).** Phosphofructokinase: Structure and Control. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 53–62.
- Fägerstam, L. G., Frostell-Karlsson, Å., Karlsson, R., Persson, B. & Rönnberg, I. (1992).** Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Journal of Chromatography* **597**, 397–410.
- Ferry, J. G. (1992).** Biochemistry of Methanogens. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 473–503.
- Ferry, J. G. (1997).** Enzymology of the fermentation of acetate to methane by Methanosarcina thermophila. *BioFactors* **6**, 25–35.
- Fiege, K. (2019).** *Function of two redox sensing kinases from the methanogenic archaeon Methanosarcina acetivorans.* Technische Unisversität Kaiserslautern: Dissertation.

- Fiege, K. & Frankenberg-Dinkel, N. (2019).** Thiol-based redox sensing in the methyltransferase associated sensor kinase RdmS in *Methanosarcina acetivorans*. *Environmental Microbiology* **21**, 1597–1610.
- Fiege, K., Querebillo, C. J., Hildebrandt, P. & Frankenberg-Dinkel, N. (2018).** Improved Method for the Incorporation of Heme Cofactors into Recombinant Proteins Using *Escherichia coli* Nissle 1917. *Biochemistry* **57**, 2747–2755.
- Fu, H. & Metcalf, W. W. (2015).** Genetic basis for metabolism of methylated sulfur compounds in *Methanosarcina* species. *Journal of Bacteriology* **197**, 1515–1524.
- Fuhrmann, J., Schmidt, A., Spiess, S., Lehner, A., Turgay, K., Mechtler, K., Charpentier, E. & Clausen, T. (2009).** McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* **324**, 1323–1327.
- Fuhs, S. R. & Hunter, T. (2017).** pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification. *Current Opinion in Cell Biology* **45**, 8–16.
- Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R. & Smirnov, S. & other authors (2002).** The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Research* **12**, 532–542.
- Galperin, M. Y. (2010).** Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 150–159.
- Galperin, M. Y., Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2018).** Phyletic Distribution and Lineage-Specific Domain Architectures of Archaeal Two-Component Signal Transduction Systems. *Journal of Bacteriology* **200**, 1–16.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V. (2001).** Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters* **203**, 11–21.
- Gao, C.-H., Yang, M. & He, Z.-G. (2011).** An ArsR-like transcriptional factor recognizes a conserved sequence motif and positively regulates the expression of *phoP* in mycobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **411**, 726–731.
- Gao, C.-H., Yang, M. & He, Z.-G. (2012).** Characterization of a novel ArsR-like regulator encoded by Rv2034 in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS one* **7**, e36255.
- Gao, R. & Stock, A. M. (2009).** Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology* **63**, 133–154.

- Geiduschek, E. P. & Ouhammouch, M. (2005).** Archaeal transcription and its regulators. *Molecular Microbiology* **56**, 1397–1407.
- Gill, S. C. & van Hippel, P. H. (1989).** Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319–326.
- Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G., Perutz, M. F., Kiger, L., Marden, M. C. & Poyart, C. (1994).** Heme-Based Sensors, Exemplified by the Kinase FixL, Are a New Class of Heme Protein with Distinctive Ligand Binding and Autoxidation. *Biochemistry* **33**, 8067–8073.
- Gindner, A., Hausner, W. & Thomm, M. (2014).** The TrmB family: a versatile group of transcriptional regulators in Archaea. *Extremophiles* **18**, 925–936.
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D. J., Guest, J. R. & Andrews, S. C. (1999).** Identification and Characterisation of a Two-Component Sensor-Kinase and Response-Regulator System (DcuS-DcuR) Controlling Gene Expression in Response to C₄-Dicarboxylates in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 1238–1248.
- Grahame, D. A. & DeMoll, E. (1995).** Substrate and Accessory Protein Requirements and Thermodynamics of Acetyl-coA Synthesis and Cleavage in *Methanosarcina barkeri*. *Biochemistry* **34**, 4617–4624.
- Grant, S. G. N., Jesse, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4645–4649.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. & Dobrindt, U. (2004).** Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of Bacteriology* **186**, 5432–5441.
- Guss, A. M., Rother, M., Zhang, J. K., Kulkarni, G. & Metcalf, W. W. (2008).** New methods for tightly regulated gene expression and highly efficient chromosomal integration of cloned genes for *Methanosarcina* species. *Archaea* **2**, 193–203.
- Gutiérrez, P., Li, Y., Osborne, M. J., Pomerantseva, E., Liu, Q. & Gehring, K. (2005).** Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**, 3496–3501.
- Hanks, S. K. (2003).** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology* **4**, 4:III.
- Hanks, S. K. & Hunter, T. (1995).** The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* **9**, 576–596.

- Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988).** The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science* **241**, 42–52.
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C. & Thomm, M. (1996).** Two Transcription Factors Related with the Eucaryal Transcription Factors TATA-binding Protein and Transcription Factor IIB Direct Promoter Recognition by an Archaeal RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **47**, 30144–30148.
- Heermann, R. & Jung, K. (2010).** The complexity of the 'simple' two-component system KdpD/KdpE in Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters* **304**, 97–106.
- Heine, S. (2014).** *Das Phytochrom-Regulon und eine Phosphodiesterase als Beispiel zur Wahrnehmung von Umweltsignalen in Pseudomonas aeruginosa.* Ruhr-Universität Bochum: Dissertation.
- Hesterkamp, T. & Bukau, B. (1998).** Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in E. coli. *The EMBO Journal* **17**, 4818–4828.
- Hickey, A. J., Conway de Macario, E. & Macario, A. J. L. (2002).** Transcription in the archaea: basal factors, regulation, and stress-gene expression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 537–599.
- Hiratsuka, T. (2003).** Fluorescent and colored trinitrophenylated analogs of ATP and GTP. *European Journal of Biochemistry* **270**, 3479–3485.
- Hirayama, T. & Oka, A. (1992).** Novel protein kinase of Arabidopsis thaliana (APK1) that phosphorylates tyrosine, serine and threonine. *Plant Molecular Biology* **20**, 653–662.
- Ho, Y.-S. J., Burden, L. M. & Hurley, J. H. (2000).** Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *The EMBO Journal* **19**, 5288–5299.
- Hoch, J. A. (2000).** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 165–170.
- Hoch, J. A. & Varughese, K. I. (2001).** Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction. *Journal of Bacteriology*, 4941–4949.
- Hoffmann, L., Anders, K., Bischof, L. F., Ye, X., Reimann, J., Khadouma, S., Pham, T. K., van der Does, C. & Wright, P. C. & other authors (2019).** Structure and interactions of the archaeal motility repression module ArnA-ArnB that modulates archaeal gene expression in Sulfolobus acidocaldarius. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 7460–7471.

- Huang, Z. J., Ederly, I. & Rosbash, M. (1993).** PAS is a dimerization domain common to Drosophila Period and several transcription factors. *Letters to Nature* **364**, 259–262.
- Hutti, J. E., Jarrell, E. T., Chang, J. D., Abbott, D. W., Storz, P., Toker, A., Cantley, L. C. & Turk, B. E. (2004).** A rapid method for determining protein kinase phosphorylation specificity. *Nature Methods* **1**, 27–29.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. & Miyata, T. (1989).** Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9355–9359.
- Jones, W. J., Nagle, D. P. & Whitman, W. B. (1987).** Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiological Reviews* **51**, 135–177.
- Karr, E. A. (2010).** The methanogen-specific transcription factor MsvR regulates the fpaA-rlp-rub oxidative stress operon adjacent to msvR in Methanothermobacter thermautotrophicus. *Journal of Bacteriology* **192**, 5914–5922.
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. (2009).** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**, 363–371.
- Kennelly, P. J. (2014).** Protein Ser/Thr/Tyr phosphorylation in the Archaea. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 9480–9487.
- Koch, M. K., Staudinger, W. F., Siedler, F. & Oesterhelt, D. (2008).** Physiological sites of deamidation and methyl esterification in sensory transducers of Halobacterium salinarum. *Journal of Molecular Biology* **380**, 285–302.
- Köhler, S. (2021).** *Sensing of redox imbalances and its impact on gene expression in Methanosarcina acetivorans*. Technische Universität Kaiserslautern: Masterarbeit.
- Koretke, K. K., Lupas, A. N., Warren, P. V., Rosenberg, M. & Brown, J. R. (2000).** Evolution of Two-Component Signal Transduction. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1956–1970.
- Krebs, E. G. (1983).** Historical Perspectives on Protein Phosphorylation and a Classification System for Protein Kinases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **302**, 3–11.
- Krell, T. (2018).** Exploring the (Almost) Unknown: Archaeal Two-Component Systems. *Journal of Bacteriology* **200**, 1–5.

- Kunst, F. & Rapoport, G. (1995).** Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **177**, 2403–2407.
- Kwiatkowski, K. (2013).** *Einbau von Pyrrolysin und Charakterisierung einer Sensorkinase aus Methanosarcina acetivorans*. Ruhr-Universität Bochum: Masterarbeit.
- Kyrpides, N. C. & Ouzounis, C. A. (1999).** Transcription in Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8545–8550.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Laub, M. T. & Goulian, M. (2007).** Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics* **41**, 121–145.
- Ledermann, B., Béjà, O. & Frankenberg-Dinkel, N. (2016).** New biosynthetic pathway for pink pigments from uncultured oceanic viruses. *Environmental Microbiology* **18**, 4337–4347.
- Leonard, C. J., Aravind, L. & Koonin, E. V. (1998).** Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Research* **8**, 1038–1047.
- Li, J., Zheng, X., Guo, X., Qi, L. & Dong, X. (2014).** Characterization of an archaeal two-component system that regulates methanogenesis in *Methanosaeta harundinacea*. *PLoS one* **9**, e95502.
- Lindebro, M., Poellinger, L. & Whitelaw, L. (1995).** Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *The EMBO Journal*, 3528–3539.
- Littlefield, O., Korkhin, Y. & Sigler, P. B. (1999).** The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13668–13673.
- Lopez Munzo, M. N. (2017).** *Insights into substrate utilization and transcriptional regulation in Methanosarcina*. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H., eds. (1998).** *Bioanalytik*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Macario, A. J. L. & Conway de Macario, E. (2001).** The Molecular Chaperone Systeme and other Anti-Stress Mechanisms in Archaea. *Frontiers in Bioscience* **6**, 262–283.
- Manning, B. D. & Cantley, L. C. (2007).** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274.

Marsh, T. L., Reich, C. I., Whitelock, R. B. & Olsen, G. J. (1994). Transcription factor IID in the Archaea: Sequences in the *Thermococcus celer* genome would encode a product closely related to the TATA-binding protein of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4180–4184.

Marshall, C. J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion in Genetics and Development* **4**, 82–89.

Martínez-Argudo, I., Martín-Nieto, J., Salinas, P., Maldonado, R., Drummond, M. & Contreras, A. (2001). Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. *Molecular Microbiology* **40**, 169–178.

Martinez-Hackert, E., Stock & A. M. (1997). Review Article: Structural Relationships in the OmpR Family of Winged-Helix Transcription Factors. *Journal of Molecular Biology* **269**, 301–312.

Mascher, T., Helmann, J. D. & Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 910–938.

Matsubara, M., Kitaoka, S., Takeda, S. & Mizuno, T. (2000). Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by His-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensors in *Escherichia coli*. *Genes to Cells*, 555–569.

Mike, L. A., Choby, J. E., Brinkman, P. R., Olive, L. Q., Dutter, B. F., Ivan, S. J., Gibbs, C. M., Sulikowski, G. A., Stauff, D. L. & Skaar, E. P. (2014). Two-component system cross-regulation integrates *Bacillus anthracis* response to heme and cell envelope stress. *PLoS Pathogens* **10**, e1004044.

Mittenhuber, G. (2002). A Phylogenomic Study of the General Stress Response Sigma Factor σ^B of *Bacillus subtilis* and its Regulatory Proteins. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4**, 427–452.

Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H. & Shinozaki, K. (1994). Cloning and Sequencing of novel serin/threonine protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **106**, 1229–1230.

Molitor, B. (2013). *A Heme-based redox sensor in the methanogenic archaeon Methanosarcina acetivorans*. Ruhr-Universität Bochum: Dissertation.

Molitor, B., Stassen, M., Modi, A., El-Mashtoly, S. F., Laurich, C., Lubitz, W., Dawson, J. H., Rother, M. & Frankenberg-Dinkel, N. (2013). A heme-based redox sensor in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 18458–18472.

- Moore, J. C. (1964).** Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science* **2**, 835–843.
- Moran, J. J., House, C. H., Vrentas, J. M. & Freeman, K. H. (2008).** Methyl sulfide production by a novel carbon monoxide metabolism in *Methanosarcina acetivorans*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 540–542.
- Mörk-Mörkenstein, M., Heermann, R., Göpel, Y., Jung, K. & Görke, B. (2017).** Non-canonical activation of histidine kinase KdpD by phosphotransferase protein PtsN through interaction with the transmitter domain. *Molecular Microbiology* **106**, 54–73.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335–350.
- Najnin, T., Siddiqui, K. S., Taha, T., Elkaid, N., Kornfeld, G., Curmi, P. M. G. & Cavicchioli, R. (2016).** Characterization of a temperature-responsive two component regulatory system from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Scientific Reports* **6**, 24278.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A. & Crews, S. T. (1991).** The *Drosophila* sing/e-minded Gene Encodes a Helix-Loop-Helix Protein That Acts as a Master Regulator of CNS Midline Development. *Cell* **67**, 1157–1167.
- Napoli, A., van der Oost, J., Sensen, C. W., Charlebois, R. L., Rossi, M. & Ciaramella, M. (1999).** An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. *Journal of Bacteriology* **181**, 1474–1480.
- Nelson, H. C. (1995).** Structure and function of DNA-binding proteins. *Current Opinion in Genetics and Development* **5**, 180–189.
- Newman, E. B., Ari, R. d' & Lin, R. T. (1992).** The Leucine-Lrp Regulon in *E. coli*: A Global Response in Search of a Raison d'Etre. *Cell* **68**, 617–619.
- Nishizawa, M., Walinda, E., Morimoto, D., Kohn, B., Scheler, U., Shirakawa, M. & Sugase, K. (2021).** Effects of Weak Nonspecific Interactions with ATP on Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **143**, 11982–11993.
- Oelgeschläger, E. & Rother, M. (2009).** In vivo role of three fused corrinoid/methyl transfer proteins in *Methanosarcina acetivorans*. *Molecular Microbiology* **72**, 1260–1272.
- Orth, J. (2020).** Investigation of the thiol-based redox-regulation of the sensor kinase *Rdms* from *Methanosarcina acetivorans*. Technische Universität Kaiserslautern: Masterarbeit.

- Ouhammouch, M. (2004).** Transcriptional regulation in Archaea. *Current Opinion in Genetics and Development* **14**, 133–138.
- Overton, T. W. (2014).** Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug discovery today* **19**, 590–601.
- Park, H., Saha, S. K. & Inouye, M. (1998).** Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 6728–6732.
- Parkinson, J. S. (1993).** Signal Transduction Schemes of Bacteria. *Cell* **73**, 857–871.
- Parkinson, J. S. (2010).** Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annual Review of Microbiology* **64**, 101–122.
- Perry, J., Koteva, K. & Wright, G. (2011).** Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Molecular BioSystems* **7**, 1388–1398.
- Plesniak, L., Horiuchi, Y., Sem, D., Meinenger, D., Stiles, L., Shaffer, J., Jennings, P. A. & Adams, J. A. (2002).** Probing the nucleotide binding domain of the osmoregulator EnvZ using fluorescent nucleotide derivatives. *Biochemistry* **41**, 13876–13882.
- Ponting, C. P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. & Koonin, E. V. (1999).** Eukaryotic Signalling Domain Homologues in Archaea and Bacteria. Ancient Ancestry and Horizontal Gene Transfer. *Journal of Molecular Biology* **4**, 729–745.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y. & Mann, M. (2003).** Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry* **75**, 663–670.
- Ray, N., Oates, J. & Turner, R. J.: Robinson, C. (2003).** DmsD is required for the biogenesis of DMSO reductase in *Escherichia coli* but not for the interaction of the DmsA signal peptide with the Tat apparatus. *FEBS Letters* **534**, 156–160.
- Reichlen, M. J., Vepachedu, V. R., Murakami, K. S. & Ferry, J. G. (2012).** MreA functions in the global regulation of methanogenic pathways in *Methanosarcina acetivorans*. *mBio* **3**, e00189-12.
- Reimann, J., Lassak, K., Khadouma, S., Ettema, T. J. G., Yang, N., Driessen, A. J. M., Klingl, A. & Albers, S.-V. (2012).** Regulation of archaella expression by the FHA and von Willebrand domain-containing proteins ArnA and ArnB in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molecular Microbiology* **86**, 24–36.

- Robert, X. & Gouet, P. (2014).** Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research* **42**, 320-3244.
- Robinson, V. L., Buckler, D. R. & Stock, A. M. (2000).** A tale of two components: a novel kinase and regulatory switch. *Nature Structural Biology* **7**, 626–633.
- Rother, M. & Metcalf, W. W. (2004).** Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: An unusual way of life for a methanogenic archaeon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**, 16929–16934.
- Rowlands, T., Baumann, P. & Jackson, S. P. (1994).** The TATA-Binding Protein: A General Transcription Factor in Eukaryotes and Archaeobacteria. *Science* **264**, 1326–1329.
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S. C. & Oesterhelt, D. (1995).** Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *Journal of Molecular Biology* **380**, 285–302.
- Sakai, S., Takaki, Y., Shimamura, S., Sekine, M., Tajima, T., Kosugi, H., Ichikawa, N., Tasumi, E. & Hiraki, A. T. & other authors (2011).** Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order Methanocellales. *PLoS one* **6**, e22898.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. & Maniatis, T., eds. (1989).** *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463–5467.
- Santangelo, T. J., Cubonová, L., James, C. L. & Reeve, J. N. (2007).** TFB1 or TFB2 is sufficient for *Thermococcus kodakaraensis* viability and for basal transcription in vitro. *Journal of Molecular Biology* **367**, 344–357.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A. (1990).** The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trend in Biochemical Sciences* **15**, 430–434.
- Sauer, K., Harms, U. & Thauer, R. K. (1997).** Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *European Journal of Biochemistry* **243**, 670–677.
- Schmid, A. K., Reiss, D. J., Pan, M., Koide, T. & Baliga, N. S. (2009).** A single transcription factor regulates evolutionarily diverse but functionally linked metabolic pathways in response to nutrient availability. *Molecular Systems Biology* **5**, 5:282.

Scrutton, M. C. & Utter, M. F. (1968). The Regulation of Glycolysis and Gluconeogenesis in Animal Tissues. *Annual Review of Biochemie*, 249–302.

Sexauer, A. (2021). *Characterization of a bacterial-like signal transduction phosphorelay in Methanosarcina acetivorans*. Technische Universität Kaiserslautern: Dissertation.

Shi, L., Potts, M. & Kennelly, P. J. (1998). The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 229–253.

Shrivastava, R., Ghosh, A. K. & Das, A. K. (2007). Probing the nucleotide binding and phosphorylation by the histidine kinase of a novel three-protein two-component system from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters* **581**, 1903–1909.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H. & Remmert, M. & other authors (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 1–6.

Silin, V. & Plant, A. (1997). Biotechnological applications of surface plasmon resonance. *Trends in Biotechnology* **15**, 353–359.

Sivaramakrishnan, S. & Montellano, P. R. O. de (2013). The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors* **3**, 259–282.

Sousa, E. H. S., Gonzalez, G. & Gilles-Gonzalez, M.-A. (2005). Oxygen blocks the reaction of the FixL-FixJ complex with ATP but does not influence binding of FixJ or ATP to FixL. *Biochemistry* **44**, 15359–15365.

Sowers, K. R., Baron, S. F. & Ferry, J. G. (1984). *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an Acetotrophic Methane-Producing Bacterium Isolated from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 971–978.

Srinivasan, G., James, C. M. & Krzycki, J. A. (2002). Pyrrolysine Encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-Decoding specialized tRNA. *Science* **296**, 1456–1459.

Stewart, R. C. (2010). Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 133–141.

Stewart, R. C., VanBruggen, R., Ellefson, D. D. & Wolfe, A. J. (1998a). TNP-ATP and TNP-ADP as probes of the nucleotide binding site of CheA, the histidine protein kinase in the chemotaxis signal transduction pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 12269–12279.

- Stewart, V. & Chen, L. (2010).** The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **192**, 734–745.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. (2000).** Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **69**, 183–215.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiological Reviews* **53**, 450–490.
- Studier, F. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113–130.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. & Nishizuka, Y. (1979).** Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 3692–3695.
- Tallant, T. C., Paul, L. & Krzycki, J. A. (2001).** The MtsA subunit of the methylthiol:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* catalyses both half-reactions of corrinoid-dependent dimethylsulfide: coenzyme M methyl transfer. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 4485–4493.
- Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R. & Qin, L. & other authors (1998).** NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* **396**, 88–92.
- Tasler, R., Moises, T. & Frankenberg-Dinkel, N. (2005).** Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *The FEBS Journal* **272**, 1927–1936.
- Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999).** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 479–506.
- Taylor, S. S., Keshwani, M. M., Steichen, J. M. & Kornev, A. P. (2012).** Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **367**, 2517–2528.
- Taylor, S. S. & Kornev, A. P. (2011).** Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 65–77.
- Terpe, K. (2006).** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**, 211–222.

- Thauer, R. K. (1998).** Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**, 2377–2406.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008).** Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews. Microbiology* **6**, 579–591.
- Thomason, P. & Kay, R. (2000).** Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of Cell Science* **113**, 3141–3150.
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V. & Zhulin, I. B. (2005).** One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology* **13**, 52–56.
- Varughese, K. I. (2002).** Molecular recognition of bacterial phosphorelay proteins. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 142–148.
- Vepachedu, V. R. & Ferry, J. G. (2012).** Role of the fused corrinoid/methyl transfer protein CmtA during CO-dependent growth of *Methanosarcina acetivorans*. *Journal of Bacteriology* **194**, 4161–4168.
- Wagner, T., Watanabe, T. & Shima, S. (2018).** Hydrogenotrophic Methanogenesis. In *Biogenesis of Hydrocarbons*, pp. 1–29. Edited by A. J. Stams & D. Sousa. Cham: Springer International Publishing.
- Wagner, V., Gessner, G., Heiland, I., Kaminski, M., Hawat, S., Scheffler, K. & Mittag, M. (2006).** Analysis of the phosphoproteome of *Chlamydomonas reinhardtii* provides new insights into various cellular pathways. *Eukaryotic Cell* **5**, 457–468.
- Wagner, V., Ullmann, K., Mollwo, A., Kaminski, M., Mittag, M. & Kreimer, G. (2008).** The phosphoproteome of a *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of the light signaling pathway. *Plant Physiology* **146**, 772–788.
- Wang, B., Yang, S., Zhang, L. & He, Z.-G. (2010).** Archaeal eukaryote-like serine/threonine protein kinase interacts with and phosphorylates a forkhead-associated-domain-containing protein. *Journal of Bacteriology* **192**, 1956–1964.
- Weinstock, M. T., Heseck, E. D., Wilson, C. M. & Gibson, D. G. (2016).** *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology. *Nature Methods* **13**, 849–851.
- Whiticar, M. J., Faber, E. & Schoell, M. (1986).** Biogenic methane formation in marine freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation-Isotope evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **50**, 693–709.

Willett, J. W., Tiwari, N., Müller, S., Hummels, K. R., Houtman, J. C. D., Fuentes, E. J. & Kirby, J. R. (2013). Specificity residues determine binding affinity for two-component signal transduction systems. *mBio* **4**, e00420-13.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 4576–4579.

Woodbury, D. J., Whitt, E. C. & Coffman, R. E. (2021). A review of TNP-ATP in protein binding studies: benefits and pitfalls. *Biophysical Reports* **1**, 1–22.

Wu, J., Ohta, N., Zhao, J. L. & Newton, A. (1999). A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13068–13073.

Wu, J. & Rosen, B. P. (1991). The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Molecular Microbiology* **5**, 1331–1336.

Yoshida, T., Cai, S. j. & Inouye, M. (2002). Interaction of EnvZ, a sensory histidine kinase, with phosphorylated OmpR, the cognate response regulator. *Molecular Microbiology* **46**, 1283–1294.

Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **47**, 321–350.

Zinder, S. (1993). *Physical ecology of methanogens. In Methanogenesis. J.G. Ferry, (ed).* New York: Chapman Hall Routledge.

Zschiedrich, C. P., Keidel, V. & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology* **428**, 3752–3775.

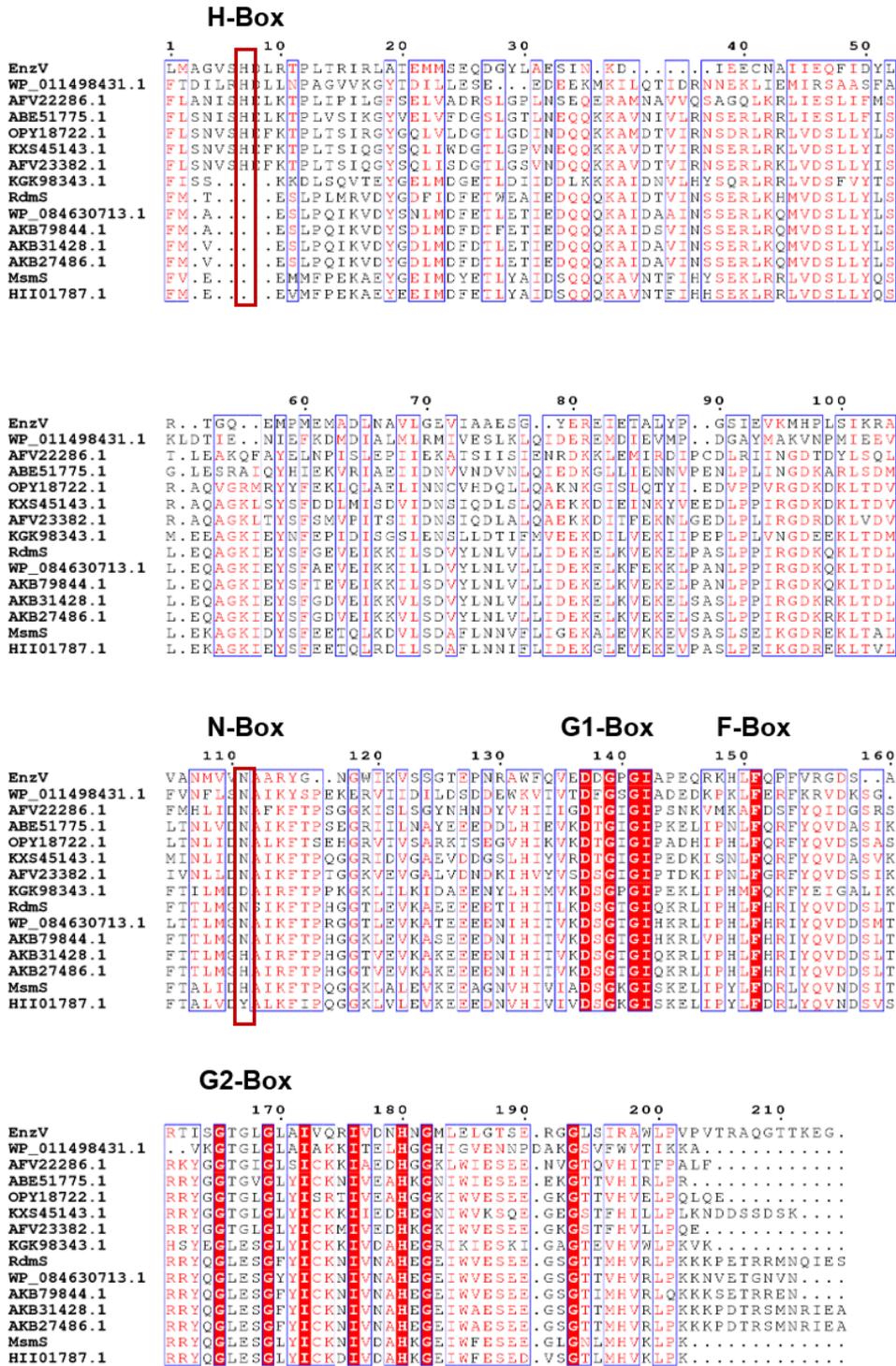


Abbildung 36. Alignment der Aminosäuresequenz der HATPase-Domänen von Kinasen mit und ohne H-Box aus *Methanomicrobia* und der Histidinkinase EnzV aus *E. coli*. Identische Aminosäuren und zu 60% ähnliche Aminosäuren sind farbig hinterlegt. Die H-Box in der der konservierte Histidinrest lokalisiert liegt, sowie die N-Box, G1-Box, F-Box, und G2-Box, die für die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse von Bedeutung sind, sind markiert.

- A** Albumin [*Bos tarus*]
 MKWVTFISLLLLFSSAYSARGVFRDRTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNEL
 TEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLK
 PDPNTLCEDEFKADEKFKWGWKLYEIAARRHPYFYAPELLYYANKYNGVFQFCCQAEDKGCALLPKIETMRE
 KVLASSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLCADDR
 ADLAKYICDNQDTISSKKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFL
 GSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAKDDPHACYSTVFDKHLVDEPQNLIKQNCQDFEK
 LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKT
 PVSEKVTKCCTESLVNRRPCCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKP
 KATEEQLKTMENFVAFVVKCCAADKCAFAVEGPKLVVSTQTALA
- B** β -Amylase [*Ipomoea batatas*]
 MAPIPGVMPIGNYVSLYVMLPLGVVNADNVFPDKEKVEDELKQVKAGCGDGMVDVWVWGIIEAKGPKQYD
 WSAYRELFQVLKCKGLKIQAIMSFHCCGGNVGDVAFIPIQWILQIGDKNPDI FYTNRAGRNRQEYLSLG
 VDNQRLFLQRTALEMYRDFMESFRDNMADFLKAGDIVDIEVCGGAAGELRYPSPETQGWVFPGIGEFQC
 YDKYMVADWKEAVKQAGNADWEMPGKGTGTYNNDTPDKTEFFRPNGTYKTDMDGKFFLTWYSNKLI IHGDQV
 LEEANKVFVGLRVNIAAKVSGIHWYNHVSHAAELTAGFYNVAGRDRGYPRIARMLARHHATLNFTCLEMR
 DSEQPAEAKSAPQELVQVLSGWEYIDVAGENALPRYDATAYNQILLNVRPNGVNLNGPPKLMMSGLT
 YLRLSDDLQTDNFELFKKFKMHADLDPSNAISPAVLERSNSAITIDELMEATKGRPFPWYDVTDM
 PVDGSNPF
- C** Alkoholdehydrogenase [*Saccharomyces cerevisiae*]
 MSI PETQKAIIFYESHGKLEHKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTKPLVGGHEGA
 GVVVGMGENVKGWIKIDYAGIKWLNGSCMACYCELGNESENCPHADLSGYTHDGSFQYATADAVQAAHI
 PQGTDLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHAAISGAAGGLGSLAVQYAKAMGYRVLGDGGPGKEEL
 FTSLGGEVFDFTKEKDIVSAVVKATNGGAHGI INVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSD
 VFNHVVKISISIVGSYVGNRADTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKQIAGRYVVDTSK
- D** Carboanhydrase [*Bos tarus*]
 MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIANGERQSPVDIDTKAVVQDPALKPLALVYGEATSRMRVNNHGSFNVEY
 DDSQDKAVLKDGPLTGTYRLVQFHFHWGSSDDQGEHTVDRKKYAAELHLVHWNTKYGDFGTAAQQPDGL
 AVVGVLKVG DANPALQKVLDALDSIKTKGKSTDFPNFDPGSLLPNVLDYWTYPGSLTTPPLESVTWIV
 LKEPISVSSQMLKFRTLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLKNRQVRGFPK
- E** BphP [*Pseudomonas aeruginosa*]
 MTSITPVTLANCEDEPIHVPGAIQPHGALVTLRADGMVLAASENIQALLGFVASPGSYLTQEQVGPVLRMLEEG
 LTGNGPWSNSVETRIGEHLFDVIGHSYKEVFYLEFEIRTADTLSITSFNLNAQRIIAQVQLHNDTASLLSNVTDE
 LRRMTGYDRVMAYRFRHDSGEVVAESRREDLESYLGORYPASDIPAQARRLYIQNPIRLIADVA YTPMRVFPAL
 NPETNESFDLSYSVLRVSPIHCEYLTNMGVRASMSISIVVGKGLWGLFSCCHHMSPKLIYPVMSFQIFSQVCS
 AIVERLEQGRIAE LLRVSTERRLALARRADADDLFGALAHDDGIAALIPCDGALVMLGGRTLSIRGDFERQAG
 NVLQRLQRDPERDIYHTDNWPQSESDPDGGDCCGVLAIRFHRQESGWI FWRHHEVHRIRWGGKPEKLLTIGPS
 GPRLTFRGSFEAWEEVVRGHSTPWSETDLAIAEKLRDLMELC LNHAAEVDRMRQLIAVLGHDLRNPQISMA
 AALLSSSDTRTTEL RQHISASSSRMERLVSQILDMSRLQSGI GLTVNPVDTDVSQLVQRIVCETDVAYPGLVIEI
 AIDPQVRAVVDPRYAQVAANLLSNARHHGLPGRPVLTTLTRQGDEVCLSVLNETSGLSEAQLANLFEPFKRESA
 DNQRNRNGLGIGLYISQAIAQAHQGRIDVDCRDDVITFCRLRPVRQAE TGSSS

Abbildung 37. Aminosäuresequenz der verwendeten Standardproteine und von BphP. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von Albumin aus *Bos tarus*, β -Amylase aus *Ipomoea batatas*, Alkoholdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*, Carboanhydrase aus *Bos tarus* und BphP aus *Pseudomonas aeruginosa*. Cysteinreste sind gelb markiert.

Promotorbereiche der *mts*-Gene

A *mtsD*

```
AGATCTCTGCGT TTTATGTTATAT GTTTTGCAGTTAATGTATCATC GTTCAAGTTAACAGTGATACAG
GGACTTACAGGAGGAGTAGGTTCCCTGATTGAGCTACTTACTGTTAACCAGGAAATAATCATAAAAATA
TGTGGGAAGCGTTTTTTT ATG
```

B *mtsH*

```
AAACGCTATCGG TTAAGCTATATA TTAGCCAGTGTATATTAATATTTT CAAGTGCGGTTTTACAGAAT
CTGTGTTACTGTTAACCGTAATGTCTGAAGGAATCTCAGACTTTTTT GACGGGCGCAAACAGGTGGCT
TTGAAAGGCATTTTTGCCTGAAGACTTATGAGAAGCCGTTTTT CCTGAATATAGGAGGTTTAATATG
GCAATTGAAA ATG
```

C *mtsF*

```
AAACACTGTGCGG TTAAGCTATATA CCATAGAGTCAATCTGTTCATTA GTGACCATTTAAACCTGAAAGA
AAGAAAAACCTGTACTGGATTTCAGGGAAAAATCCCAGTTTTGTACCGCGGCTGAAGATGCTGATTTCCG
GGAAAAAATCAATTTTT CAGGAAAAATGGTCATTTTTGTGGATTAAGGAGTATTATTAGTGGATTTAGA
GAATTGACGGGCTGTGGAACCCGTTAAAGACCTAAGCAAAAACAGATAGAGATCTGGAGAAAAACAGGC
AAAAAACTGGTTGTCCGGATTCTAATAAAAAAAGGAGATTTTTTTA ATG
```

Abbildung 38. Promotorbereich von *mtsD*, *mtsH* und *mtsF* aus *M. acetivorans*. Gezeigt ist die Transkriptionsfaktor B Erkennungssequenz (gelb), die TATA-Box (blau), das 5'-Ende der mRNA (schwarz), die 5'-UTR (grün) und die Shine-Dalgarno-Sequenz (grau) der *mts*-Gene aus *M. acetivorans*. (A) Promotorregion von *mtsD*. (B) Promotorregion von *mtsH*. (C) Promotorregion von *mtsF*

Eichgerade der Markerproteine

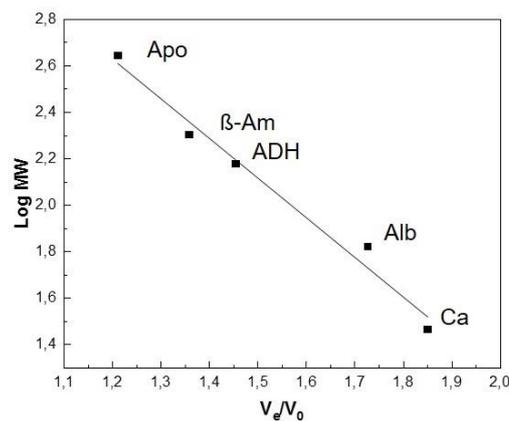


Abbildung 39. Eichgerade der Markerproteine. Markerproteine: Apoferritin (Apo; 400 kDa), β -Amylase (β -Am; 200 kDa), Alkoholdehydrogenase (ADH; 150 kDa), Albumin (Alb; 66 kDa) und Carboanhydrase (Ca; 29 kDa). Zur Bestimmung des Ausschlussvolumens (V_0) diente das Markerprotein Blue Dextran (2 MDa). Aufgetragen ist der Quotient aus Elutionsvolumen (V_e) der einzelnen Markerproteinen und V_0 gegen den dekadischen Logarithmus der relativen molekularen Masse der Markerproteine.

Phosphorylierungsassay von RdmS und Alkoholdehydrogenase

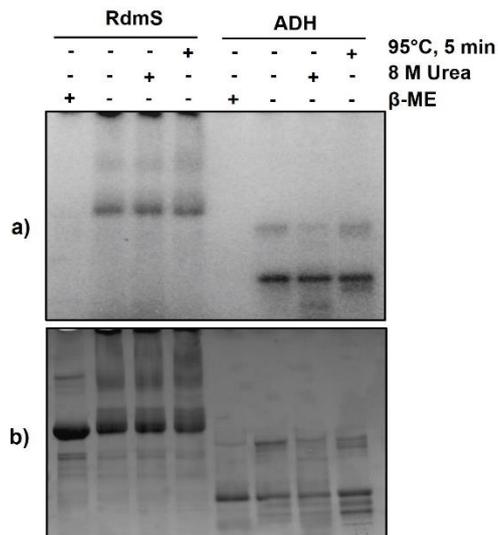


Abbildung 40. Phosphorylierungsassays von RdmS und Alkoholdehydrogenase mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ unter oxidierenden Bedingungen, terminiert in verschiedene Puffern. Jeweils 10 μM RdmS und Alkoholdehydrogenase wurden unter oxidierenden Bedingungen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert und die Reaktion nach 10 min in SDS-Probenpuffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol gekocht, für 5 min bei 95 °C oder in SDS-Probenpuffer versetzt, mit 8 M Harnstoff (8 M Urea) terminiert. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und über Nacht die Signale auf eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (a) Autoradiogramm und (b) Coomassie-Färbung des SDS-Gels.

Fluoreszenz-basierte Titration von RdmS und MA4377PKR1R2 mit TNP-ATP

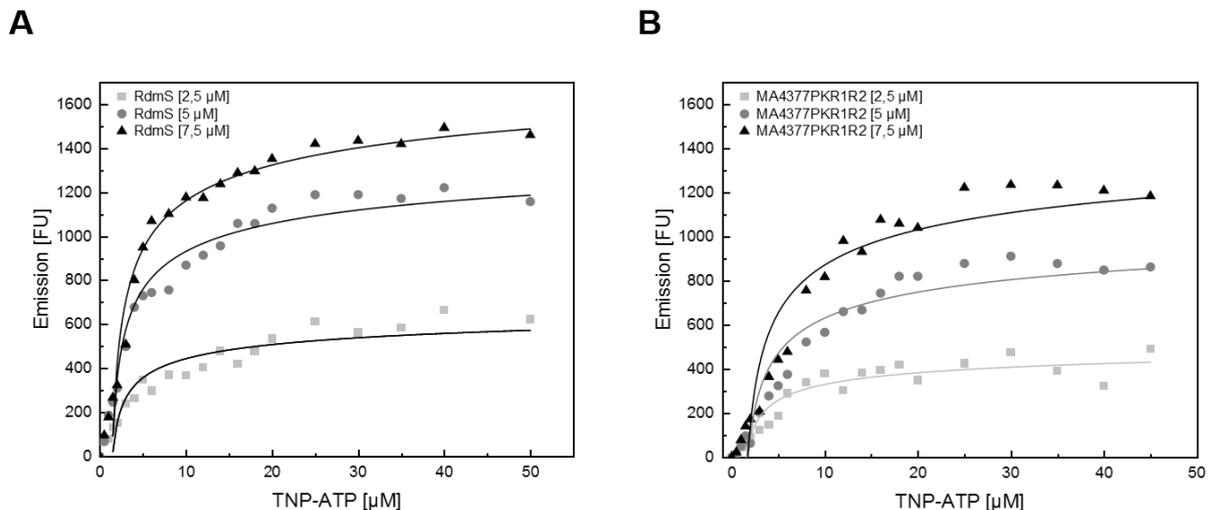


Abbildung 41. Fluoreszenz-basierte Titration von RdmS und MA4377PKR1R2 mit TNP-ATP. (A) Fluoreszenz-basierte Titration von RdmS mit TNP-ATP. (B) Fluoreszenz-basierte Titration von MA4377PKR1R2 mit TNP-ATP. Zu einer konstanten Konzentration RdmS (2,5 μM , 5 μM und 7,5 μM) und MA4377PKR1R2 (2,5 μM , 5 μM , 7,5 μM) wurden variable Konzentrationen an TNP-ATP (0-50 μM) hinzutitriert und ein Fluoreszenzemissionspektrum mit dem Fluoreszenzspektrometer FP-8300 (Jasco) detektiert. Die Anregungswellenlänge betrug 410 nm und die Fluoreszenz wurde als Maximum bei 541 nm bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von drei unabhängigen Replikaten. Die Linien beschreiben das und an die experimentellen Daten angepasste Kurvenmodell, aus dem mithilfe der Solver-Funktion von Microsoft Excel der K_D -Wert berechnet wurde.

Verteilung von Histidinkinasen in archaeellen Taxa

Tabelle 17. Verteilung von Histidinkinasen in den wesentlichen archaeellen Taxa. Modifiziert nach Galperin *et al.*, 2018.

Phylum	Anzahl der Genome	Histidinkinasen
DPANN	4	1
Crenarchaeota	44	-
Korarchaeota	1	-
Thaumarchaeota	16	175
Euryarchaeota	150	1963
Archaeoglobi	7	4
Halobacteria	35	745
Methanobacteria	17	140
Methanococci	12	19
Methanopyri	1	-
Thermococci	25	17
Thermoplasmata	11	3
Unclassifizierte Euryarchaeota	3	4
Methanomicrobia	39	998
- Methanocella arvoryzae MRE50		45
- Methanocella conradii HZ254		19
- Methanocella paludicola SANAE		51
- Methanococcoides burtonii DSM 6264		26
- Methanococcoides methylutens MM1		27
- Methanocorpusculum labreanum Z		1
- Methanoculleus bourgensis MS2		14
- Methanoculleus marisnigri JR1		24
- Methanoculleus sp. MAB1		1
- Methanofollis liminatans DSM 4110		17
- Methanohalobium evestigatum Z-7303		28
- Methanohalophilus halophilus strain Z-7982		26
- Methanohalophilus mahii DSM 5219		22
- Methanolacinia petrolearia DSM 11571		32
- Methanobolus psychrophilus R15		36
- Methanomethylovorans hollandica DSM 15978		11
- Methanoplanus limicola DSM 2279		32
- Methanoregula bonnei 6A8		30
- Methanoregula formicica		30
- Methanosaeta concilii G6		8
- Methanosaeta harundinacea		2
- Methanosaeta thermophila PT		7
- Methanosalsum zilinaea		28
- Methanosarcina acetivorans C2A		51
- Methanosarcina bakeri str. fusaro		25
- Methanosarcina hobonensis		67
- Methanosarcina lacustris		18
- Methanosarcinamazei Go1		33

Phylum	Anzahl der Genome	Histidinkinasen
- Methanosarcina siciliae		43
- Methanosarcina sp. 795		15
- Methanosarcina sp. Kolksee		21
- Methanosarcina sp. MTP4		28
- Methanosarcina sp. WH1		22
- Methanosarcina sp. WWM596		22
- Methanosarcina thermophila CHTI-55		21
- Methanosarcina voculata Z-761		22
- Methanospaerula palustris E1-9c		33
- Methanospirillum hungatei JF-1		46

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Loriana Blasius

UNIVERSITÄTS- & SCHULAUSBILDUNG

01/2017 – 04/2022 Doktorandin in der Arbeitsgruppe „Mikrobiologie“ von Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel an der TU Kaiserslautern

01/2020 – 06/2020 Mutterschutz und Elternzeit

10/2014 – 09/2016 Master „Microbial and Plant Biotechnology“ an der TU Kaiserslautern

Masterarbeit: Untersuchung des Regulators MsrG als Teil eines Zwei-Komponenten-Systems aus *M. acetivorans*

Abschluss: Master of Science Note 1.2

10/2011 – 09/2014 Bachelor „Biowissenschaften“ an der TU Kaiserslautern

Bachelorarbeit: Molekulare Analysen zu einem Citrattransporter aus *C. limon*

Abschluss: Bachelor of Science Note 2.1

08/2009 – 06/2011 Berufliches Oberstufengymnasium BZZ Völklingen

Fachrichtung Biotechnologie

TÄTIGKEITEN WÄHREND DES STUDIUMS & BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

Seit 05/2022 Stellv. Arbeitsbereichsleitung Wasserhygiene und molekulare Epidemiologie am Institut für Hygiene und Infektionsschutz beim Landesuntersuchungsamt in Koblenz

07/2017-12/2020 Wissenschaftliche Hilfskraft an der TU Kaiserslautern

Abteilung Mikrobiologie

10/2012-10-2016 Mitglied des Fachschaftsrats Biologie der TU Kaiserslautern

04/2015-02-2016 Mitglied des Prüfungsausschuss Biologie der TU Kaiserslautern

04/2013-04/2014	Mitglied des Fachbereichsrats Biologie der TU Kaiserslautern
04/2014-06/-2014	Studentische Hilfskraft an der TU Kaiserslautern
10/2013-12/2013	Abteilung Pflanzenphysiologie

STIPENDIEN, FÖRDERUNGEN UND MITGLIEDSCHAFTEN

07/2020 – 12/2020	Promotionsstipendium der Technischen Universität Kaiserslautern
07/2017 – 07/2020	Promotionsstipendium der Carl-Zeiss-Stiftung
07/2018 – 08/2018	Mobilitätsförderung des TU-Nachwuchsrings – GRC One Carbon- Metabolism 2018, Newry Maine, USA
Seit 01/2017	Mitglied der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)

Konferenzteilnahmen

Vorträge

Loriana Blasius (2019) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. RLP Mikrobiologie Symposium, Kaiserslautern, Deutschland, kein Tagungsband.

Loriana Blasius und Prof. Nicole Frankenberg-Dinkel (2018) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. 19th Frankfurt Meeting on Genome function and gene regulation in *Archaea*, Schmittgen, Deutschland, kein Tagungsband.

Loriana Blasius und Prof. Nicole Frankenberg-Dinkel (2018) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg, Deutschland, Tagungsband S. 49.

Loriana Blasius (2017) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. Fachbereichsseminar Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern, Thallichtenberg, Deutschland, kein Tagungsband.

Poster

Loriana Blasius und Prof. Nicole Frankenberg-Dinkel (2019) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Mainz, Deutschland, Tagungsband S. 87.

Loriana Blasius und Prof. Nicole Frankenberg-Dinkel (2018) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. EMBO Workshop - Molecular Biology of *Archaea*: From mechanisms to ecology, Wien, Österreich, kein Tagungsband.

Loriana Blasius und Prof. Nicole Frankenberg-Dinkel (2018) Regulation of the *mtsDFH*-genes from *Methanosarcina acetivorans* as a paradigm of archaeal signal transduction. Gordon Research Conference - Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism, Newry, Maine, USA, kein Tagungsband.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Benutzung anderer als angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind ausnahmslos als solche kenntlich gemacht. Die Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der TU Kaiserslautern ist mir in der derzeit gültigen Fassung bekannt. Die Ergebnisse anderer Mitarbeiter sowie anderer Autoren wurden klar gekennzeichnet. Die Dissertation oder Teile daraus wurden in keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Fakultät als Prüfungsarbeit eingereicht. Ich habe zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Universität ein Promotionsverfahren beantragt.

Kaiserslautern, den 24.09.2022

Loriana Blasius