

**Funktionelle Analyse des essentiellen
Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems
CgtSR4 aus *Corynebacterium glutamicum***

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

**zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Mirja Wessel
aus Dinslaken**

**Jülich
2003**

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. M. Bott
Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 2003

Abstract

Corynebacterium glutamicum is an aerobic gram-positive soil bacterium used for large scale production of amino acids, mainly L-glutamate and L-lysine. Genome sequence analysis revealed the presence of 13 two-component regulatory systems. In this thesis, one of these systems, composed of the sensor kinase CgtS4 and the response regulator CgtR4, was characterized in order to get information about its function. The following results were obtained:

1. Hydrophobicity plots indicated that the N-terminus (amino acids 4-21) of the sensor kinase CgtS4 is very hydrophobic and possibly forms a transmembrane helix. A second region of lower hydrophobicity (amino acids 43-63) has a strongly amphiphilic character and might form a membrane-associated helix. Using peptide antibodies it was confirmed that CgtS4 is located in the membrane fraction of *C. glutamicum* cells.
2. The characteristic features of two-component systems could be demonstrated *in vitro* for CgtS4/CgtR4: CgtS4 purified by means of a carboxyterminal His- or Strep-tag showed autokinase activity and transferred the γ -phosphoryl group of ATP rapidly to the purified response regulator CgtR4.
3. A deletion of the *cgtSR4* genes from the chromosome was only possible in the presence of plasmid-borne functional *cgtSR4* or *cgtR4*. The conclusion derived from these results that *cgtR4* but not *cgtS4* is essential for *C. glutamicum* could be confirmed by the successful deletion of the chromosomal *cgtS4* gene. The fact that a deletion of the chromosomal *cgtSR4* genes was possible in the presence of a plasmid-encoded CgtR4 protein with an D52N exchange led to the conclusion that CgtR4 is active in its unphosphorylated state.
4. The genes *cgtSR4* are located directly downstream of the *pgm* gene encoding the glycolysis enzyme phosphoglycerate mutase, indicating that *pgm* expression might be regulated by the CgtS4/CgtR4 system. However, transcriptome analyses failed to reveal such a regulation.
5. Genome-wide transcriptome analyses using DNA microarrays indicated that CgtSR4 is involved in the response to two different types of stress, i.e. phosphate starvation and oxidative stress. Possibly, CgtS4/CgtR4 functions as a global regulatory system in different stress situations or even triggers a general stress response. So far, no direct target gene of the response regulator CgtR4 could be identified.

Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG	2
1	Zweikomponenten-Systeme in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	3
2	Vorkommen von Zweikomponenten-Signaltransduktionssystemen	3
3	Aufbau und Wirkungsweise von Zweikomponenten-Systemen	4
4	Funktionelle und strukturelle Eigenschaften von Sensorkinasen	6
5	Funktionelle und strukturelle Eigenschaften von „Response“-Regulatoren	7
6	Ziel der Arbeit	11
III	MATERIAL UND METHODEN	12
1	Chemikalien und Enzyme	12
2	Bakterienstämme und Plasmide	12
2.1	Plasmidkonstruktionen	17
3	Oligonukleotide	25
4	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	27
4.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für <i>E. coli</i>	27
4.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für <i>C. glutamicum</i>	28
4.3	Messung des Wachstums von Bakterienkulturen	29
4.4	Expressionskulturen in <i>E. coli</i>	29
4.5	Stammhaltung von Bakterien	30
5	Molekularbiologische Methoden	30
5.1	Isolierung von DNA	30
5.1.1	Plasmidisolierung	30
5.1.2	Isolierung chromosomaler DNA	30
5.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
5.2	DNA-Reinigung	31
5.2.1	Reinigung von PCR-Produkten	31
5.2.2	Ethanol-fällung	31
5.2.3	Isopropanol-fällung	31
5.3	Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	32
5.4	Restriktion	32
5.5	5'-Dephosphorylierung gespaltener Plasmid-DNA	32
5.6	Auffüllreaktion mit Hilfe der „Klenow-Polymerase“	33

5.7	Agarose-Gelelektrophorese	33
5.8	Ligation	34
5.9	Transformationstechniken	34
5.9.1	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	34
5.9.2	Transformation von <i>C. glutamicum</i> mittels Elektroporation	34
5.10	Radioaktive Markierung von DNA	35
5.11	Southern-Blot Hybridisierung	35
5.12	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion	37
5.13	Kolonien-PCR	38
5.14	Ortsspezifische Mutagenese	39
5.15	DNA-Sequenzanalyse	41
5.16	Konstruktion von Deletionsmutanten	42
6	Biochemische Methoden	43
6.1	Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle und Zellfraktionierung	43
6.2	Zellaufschluss mit Amalgamator und Zellfraktionierung	44
6.3	Solubilisierung von CgtS4 aus <i>E. coli</i> -Membranen	45
6.4	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	45
6.4.1	Affinitätschromatographie mittels Ni ²⁺ -Nitrilotriacetic-Acid (NTA)-Agarose	45
6.4.2	Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz	46
6.4.3	Affinitätschromatographie mittels StrepTactin-Sepharose	46
6.4.4	Affinitätsreinigung von putativen Targetgenen von CgtSR4 mittels Dynabeads [®] Streptavidin	47
6.5	Pufferaustausch mit Hilfe von PD-10-Säulen (Pharmacia)	48
6.6	Proteinbestimmung	49
6.6.1	Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	49
6.6.2	Proteinbestimmung nach dem Bio-Rad Protein Assay	49
6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
6.8	Färbung von Gelen mit kolloidalem Coomassie (Pierce)	51
6.9	Western-Blot	51
6.10	Phosphorylierungs-Experimente	52
6.11	Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität zur Analyse der transkriptionellen Aktivität spezifischer Promotor-Fusionen	52
6.12	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen CgtR4	54
6.13	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	54

6.13.1	Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie	54
6.13.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	55
7	Analyse von DNA-Protein-Interaktionen	55
7.1	Gelretardationsexperimente	55
8	Genexpressionsanalysen	56
8.1	Isolierung von Gesamt-RNA	56
8.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	57
8.3	DNA-Chip-Technologie	58
8.4	Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips	58
8.5	DNA-Chip-Hybridisierung	59
8.6	Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips	60
8.7	Auswertung von DNA-Chips	61
IV	ERGEBNISSE	63
1	Identifizierung und Charakterisierung der Gene des Zweikomponenten-Systems CgtSR4 aus <i>C. glutamicum</i>	63
2	Computergestützte Topologieanalysen der Sensorkinase CgtS4	67
3	Lokalisation der Sensorkinase CgtS4 in <i>C. glutamicum</i> 13032	70
4	<i>In vitro</i> Charakterisierung des Zweikomponenten Systems CgtSR4	72
4.1	Reinigung der Sensorkinase CgtS4 und eines verkürzten Derivats durch Affinitätschromatographie	73
4.2	Überproduktion und Reinigung von MalE-CgtS4kin	75
4.3	Überproduktion und Reinigung von CgtR4 mittels Ni-NTA- und StrepTactin-Affinitätschromatographie	77
4.3.1	Reinigung von CgtR4-His	77
4.3.2	Reinigung von CgtR4-Strep	79
4.4	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von CgtS4 und CgtR4	79
4.4.1	Phosphorylierung von CgtS4-His und CgtR4-Strep	79
4.4.2	Phosphorylierung von MalE-CgtS4kin und CgtR4-His	81
5	Versuche zur Deletion von <i>cgtSR4</i> aus dem Chromosom von <i>C. glutamicum</i>	82
5.1	Konstruktion und Charakterisierung der <i>cgtSR4</i> -Deletionsmutante	82
5.1.1	Konstruktion eines Plasmids zur kontrollierten Expression von <i>cgtSR4</i> in <i>C. glutamicum</i>	83
5.1.2	Konstruktion der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> 13032 Δ <i>cgtSR4</i> /pXMJ19CgtR4	85

5.1.2.1	Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten <i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ und 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$	86
5.2	Konstruktion der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta cgtS4$	87
5.2.1	Wachstumsverhalten der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta cgtS4$	88
5.3	Konstruktion der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta cgtSR4$ in Gegenwart von CgtR4-D52N und CgtR4-D52E	88
6	Konstruktion einer konditionalen Mutante	90
6.1	Auswirkungen reduzierter <i>cgtSR4</i> -Expression auf das Wachstumsverhalten von <i>C. glutamicum</i> 13032::pCGEX5KCgtS4	91
7	Identifizierung putativer CgtSR4-regulierter Zielgene	92
7.1	Untersuchungen zur Regulation des <i>pgm</i> -Gens durch CgtSR4	92
7.2	Bindungsassay zur Identifizierung CgtR4-regulierter Gene mittels Dynabeads [®] Streptavidin	93
7.3	Suche nach Zielgenen von CgtR4 mittels globaler Genexpressionsanalysen	96
7.3.1	Transkriptom-Vergleich von <i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ und <i>C. glutamicum</i> 13032/pXMJ19 bei Wachstum in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat als C-Quelle	96
7.3.1.1	Unabhängige Überprüfung der DNA-Chip-Analysen mittels Transkriptions- fusionen	101
7.3.2	Vergleich der Genexpression von <i>C. glutamicum</i> 13032 und <i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta cgtS4$ bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium	102
8	DNA-Bindungsstudien	106
V	DISKUSSION	109
1	Biochemische Charakterisierung von CgtS4 und CgtR4	109
1.1	Lokalisation der Sensorkinase CgtS4	109
1.2	Aufreinigung verschiedener Derivate von CgtS4 und CgtR4	110
1.3	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von CgtS4 und CgtR4	112
2	Die Essentialität des Zweikomponenten-Regulationssystems CgtSR4 aus <i>C. glutamicum</i>	113
3	Mögliche Regulation des <i>pgm</i>-Gens durch das CgtSR4-System	116
4	Homologe Zweikomponenten-Regulationssysteme zu CgtSR4 aus <i>C. glutamicum</i>	117
5	Suche nach putativen Targetgenen von CgtSR4	118

5.1	Versuch zur Identifizierung putativer Targetgene mit Hilfe eines DNA-Bindungsassay	118
5.2	Versuch zur Identifizierung putativer Targetgene mittels globaler Genexpressionsanalysen	119
6	Schlussfolgerung	124
VI	LITERATUR	129

Abkürzungen

a	Jahr
A	Absorption; Adenin; Ampère
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bidest. H ₂ O	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
d	Dicke der Küvette, Desoxy-
dd	Didesoxy-
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTNB	5,5'-Dithionitrobenzoesäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	Gegebenenfalls
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde(n)
HABA	4'-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HTH	Helix-Turn-Helix
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
k	Kilo
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDAO	Lauryldimethylamin-N-Oxid
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
m	milli- (10 ⁻³)

M	molar (mol/l)
M _r	relatives Molekulargewicht
min	Minute(n)
mol	Mol(e) ($6,023 \times 10^{23}$)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ORF	das von einem <i>orf</i> kodierte Protein
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit; Tonnen
T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur der DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
TFA	Trifluoressigsäure
TNI	Tris-NaCl-Imidazol-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactosid

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

I ZUSAMMENFASSUNG

Das Zweikomponenten-Regulationssystem bestehend aus der Sensorkinase CgtS4 und dem „Response-Regulator“ CgtR4 wurde im Rahmen der Genomsequenzierung von *Corynebacterium glutamicum* identifiziert. In der vorliegenden Arbeit sollten durch biochemische, genetische und physiologische Untersuchungen Hinweise auf die Funktion des CgtS4/CgtR4-Systems gewonnen werden. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Hydrophobizitätsstudien zeigten, dass der postulierte N-Terminus (Aminosäuren 4-21) der Sensorkinase CgtS4 sehr hydrophob ist und wahrscheinlich eine Transmembranhelix in der Cytoplasmamembran bildet. Ein zweiter Bereich von mäßig hoher Hydrophobizität (Aminosäuren 43-63) könnte aufgrund seines stark amphiphilen Charakters eine membranassoziierte Helix darstellen. Mit Peptid-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass CgtS4 wie erwartet in der Membranfraktion von *C. glutamicum*-Zellen lokalisiert ist.
2. Sowohl die vollständige Sensorkinase CgtS4 als auch die an das Maltose-Bindeprotein fusionierte Kinase-Domäne besaßen nach Aufreinigung konstitutive Autokinase-Aktivität und übertrugen die γ -Phosphorylgruppe von ATP auf den gereinigten Response-Regulator CgtR4.
3. Die chromosomalen *cgtSR4*-Gene konnten nur in einem Stamm deletiert werden, der die Gene *cgtSR4* oder *cgtR4* Plasmid-kodiert exprimiert. Die daraus resultierende Schlussfolgerung, dass *cgtR4*, nicht aber *cgtS4* für *C. glutamicum* essentiell ist, konnte durch die Deletion des chromosomalen *cgtS4*-Gens bestätigt werden. Der Befund, dass die chromosomalen *cgtSR4*-Gene auch in Gegenwart von CgtR4-D52N deletiert werden konnten, führte zu der Annahme, dass CgtR4 in seiner unphosphorylierten Form aktiv ist.
4. Die Lokalisation der *cgtSR4*-Gene direkt stromabwärts des Phosphoglyceratmutase-Gens (*pgm*) deutete auf eine transkriptionelle Regulation dieses Glykolyse-Enzyms durch das CgtS4/CgtR4-System hin. Eine Plasmid-vermittelte konstitutive Expression des *pgm*-Gens ermöglichte jedoch nicht die Deletion der chromosomalen *cgtSR4*-Gene. Auch Transkriptomanalysen sprachen gegen eine Regulation der *pgm*-Expression durch CgtS4/CgtR4.
5. Genomweite Transkriptionsanalysen mit DNA-Chips deuteten darauf hin, dass CgtSR4 an der Reaktion auf zwei verschiedene Stresstypen beteiligt sein könnte, nämlich Phosphatmangel und oxidativem Stress. Möglicherweise agiert CgtS4/CgtR4 als globales Regulationssystem bei verschiedenen Stresssituationen oder löst sogar eine generelle Stressantwort aus. Ein direktes Zielgen konnte bisher nicht identifiziert werden.

II EINLEITUNG

Im Jahre 1957 wurde das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* erstmals von Kinoshita *et al.*, 1957 aus Bodenproben isoliert und zwar bei der Suche nach Bakterien, die Glutamat ausscheiden. Dieses apathogene Bakterium, das einen GC-Gehalt von 54 mol% hat, gehört zur phylogenetischen Gruppe der Actinomyceten und besitzt eine stäbchen- bis keulenförmige Gestalt (2 μ M). Es ist unbeweglich, bildet keine Sporen und ist Biotin-auxotroph. Bei Biotin-Mangel scheidet der Wildtyp signifikante Mengen an L-Glutamat aus. Später wurden auch Mutantenstämme selektioniert, die sehr effizient L-Lysin sekretieren. Aufgrund dieser Eigenschaften besitzt *C. glutamicum* eine herausragende Bedeutung bei der großtechnischen biotechnologischen Produktion von Aminosäuren (Eggeling und Sahm, 1999). Diese Bedeutung wird auch daran deutlich, dass das 3308 kb große Genom dieses Bakteriums in den letzten Jahren unabhängig voneinander durch vier Industrie-Unternehmen sequenziert wurde. Derzeit werden mit *C. glutamicum* rund 1.000.000 t/a L-Glutamat und ca. 400.000 t/a L-Lysin in fermentativen Verfahren hergestellt (Eggeling *et al.*, 2001; Leuchtenberger, 1996). Während L-Glutamat vorwiegend in Form des Natrium-Salzes Anwendung als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie findet (Yoshinaga und Nakamori, 1983), dient L-Lysin hauptsächlich als Futtermitteladditiv zur Aufwertung von pflanzlichen Proteinen. Neben seiner biotechnologischen Nutzung gewinnt *C. glutamicum* zunehmend an Bedeutung als Modellorganismus für die *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*-Gruppe von Bakterien, die in ihrer Zellwand Mycolsäuren enthalten. Dazu gehören eine Reihe wichtiger pathogener Spezies wie z. B. *Corynebacterium diphtheriae* und *Mycobacterium tuberculosis*.

Die bisherigen Arbeiten mit *C. glutamicum* beschäftigten sich vorwiegend mit den Aminosäure-Biosynthesewegen, dem Zentralstoffwechsel, den anaplerotischen Reaktionen, den Kohlenstoff- und Stickstoff-Flüssen sowie dem Aminosäure-Transport (Eggeling und Sahm, 1999; Sahm *et al.*, 1995). Demgegenüber gibt es relativ wenige Untersuchungen zu globalen Regulations- und Anpassungsmechanismen (Burkovski, 2003), obwohl das Wissen darüber sicherlich auch von großem praktischem Interesse ist, indem es beispielsweise zur Optimierung der Fermentationsbedingungen genutzt werden kann.

Die meisten Mikroorganismen leben in einer Umgebung mit ständig wechselnden Bedingungen. Nährstoff- und Toxinkonzentrationen, pH-Wert, Temperatur, Osmolarität und viele andere Faktoren können sich sehr schnell verändern. Um zu überleben, muss die Zelle ständig die äußeren Bedingungen registrieren und entsprechend ihre Struktur, Physiologie und Verhaltensweise anpassen. Das bedeutet, Mikroorganismen müssen in der Lage sein,

Veränderungen ihrer Umgebung zu detektieren, um in geeigneter Weise darauf zu reagieren. Ein effizientes Netzwerk von Regulationssystemen ermöglicht dieses adaptive Verhalten. In Mikroorganismen existieren verschiedene signaltransduzierende Systeme, wie z. B. das Phosphoenolpyruvat-abhängige Kohlenhydrat:Phosphotransferase-System (PTS) (McEvoy und Dahlquist, 1997; Postma *et al.*, 1993), das methylakzeptierende Chemotaxis-System (Grebe und Stock, 1998; Hazelbauer *et al.*, 1993) und Zweikomponenten-Regulationssysteme (Goudreau und Stock, 1998; Stock *et al.*, 2000). In dem unbeweglichen *C. glutamicum* ist das Chemotaxis-System natürlich nicht vorhanden, es gibt jedoch die Komponenten des PTS-Systems (Parche *et al.*, 2001) sowie eine Reihe von Zweikomponenten-Systemen.

1 Zweikomponenten-Systeme in *Corynebacterium glutamicum*

Im Genom von *C. glutamicum* wurden durch Sequenzvergleiche 13 Zweikomponenten-Regulationssysteme identifiziert. Die Gene für Sensorkinase und „Response“-Regulator sind in allen Fällen unmittelbar benachbart im Chromosom lokalisiert. Hydrophobizitätsanalysen deuten darauf hin, dass alle Sensorkinasen Membran-gebunden sind. Alle Antwortregulatoren bestehen aus einer „Receiver“-Domäne und einer Effektor-Domäne mit einem „Helix-Turn-Helix“-Motiv, was auf eine DNA-bindende Funktion dieser Regulatoren schließen lässt. Bisher wurden vier Systeme funktionell charakterisiert, nämlich das CitA/CitB-System, das MtrA/MtrB-System, das PhoS/PhoR-System und das CgtS9/CgtR9-System. Die Funktion und die Signale aller weiteren neun Zweikomponenten-Systeme sind bisher völlig unbekannt. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung eines dieser Systeme beschäftigt, werden Zweikomponenten-Regulationssysteme im folgenden detailliert vorgestellt.

2 Vorkommen von Zweikomponenten-Signaltransduktionssystemen

Die ersten Zweikomponenten-Systeme wurden in Eubakterien identifiziert, inzwischen konnten sie aber auch in Archaea (z. B. *Methanobacterium thermoautotrophicum*, (Smith *et al.*, 1997)) und einigen Eukaryonten nachgewiesen werden, wie z. B. in *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Neurospora crassa* und *Arabidopsis thaliana* (Hwang *et al.*, 2002; Loomis *et al.*, 1997; Loomis *et al.*, 1998; Posas *et al.*, 1998; Santos und Shiozaki, 2001). Im Gegensatz zu Eukaryonten sind Zweikomponenten-Systeme in Bakterien sehr weit verbreitet, wenn auch nicht ubiquitär. In *E. coli* MG1655 wurden 30 Sensorkinasen und 32 Antwortregulatoren identifiziert (Mizuno, 1997), womit sie zu den zahlenmäßig dominierenden Regulationssystemen in diesem Mikroorganismus gehören. In dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* konnten 36 Sensorkinasen und 34 Antwortregulatoren nachgewiesen werden, in dem Cyanobakterium *Synechocystis* 42 Histidin-Kinasen und 38

Antwortregulatoren (Fabret *et al.*, 1999; <http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget.html>; Mizuno *et al.*, 1996). Die Anzahl an Zweikomponenten-Systemen in verschiedenen Bakterien-Spezies variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Vielseitigkeit ihres Stoffwechsels und ihrer Nährstoffverwertung und somit von der Fähigkeit, in verschiedenen Umgebungen leben zu können. So besitzt das humanpathogene Bakterium *Haemophilus influenzae*, das auf Warmblütler spezialisiert ist, nur vier Sensorkinasen und fünf Antwortregulatoren (Fleischmann *et al.*, 1995). In *Mycoplasma genitalium*, einem obligaten Parasiten, der ausschließlich im Genitalbereich vorkommt, existiert kein einziges Zweikomponenten-System (Fraser *et al.*, 1995). Das Genom von *Pseudomonas aeruginosa*, einem ubiquitär verbreiteten Bakterium, das pathogen für Mensch, Tier und Pflanze sein kann, enthält Gene für 63 Sensorkinasen und 64 Antwortregulatoren (Rodrigue *et al.*, 2000; <http://ir2lcb.cnrs-mrs.fr/Pa2Cdb/>; Stover *et al.*, 2000).

3 Aufbau und Wirkungsweise von Zweikomponenten-Systemen

Ein typisches Zweikomponenten-Regulationssystem besteht aus einer Histidin-Proteinkinase, die einen konservierten Kinase-Anteil enthält, und einem Antwortregulator-Protein („Response“-Regulator), das eine konservierte regulatorische Domäne besitzt. Zusammen bilden diese beiden Komponenten ein signaltransduzierendes System, das die freie Energie der ATP-Hydrolyse für die Signalweiterleitung benutzt. Sowohl die Histidin-Kinase als auch der Antwortregulator sind durch ihre „Modulbauweise“ gekennzeichnet und bestehen in den meisten Fällen aus je zwei Domänen (siehe Abb. 1A). Diese vier charakteristischen Domänen bilden das Rückgrat des Signaltransduktionsweges. Durch zahlreiche Kombinationen der verschiedenen Module entstehen erweiterte und komplexere Regulationsnetzwerke wie beispielsweise sogenannte „Phosphorelay“-Systeme. Die Reaktion einer „Phosphorelay“-Kaskade ist dadurch gekennzeichnet, dass die Phosphorylierung nicht in zwei sondern in vier Schritten erfolgt ($\text{HK-His}_I \rightarrow \text{HK-His}_I\sim\text{P} \rightarrow \text{RR-Asp}_I\sim\text{P} \rightarrow \text{HPt-His}_{II}\sim\text{P} \rightarrow \text{RR-Asp}_{II}\sim\text{P}$) (siehe Abb. 1B) (Stock *et al.*, 2000).

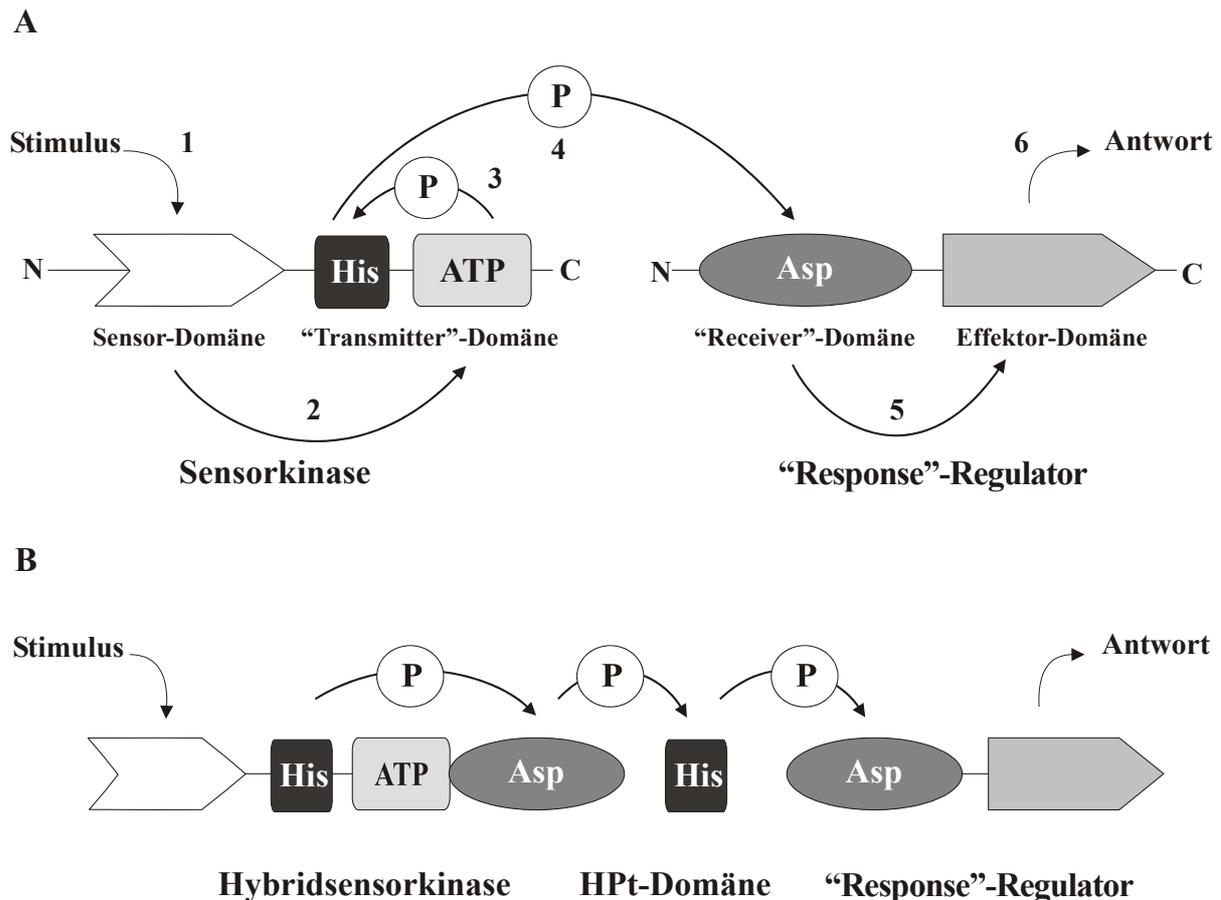


Abb. 1: A Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch Zweikomponenten-Regulationssysteme und ihrer modularen Organisation. 1, Erkennung eines Stimulus; 2, Konformationsänderung; 3, Transautophosphorylierung eines spezifischen Histidin-Restes des Sensor-Dimers; 4, Phosphorylgruppen-Transfer auf einen spezifischen Aspartat-Rest; 5, Konformationsänderung; 6, Auslösen einer Antwort. **B** Die vier charakteristischen Module eines Zweikomponenten-Regulationssystems können zu einem erweiterten „Phosphorelay“-System kombiniert werden. Dieses System nutzt eine Hybridsensorkinase, die neben den zwei charakteristischen Domänen einer Histidin-Kinase zusätzlich eine „Receiver“-Domäne enthält, eine separate HPT-Domäne und einen „Response“-Regulator.

Die Erkennung eines externen Stimulus durch die Sensorkinase löst eine Phosphorylierungskaskade aus (siehe Abb. 1A). Zuerst wird die γ -Phosphorylgruppe von ATP durch die Sensorkinase auf einen konservierten Histidin-Rest der Kinase übertragen. Die Sensorkinase zeigt somit Autokinase-Aktivität. Anschließend katalysiert vermutlich der Antwortregulator den Transfer der Phosphorylgruppe vom Histidin-Rest des Sensors auf einen konservierten Aspartat-Rest innerhalb der eigenen regulatorischen Domäne. Der Phosphorylgruppen-Transfer resultiert meistens in der Aktivierung der C-terminalen Effektor-Domäne, was zur Expression bestimmter Zielgene oder zur Modulation des Zellverhaltens führen kann. Schließlich wird die Phosphorylgruppe vom Aspartat-Rest auf Wasser übertragen. Alle drei Reaktionen, die am Transfer der Phosphorylgruppe beteiligt sind (Autophosphorylierung, Phosphotransfer und Dephosphorylierung) benötigen divalente Metall-

ionen, höchstwahrscheinlich Mg^{2+} (Bourret *et al.*, 1991; Parkinson und Kofoid, 1992; Robinson *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 1995).

4 Funktionelle und strukturelle Eigenschaften von Sensorkinasen

Die meisten Sensorkinasen sind Membran-gebundene Proteine. Die Erkennung von Reizen durch die Sensor-Domäne(n) kann extrazellulär und/oder intrazellulär erfolgen. Bei den weitaus meisten Sensorkinasen ist der primäre Stimulus und der Mechanismus der Reizerkennung jedoch noch unbekannt. Die verschiedenen Sensor-Domänen zeigen wenig Sequenzhomologie untereinander, entsprechend der unterschiedlichen Reize, die von ihnen erkannt werden. Extrazelluläre Stimuli werden durch die N-terminale periplasmatische Sensor-Domäne der Histidin-Kinase detektiert wie im Fall von CitA (Kaspar *et al.*, 1999). Diese oft ca. 100 – 200 Aminosäure-Reste umfassende Domäne wird meist N- und C-terminal von einer Transmembranhelix flankiert. Intrazellulär folgt der zweiten Transmembranhelix eine Linkerregion von variabler Länge (40 - >180 Aminosäure-Reste) sowie der konservierte Kinase-Anteil. Dieser Aufbau erlaubt es den Proteinen extrazelluläre Stimuli zu registrieren und diese Information in das Innere der Zelle weiterzuleiten. Neben periplasmatischen Sensor-Domänen gibt es aber auch cytoplasmatische Sensormodule, wie z. B. bei der Membran-gebundenen Sensorkinase KdpD. Die zwei Transmembranhelices des Proteins sind für eine korrekte Positionierung der cytosolischen Sensor-Domäne notwendig (Heermann *et al.*, 2003). VirA ist ein Beispiel für eine Sensorkinase, die sowohl extrazelluläre Stimuli (Monosaccharide) als auch interne Reize (phenolische Verbindungen) detektieren kann (Toyoda-Yamamoto *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnten aber auch lösliche, cytoplasmatische Sensorkinasen identifiziert werden, die folglich durch ein intrazelluläres Signal bzw. cytoplasmatische Domänen von Membranproteinen reguliert werden, wie beispielsweise CheA (Bilwes *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 1988). Eine besondere Form der cytoplasmatischen Sensormodule stellen die PAS-Domänen dar, wie im Fall des strukturell untersuchten Sauerstoffsensors FixL aus *Rhizobium meliloti* (Rodgers *et al.*, 1996). Diese Domänen kontrollieren Veränderungen des Lichts, des Redoxpotentials, des Sauerstoffgehalts und kleiner Liganden. Die Spezifität für einen bestimmten Reiz wird in einigen Fällen durch den an die PAS-Domäne assoziierten Cofaktor bestimmt (Taylor und Zhulin, 1999). Die ca. 100 Aminosäure-Reste umfassende PAS-Domäne ist üblicherweise benachbart zur letzten Transmembranhelix der Sensor-Domäne und N-terminal zur Kinase-Domäne lokalisiert. Darüber hinaus gibt es aber auch lösliche Sensorkinasen mit PAS-Domänen, beispielsweise KinA (Burbulys *et al.*, 1991).

Das charakteristische Merkmal von Histidin-Proteinkinasen ist die konservierte Kinase-Domäne, die sich aus zwei separaten Subdomänen zusammensetzt, der Phosphorylierungs-Domäne und der ATP-Bindedomäne. Die Kinase-Domäne umfasst ca. 350 Aminosäure-Reste und ist für die Transautophosphorylierung und die ATP-Bindung verantwortlich. Die Phosphorylierungs-Domäne besitzt eine besonders stark konservierte Region mit dem phosphorylierbaren Histidin-Rest, die sogenannte H-Box, die ATP-Bindedomäne enthält vier stark konservierte Sequenzmotive, die entsprechend der besonders gut konservierten Aminosäure-Reste als N-, F-, G1- und G2-Box bezeichnet werden. Strukturanalysen der beiden Subdomänen des Osmosensors EnvZ aus *E. coli* zeigten, dass die N-, F-, G1- und G2-Box in der Nukleotidbindetasche liegen und an der ATP-Bindung beteiligt sind (Tanaka *et al.*, 1998; Tomomori *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die isolierte Phosphorylierungs-Domäne als Dimer, die ATP-Bindedomäne hingegen als Monomer vorliegt (Park *et al.*, 1998). Die katalytische Domäne besteht hauptsächlich aus einer α/β -„Sandwich“-Faltung, die fünf antiparallele β -Stränge und drei α -Helices enthält. Alle bisher untersuchten Histidin-Kinasen bilden Dimere und die Autophosphorylierung wird *in trans* vollzogen, das heißt, in einer bimolekularen Reaktion katalysiert ein Monomer die Phosphorylierung des konservierten Histidin-Restes des anderen Monomers (Stock *et al.*, 2000).

Aufgrund ihrer Domänenstruktur können Histidin-Kinasen in zwei Klassen eingeteilt werden (Dutta *et al.*, 1999; Tomomori *et al.*, 1999). Bei Histidin-Proteinkinasen des Typs I liegt die Phosphorylierungs-Domäne unmittelbar vor der ATP-Bindedomäne wie z. B. bei dem Osmosensor EnvZ. Bei den Typ II Histidin-Proteinkinasen liegt die Phosphorylierungs-Domäne getrennt von der katalytischen Domäne üblicherweise im N-terminalen Bereich, wie beispielsweise bei der nicht Membran-gebundenen Histidin-Proteinkinase CheA (Mourey *et al.*, 2001), dem bisher einzigen bekannten Vertreter dieser Gruppe. Diese separate Phosphorylierungs-Domäne wird auch als „His-containing phosphotransfer domain“ (HPT) bezeichnet. In vielen „Phosphorelay“-Systemen wie z. B. dem Sporulations-Kontrollsystem in *B. subtilis* liegt die HPT-Domäne auch als separates Protein vor (Spo0B).

5 Funktionelle und strukturelle Eigenschaften von „Response“-Regulatoren

Im Zuge der Signalweiterleitung stellt der Antwortregulator einen intrazellulären Schalter in Zweikomponenten-Systemen dar, der durch Phosphorylierung aktiviert oder inaktiviert wird und eine adaptive Antwort auslösen kann. Der Antwortregulator katalysiert den Transfer einer Phosphorylgruppe vom Histidin-Rest der passenden Sensorkinase auf einen konservierten

Aspartat-Rest in seiner eigenen „Receiver“-Domäne. Diese „Receiver“-Domäne wird auch als Empfänger- oder regulatorische Domäne bezeichnet. Die Tatsache, dass alternativ zu Phosphohistidin auch niedermolekulare Substanzen wie z. B. Acetylphosphat, Carbamylphosphat, Imidazolphosphat oder Phosphoramidat, nicht aber ATP, *in vitro* als Phosphodonoren für die Bildung des Phosphoaspartat-Restes dienen können, deutet darauf hin, dass der Phosphotransfer durch die „Receiver“-Domäne selbst katalysiert wird (Lukat *et al.*, 1992; McCleary und Stock, 1994). Darüber hinaus sind Antwortregulatoren zusätzlich zu ihrer Phosphoryltransferaseaktivität in der Lage ihre Autodephosphorylierung zu katalysieren. In anderen Beispielen wird die Dephosphorylierung durch eine Phosphatase-Aktivität der Sensor kinase katalysiert oder durch ein separates Enzym mit Phosphatase-Aktivität, z. B. CheZ (Silversmith *et al.*, 2003). Die Halbwertszeiten von phosphorylierten Antwortregulatoren können einige Sekunden bis hin zu mehreren Stunden umfassen, da sich die Phosphatase-Aktivität des Regulators selbst und der beteiligten Phosphatasen sehr stark unterscheiden. So ist die Phosphorylierung des Antwortregulators CheY transient (Hess *et al.*, 1988), die Dephosphorylierung durch CheZ erfolgt innerhalb weniger Sekunden, dagegen besitzt der isolierte Antwortregulator VanR eine Halbwertszeit von ca. 10 h (Wright *et al.*, 1993). Neben Phosphoaspartat-Phosphatasen gibt es auch Phosphohistidin-Phosphatasen. Das *E. coli* SixA-Protein ist die erste identifizierte prokaryotische Phosphohistidin-Phosphatase, die an der Dephosphorylierung eines His-Asp-Regulationssystems beteiligt ist. SixA dephosphoryliert die HPT-Domäne von ArcB, einer Hybrid-Sensor kinase des *E. coli* ArcAB-Systems (Matsubara und Mizuno, 2000). Ebenso wie Histidin-Proteinkinasen zeigen Antwortregulatoren einen modularen Aufbau. Ein typischer Antwortregulator besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen konservierten „Receiver“-Domäne (ca. 120 Aminosäure-Reste) und einer C-terminalen variablen Effektor-Domäne. Beide Domänen sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden. Die Mehrheit der Antwortregulatoren fungiert als Transkriptionsregulatoren, daher enthält die Effektor-Domäne meist ein Helix-Turn-Helix-Motiv. Aber nicht alle Antwortregulatoren besitzen eine DNA-bindende Domäne. Einige Effektor-Domänen wirken auch als Enzyme wie z. B. die an der Chemotaxis beteiligte Methylsterase CheB oder die Phosphodiesterase RegA aus *Dictyostelium* (Shauly *et al.*, 1998; Stock und Levit, 2000; Thomason *et al.*, 1998).

Antwortregulatoren können in zwei Klassen unterteilt werden (Fiedler und Weiss, 1995). Bei Antwortregulatoren der Klasse I, zu der beispielsweise NtrC, PhoB oder CitB (Meyer *et al.*, 1997; Sola *et al.*, 1999) gehören, ist die Aktivität der Proteine abhängig von der phosphorylierten Empfänger- und der Effektor-Domäne. Die Phosphorylierung kann für eine

Dimerisierung des Proteins notwendig sein, die im unphosphorylierten Zustand inhibiert ist (z. B. im Fall von PhoB (McCleary, 1996)), einen höheren Grad der Oligomerisierung bewirken (z. B. im Fall von NtrC (Wyman *et al.*, 1997)) oder für Interaktionen mit anderen Proteinen nötig sein (z. B. im Fall von CheY (Blat und Eisenbach, 1994; Welch *et al.*, 1993)). Zur Klasse II gehören Antwortregulatoren wie beispielsweise FixJ und CheB, bei denen die unphosphorylierte „Receiver“-Domäne die Aktivität der Effektor-Domäne inhibiert. Diese Antwortregulatoren können durch Deletion der N-terminalen „Receiver“-Domäne aktiviert werden, das heißt, die isolierte Effektor-Domäne ist konstitutiv aktiv (Huala *et al.*, 1992; Kahn und Ditta, 1991). Anhand der Kristallstrukturen von unphosphoryliertem NarL (Baikalov *et al.*, 1996) und von unphosphoryliertem CheB (Djordjevic *et al.*, 1998) konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindungsstelle bzw. das aktive Zentrum der Effektor-Domäne tatsächlich durch die unphosphorylierte Empfänger-Domäne blockiert ist. In beiden Proteinen scheint die durch Phosphorylierung induzierte Aktivierung durch eine Repositionierung der N- und C-terminalen Domänen ausgelöst zu werden. Dies unterstützt den vorgeschlagenen Mechanismus der Klasse II-Proteine. Ein außergewöhnliches Verhalten zeigen die Antwortregulatoren HoxA, HupR und ArgB, die im Gegensatz zu den bisher bekannten „Response“-Regulatoren nur in ihrem unphosphorylierten Zustand aktiv sind. Während die Aktivität von HoxA und HupR durch Phosphorylierung inhibiert wird, konnte für ArgB keine regulatorische Kontrolle nachgewiesen werden (Dischert *et al.*, 1999; Lenz und Friedrich, 1998; Lenz *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 1998). Neben Antwortregulatoren, die aus zwei Domänen aufgebaut sind, gibt es auch solche, die keine C-terminale Effektor-Domäne besitzen. Das an der Chemotaxis beteiligte Protein CheY assoziiert mit seinem Effektor-Protein FliM, einer Komponente des Flagellenmotors (Welch *et al.*, 1993). Der an der Sporulation von *B. subtilis* beteiligte „Response“-Regulator Spo0F besteht ebenfalls nur aus der regulatorischen Domäne und transferiert die Phosphorylgruppe von den Histidin-Kinasen KinA und KinB auf das HPT-Protein Spo0B (Burbulys *et al.*, 1991), das seinerseits den als Transkriptionsregulator aktiven „Response“-Regulator Spo0A phosphoryliert. Darüber hinaus gibt es auch Antwortregulatoren, die aus drei Domänen aufgebaut sind, wie z. B. NtrC aus *E. coli*, das aus einer N-terminalen „Receiver“-Domäne, einer zentralen Domäne mit ATPase-Aktivität und einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne besteht (Bantscheff *et al.*, 1999).

Untersuchungen an CheY haben gezeigt, dass die „Receiver“-Domäne des Antwortregulators ein doppelt gewundenes α/β -Protein ist, das aus einem 5-strängigen parallelen β -Faltblatt besteht, welches von fünf α -Helices umgeben ist. Der phosphorylierbare Aspartat-Rest im aktiven Zentrum des Proteins befindet sich an einer dem Lösungsmittel zugewandten

Seite des β -Faltblatts und ist von vier konservierten Aminosäure-Resten umgeben, zwei Aspartat-Resten, einem Threonin- und einem Lysin-Rest. Die sauren Aspartat-Reste sind an der Koordination eines Mg^{2+} -Ions beteiligt, das sowohl für den Phosphoryltransfer als auch für die Dephosphorylierung benötigt wird (Lukat *et al.*, 1990; Lukat *et al.*, 1991; Needham *et al.*, 1993). Bei der Übertragung der Phosphorylgruppe auf den Aspartat-Rest wird ein bipyramidaler pentavalenter Übergangszustand des Phosphors durchlaufen, der zur Bildung eines „energiereichen“ Acylphosphats führt. Dadurch werden strukturelle Änderungen hervorgerufen, die primär die C-terminale Hälfte der „Receiver“-Domäne betreffen (Robinson *et al.*, 2000).

Wie oben beschrieben, besitzt die Mehrheit der Effektor-Domänen die Fähigkeit zur Bindung an DNA und kann die Transkription spezifischer Zielgene aktivieren und/oder reprimieren. Die spezifischen DNA-Erkennungssequenzen, die Anordnung der Bindungsstellen und der spezifische Mechanismus der transkriptionellen Regulation variiert sehr stark unter den Antwortregulatoren, was die mannigfaltigen Funktionen der verschiedenen Antwortregulatoren widerspiegelt. Basierend auf Homologien in ihrer C-terminalen Effektor-Domäne können Antwortregulatoren, die als Transkriptionsregulatoren fungieren, in verschiedene Subfamilien unterteilt werden, die nach repräsentativen Mitgliedern benannt wurden. Die meisten „Response“-Regulatoren lassen sich den Subfamilien OmpR, NarL und NtrC zuordnen (Robinson *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2000).

Es stellt sich die Frage, wie eine konservierte „Receiver“-Domäne die Funktion von so vielen verschiedenen Effektor-Domänen regulieren kann. Man nimmt an, dass die „Receiver“-Domäne des Antwortregulators in einem Gleichgewicht zwischen zwei Konformationszuständen, inaktiv und aktiv, existiert. Die Phosphorylierung der „Receiver“-Domäne verschiebt das Gleichgewicht hin zur aktiven (oder inaktiven) Form. Strukturanalysen der phosphorylierten „Receiver“-Domäne von NtrC, FixJ und CheY haben gezeigt, dass die Phosphorylierung eine weitreichende strukturelle Umgestaltung verursacht, welche die molekulare Oberfläche der „Receiver“-Domäne verändert. Dadurch wird jedoch weder die 3D-Struktur noch die Sekundärstrukturen der „Receiver“-Domäne substantiell verändert. Vielmehr werden einzelne Sekundärstrukturelemente geringfügig repositioniert, was Abweichungen des Rückgrats von nur wenigen Angström bewirkt. Diese Veränderungen beeinflussen die molekulare Oberfläche sowohl hinsichtlich ihrer Topologie als auch ihrer elektrostatischen Eigenschaften (Stock *et al.*, 2000).

6 Ziel der Arbeit

Um die Anpassungsmechanismen von *C. glutamicum* zu charakterisieren, wurde die Genomsequenz nach Genen durchsucht, die für Zweikomponenten-Regulationssysteme kodieren. Von insgesamt 13 identifizierten Systemen dieses Typs zeichnete sich CgtS4/CgtR4 durch zwei außergewöhnliche Eigenschaften aus. Hydrophobizitätsstudien zeigten, dass nur der postulierte N-Terminus der Sensor kinase CgtS4 sehr hydrophob ist und möglicherweise eine Transmembranhelix darstellt, mit der das Protein in der Cytoplasmamembran verankert ist. Dies führte zu der Annahme, dass CgtS4 möglicherweise ein intrazelluläres Signal detektiert. Die chromosomale Lokalisation von *cgtSR4* stromabwärts des Phosphoglyceratmutase-Gens (*pgm*) (siehe Abb. 10), deutete auf eine mögliche Regulation der *pgm*-Expression durch CgtS4/CgtR4 hin. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Zweikomponenten-Regulationssystem CgtS4/CgtR4 biochemisch, genetisch und auch physiologisch charakterisiert werden. Dazu können verschiedene Ansätze gewählt werden. Eine Möglichkeit ist durch Datenbank-Recherchen nach verwandten Zweikomponenten-Regulationssystemen zu suchen, um auf diese Weise Informationen über eine mögliche Funktion zu erhalten. Ein weiterer Ansatz ist die Konstruktion einer Deletionsmutante, um dann durch Testen verschiedener Wachstumsbedingungen einen gewünschten Phänotyp zu finden. Durch Vergleich von Deletionsmutante und Wildtyp mittels genomweiter Transkriptomanalysen können Gene identifiziert werden, deren mRNA-Level in der Mutante verändert sind. Untersuchungen der chromosomalen Umgebung können auch dazu genutzt werden, um Hinweise auf mögliche Zielgene zu erhalten und um diese anschließend experimentell zu überprüfen. Durch eine Kombination der verschiedenen Ansätze sollte es möglich sein, Hinweise auf die Funktion des CgtS4/CgtR4-Systems zu erhalten. Ein weiteres Ziel war der *in-vitro*-Nachweis der Phosphorylierungskaskade und damit der Beweis, dass es sich bei CgtS4/CgtR4 wirklich um ein klassisches Zweikomponenten-System handelt.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien (p.A.-Qualität) und Enzyme der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), New England Biolabs (Schwalbach) und Difco Laboratories (Detroit, USA) verwendet.

2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1, die verwendeten Plasmide in der Tab. 2 aufgeführt. Alle Stämme wurden als Glycerin-Kulturen (siehe 4.5) bei -20°C und -75°C konserviert.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ <i>thi-1 endA1 hsdR17</i> (r^{-} , m^{-}) <i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 gyrA96 relA1</i> ; Stamm für Klonierungen.	Bethesda Research Laboratories
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>); Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen λ DE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors trägt.	Studier und Moffatt, 1986
C43(DE3)	Derivat von BL21(DE3), das nicht-identifizierte Mutation(en) enthält; Stamm zur Überproduktion von Membranproteinen.	Miroux und Walker, 1996
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F' proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]; Stamm für die ortsspezifische Mutagenese.	Bullock <i>et al.</i> , 1987, Stratagene

C. glutamicum

ATCC13032	Wildtypisolat	Abe <i>et al.</i> , 1967
13032::pK19 <i>obsacB</i> Δ <i>cgtS4</i>	Wildtypderivat mit chromosomaler Integration von pK19 <i>obsacB</i> Δ <i>cgtS4</i> .	Diese Arbeit
13032 Δ <i>cgtS4</i>	Wildtypderivat, <i>in-frame</i> -Deletion von <i>cgtS4</i> .	Diese Arbeit
13032::pK19 <i>obsacB</i> Δ <i>cgtSR4</i>	Wildtypderivat mit chromosomaler Integration von pK19 <i>obsacB</i> Δ <i>cgtSR4</i> .	Diese Arbeit
13032 Δ <i>cgtSR4</i> / pXMJ19CgtSR4	Wildtypderivat, chromosomale Deletion von <i>cgtSR4</i> , ermöglicht durch die Anwesenheit des Plasmids pXMJ19CgtSR4.	Diese Arbeit
13032 Δ <i>cgtSR4</i> / pXMJ19CgtR4	Wildtypderivat, chromosomale Deletion von <i>cgtSR4</i> , ermöglicht durch die Anwesenheit des Plasmids pXMJ19CgtR4.	Diese Arbeit
13032::pCGEX5K CgtS4	Wildtypderivat mit chromosomaler Integration von pCGEX5KCgtS4. Da nur der 5'-Bereich des <i>cgtS4</i> -Gens rekombinieren kann, wird das unter Kontrolle des nativen Promotors stehende chromosomale <i>cgtS4</i> -Gen unterbrochen und die vollständigen Gene <i>cgtS4</i> und <i>cgtR4</i> gelangen unter Kontrolle des Plasmid-kodierten, integrierten <i>tac</i> -Promotors.	Diese Arbeit

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmide	Merkmale und Verwendung	Referenz/Herkunft
pET24b	Kan ^R , Expressionsvektor mit einem T7 <i>lac</i> -Promotor und der Möglichkeit, ein Fusions-Protein mit sechs C-terminalen Histidin-Resten (His-,Tag“) zu konstruieren.	Novagen, Madison, USA
pET24-CgtR4His	Kan ^R , pET24b-Derivat zur Überproduktion von CgtR4 aus <i>C. glutamicum</i> , das zusätzlich acht C-terminale Aminosäure-Reste (VEHHHHHH) enthält.	Diese Arbeit

pET24-CgtS4His	Kan ^R , pET24b-Derivat zur Überproduktion von CgtS4 aus <i>C. glutamicum</i> mit acht zusätzlichen Aminosäure-Resten am C-Terminus (LEHHHHHH).	Diese Arbeit
pET24-CgtS4Δ1-21His	Kan ^R , pET24b-Derivat zur Überproduktion der Sensorkinase CgtS4, die am N-Terminus um 21 Aminosäure-Reste verkürzt ist und zusätzlich einen N-terminalen Methionin-Rest sowie acht zusätzliche C-terminale Aminosäure-Reste enthält (LEHHHHHH).	Diese Arbeit
pET24b-Strep	Kan ^R , pET24b-Derivat zur Überproduktion von rekombinanten Proteinen mit <i>Strep</i> -tag II (WSHPQFEK).	Margareta Meyer
pET24-CgtR4Strep	Kan ^R , pET24b-Strep-Derivat zur Überproduktion von CgtR4 aus <i>C. glutamicum</i> mit zehn zusätzlichen C-terminalen Aminosäure-Resten (VEWSHPQFEK).	Diese Arbeit
pET24-CgtS4Strep	Kan ^R , pET24b-Strep-Derivat zur Überproduktion von CgtS4 aus <i>C. glutamicum</i> mit zehn zusätzlichen C-terminalen Aminosäure-Resten (LEWSHPQFEK).	Diese Arbeit
pET24-CgtS4 Δ1-21Strep	Kan ^R , pET24b-Strep-Derivat zur Überproduktion der Sensorkinase CgtS4, die am N-Terminus um 21 Aminosäure-Reste verkürzt ist und zusätzlich einen N-terminalen Methionin-Rest sowie zehn zusätzliche C-terminale Aminosäure-Reste enthält (LEWSHPQFEK).	Diese Arbeit
pMal-c	Amp ^R , Expressionsvektor mit einem <i>tac</i> -Promotor, der die Konstruktion eines Fusions-Proteins mit dem Maltose-Bindeprotein aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid ermöglicht.	New England Biolabs

pMalE-CgtS4kin	Amp ^R , pMal-c-Derivat zur Überproduktion eines Fusionsproteins aus der Kinase-Domäne (Aminosäuren 119-413) von CgtS4 aus <i>C. glutamicum</i> und dem Maltose-Bindeprotein aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid.	Oliver Mauermann, 2003
pCGEX1	Kan ^R , <i>oriV_{E.c.} oriV_{C.g.} lacI^q ptac</i> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttlevektor mit IPTG-induzierbarem <i>tac</i> -Promotor.	Steffen Schaffer
pCGEX1CgtR4	Kan ^R , pCGEX1-Derivat zur regulierten Expression von <i>cgtR4</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Steffen Schaffer
pCGEX5K	Kan ^R , <i>lacI^q ptac</i> ; Vektor zur Konstruktion chromosomaler konditionaler Mutanten in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pCGEX5KCgtS4	Kan ^R , pCGEX5K-Derivat für die Konstruktion von <i>C. glutamicum</i> 13032::pCGEX5KCgtS4.	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R , <i>sacB, oriT</i> , mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor zur Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten in <i>C. glutamicum</i> .	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>cgtS4</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat für die Konstruktion von <i>C. glutamicum</i> 13032 Δ <i>cgtS4</i> .	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>cgtSR4</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat für die Konstruktion von <i>C. glutamicum</i> 13032 Δ <i>cgtSR4</i> .	Diese Arbeit
pVWex2	Tet ^R , <i>oriV_{E.c.} oriV_{C.g.} lacI^q ptac</i> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttlevektor mit IPTG-induzierbarem <i>tac</i> -Promotor.	Volker F. Wendisch, 1997
pVWex2CgtR4	Tet ^R , pVWex2-Derivat zur regulierten Expression von <i>cgtR4</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit

pET2	Kan ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriV_{C.g.}</i> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttlevektor zur Analyse der transkriptionellen Aktivität von spezifischen Promotoren, die durch Klonierung mit dem promotorlosen <i>cat</i> -Reportergen fusioniert werden.	Vasicova <i>et al.</i> , 1998
pET2-pst	Kan ^R , pET2-Derivat zur Analyse der transkriptionellen Aktivität des <i>pst</i> -Promotors.	Malgorzata Krause, 2003
pET2-ugp	Kan ^R , pET2-Derivat zur Analyse der transkriptionellen Aktivität des <i>ugp</i> -Promotors.	Malgorzata Krause, 2003
pXMJ19	Cm ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriV_{C.g.}</i> <i>lacI^f</i> <i>ptac</i> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttlevektor mit IPTG-induzierbarem <i>tac</i> -Promotor.	Jacoby <i>et al.</i> , 1999
pXMJ19CgtSR4	Cm ^R , pXMJ19-Derivat zur regulierten Expression von <i>cgtSR4</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pXMJ19CgtR4	Cm ^R , pXMJ19-Derivat zur regulierten Expression von <i>cgtR4</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pXJ19CgtR4His	Cm ^R , pXMJ19-Derivat zur regulierten Expression von <i>cgtR4</i> in <i>C. glutamicum</i> ; das <i>cgtR4</i> -Genprodukt enthält zusätzlich acht C-terminale Aminosäure-Reste (VEHHHHHH).	Diese Arbeit
pXMJ19Pgm	Cm ^R , pXMJ19-Derivat zur regulierten Expression von <i>pgm</i> in <i>C. glutamicum</i> .	Diese Arbeit
pXMJ19CgtR4D52N	Cm ^R , pXMJ19CgtR4-Derivat, bei dem durch ortsgerichtete Mutagenese das Aspartat-Codon an Position 52 des <i>C. glutamicum</i> CgtR4-Proteins gegen ein Asparagin-Codon ausgetauscht wurde.	Diese Arbeit
pXMJ19CgtR4D52E	Cm ^R , pXMJ19CgtR4-Derivat, bei dem durch ortsgerichtete Mutagenese das Aspartat-Codon an Position 52 des <i>C. glutamicum</i> CgtR4-Proteins gegen ein Glutamat-Codon ausgetauscht wurde.	Diese Arbeit

2.1 Plasmidkonstruktionen

Um das Antwortregulator-Protein CgtR4 aus *C. glutamicum* aufzureinigen, wurde das Plasmid pET24-CgtR4His konstruiert. Dafür wurde das *cgtR4*-Gen aus dem Plasmid pCGEX1CgtR4 (Steffen Schaffer) durch einen Restriktionsverdau mit *NdeI/SalI* herausgeschnitten (698 bp) und in den mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pET24b kloniert. Der Expressionsvektor pET24b ermöglichte die Fusion des Zielproteins mit einem C-terminalen Histidin-,Tag“, bestehend aus sechs Histidin-Resten. Das aus der Klonierung resultierende Plasmid pET24-CgtR4His wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse mit *NdeI* und *EcoRI* kontrolliert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Klonierungsstrategie resultierte in dem rekombinanten Protein CgtR4-His (240 Aminosäuren, 27,1 kDa), das zusätzlich zu den Aminosäuren 2-232 von CgtR4 einen Methionin-Rest am N-Terminus sowie acht Aminosäuren (VEHHHHHH) am C-Terminus enthält. Die Synthese von CgtR4-His wurde durch einen T7-Promotor kontrolliert und die Translations-Initiations-Signale stammten vom Gen 10 des T7-Phagens.

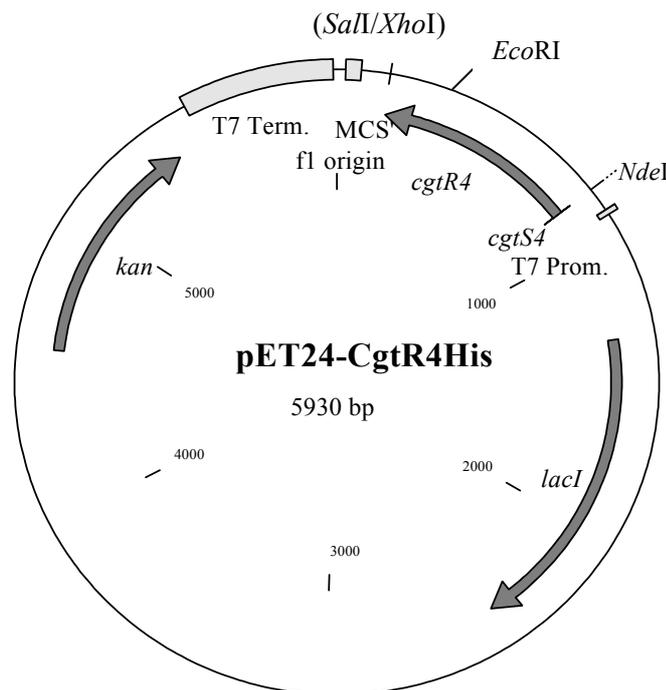


Abb. 2: Expressionsplasmid für den Antwortregulator CgtR4 aus *C. glutamicum*. Es kodiert ein CgtR4-Derivat, das aus den Aminosäuren 2-232, sowie einem N-terminalen Methionin-Rest und acht zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren (LEHHHHHH) besteht.

Um das Antwortregulator-Protein CgtR4 aus *C. glutamicum* mit einem *Strep*-tag II anstelle eines His-Tags aufzureinigen, wurde das Plasmid pET24-CgtR4Strep konstruiert. Dafür wurde das *cgtR4*-Gen aus dem Plasmid pCGEX1CgtR4 (Steffen Schaffer) durch einen Restriktionsverdau mit *NdeI/SalI* herausgeschnitten (698 bp) und in den mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pET24bStrep kloniert. Das aus der Klonierung resultierende Plasmid pET24-CgtR4Strep wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse mit *NdeI* und *EcoRI* kontrolliert. Die Klonierungsstrategie resultierte in dem rekombinanten Protein CgtR4-Strep (242 Aminosäuren, 27,3 kDa), das zusätzlich zu den Aminosäuren 2-232 von CgtR4 einen Methionin-Rest am N-Terminus sowie zehn Aminosäuren (VEWSHPQFEK) am C-Terminus enthielt.

Zur Überproduktion und Reinigung des vollständigen CgtS4-Proteins aus *C. glutamicum* wurde das Plasmid pET24-CgtS4His konstruiert. Dafür wurde der kodierende Bereich des *cgtS4*-Gens ohne Stopcodon aus der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* 13032 durch PCR (siehe 5.12) amplifiziert. Es wurden Primer verwendet (CgtS4-Nde-fw1, CgtS4-Xho-rv, siehe Tab. 3), die eine Klonierung mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* ermöglichten und hinter Aminosäure 413 zwei Aminosäuren (L und E) einfügten. Das PCR-Fragment (1260 bp) wurde mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* verdaut und anschließend in den Vektor pET24b kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Das aus der Klonierung resultierende Plasmid pET24-CgtS4His wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse mit *NdeI* und *XhoI* kontrolliert und einer Sequenzanalyse unterzogen, um Mutationen im *cgtS4*-Gen auszuschließen, die während der PCR aufgetreten sein könnten. Die Klonierungsstrategie resultierte in dem Protein CgtS4-His (421 Aminosäuren, 46,3 kDa), das zusätzlich zu den Aminosäuren 1-413 von CgtS4 acht Aminosäuren (LEHHHHHH) am C-Terminus enthielt.

Zur Reinigung und Charakterisierung der Sensorkinase CgtS4 aus *C. glutamicum*, die um die N-terminale putative Transmembranhelix verkürzt wurde, erfolgte die Konstruktion des Plasmids pET24-CgtS4 Δ 1-21His. Dafür wurde der Bereich des *cgtS4*-Gens, der das verkürzte Protein kodiert (Aminosäuren 22-413), mit der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* 13032 als Matrize amplifiziert. Es wurden Primer verwendet (CgtS4-Nde-fw2, CgtS4-Xho-rv, siehe Tab. 3), die eine *NdeI*-Schnittstelle vor Codon 22 und eine *XhoI*-Schnittstelle hinter Codon 413 einfügten. Nach PCR-Amplifizierung wurde das 1200 bp große Fragment einer Restriktion mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* unterzogen und anschließend in den Vektor pET24b kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Das aus der

Klonierung resultierende Plasmid pET24-CgtS4 Δ 1-21His wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse mit *NdeI* und *XhoI* kontrolliert und einer Sequenzanalyse unterzogen, um Mutationen in dem durch PCR generierten Teil auszuschließen. Die Klonierungsstrategie resultierte in dem Protein CgtS4 Δ 1-21His (401 Aminosäuren, 44,2 kDa), das zusätzlich zu den Aminosäuren 22-413 von CgtS4 einen Methionin-Rest am N-Terminus sowie acht Aminosäuren (LEHHHHHH) am C-Terminus enthielt.

Zur Überproduktion und Reinigung des vollständigen CgtS4-Proteins aus *C. glutamicum* mit einem *Strep*-tag II anstelle eines His-Tags wurde das Plasmid pET24-CgtS4Strep konstruiert. Dafür wurde der kodierende Bereich des *cgtS4*-Gens ohne Stopcodon aus der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* 13032 durch PCR (siehe 5.12) amplifiziert. Es wurden Primer verwendet (CgtS4-Nde-fw1, CgtS4-Xho-rv, siehe Tab. 3), die eine Klonierung mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* ermöglichten und hinter Aminosäure 413 zwei Aminosäuren (L und E) einfügten. Nach PCR-Amplifizierung wurde das PCR-Fragment (1260 bp) einer Restriktion mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* unterzogen und anschließend in den Vektor pET24bStrep kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Der Expressionsvektor pET24bStrep ermöglichte die Fusion des Zielproteins mit einem C-terminalen „*Strep*-tag II“, bestehend aus acht Aminosäure-Resten (WSHPQFEK). Das aus der Klonierung resultierende Plasmid pET24-CgtS4Strep wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse mit *NdeI* und *XhoI* kontrolliert und einer Sequenzanalyse unterzogen, um Mutationen im *cgtS4*-Gen auszuschließen, die während der PCR aufgetreten sein könnten. Die Klonierungsstrategie resultierte in dem rekombinanten Protein CgtS4-Strep (423 Aminosäuren, 46,5 kDa), das zusätzlich zu den Aminosäuren 1-413 von CgtS4 zehn Aminosäuren (LEWSHPQFEK) am C-Terminus enthielt.

Zur Reinigung und Charakterisierung der Sensor kinase CgtS4 aus *C. glutamicum* mit einem *Strep*-tag II, die um die N-terminale putative Transmembranhelix verkürzt wurde, erfolgte die Konstruktion des Plasmids pET24-CgtS4 Δ 1-21Strep. Dafür wurde der Bereich des *cgtS4*-Gens, der das verkürzte Protein kodiert (Aminosäuren 22-413) mit der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* 13032 als Matrize amplifiziert. Es wurden Primer verwendet (CgtS4-Nde-fw2, CgtS4-Xho-rv, siehe Tab. 3), die eine *NdeI*-Schnittstelle vor Codon 22 und eine *XhoI*-Schnittstelle hinter Codon 413 einfügten. Nach PCR-Amplifizierung wurde das 1200 bp große Fragment einer Restriktion mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* unterzogen und anschließend in den Vektor pET24bStrep kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Der Expressionsvektor pET24bStrep ermöglichte die Fusion des

Zielproteins mit einem C-terminalen „Strep-tag II“, bestehend aus acht Aminosäure-Resten (WSHPQFEK). Das aus der Klonierung resultierende Plasmid pET24-CgtS4Δ1-21Strep wurde anschließend durch eine Restriktionsanalyse mit *Nde*I und *Xho*I kontrolliert und einer Sequenzanalyse unterzogen, um Mutationen in dem durch PCR generierten Teil auszuschließen. Die Klonierungsstrategie resultierte in dem Protein CgtS4Δ1-21Strep (403 Aminosäuren, 44,3 kDa), das zusätzlich zu den Aminosäuren 22-413 von CgtS4 einen Methionin-Rest am N-Terminus sowie zehn Aminosäuren (LEWSHPQFEK) am C-Terminus enthielt.

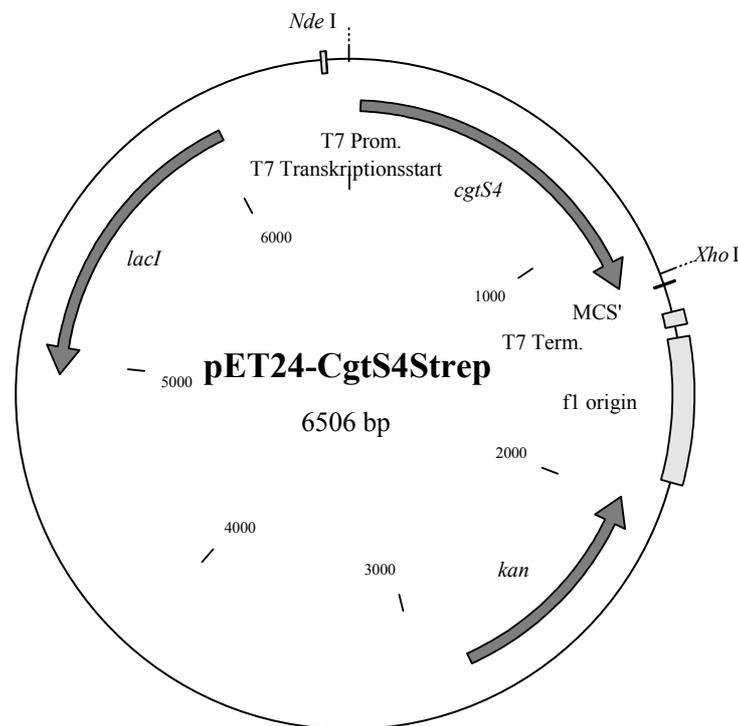


Abb. 3: Expressionsplasmid für die Sensor kinase CgtS4 aus *C. glutamicum*. Es kodiert ein CgtS4-Derivat, das aus den Aminosäuren 2-413, sowie einem N-terminalen Methionin-Rest und zehn zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren (LEWSHPQFEK) besteht.

Für die Konstruktion der *male-cgtS4*-Fusion und die Überexpression wurde der Vektor pMal-c (New England Biolabs) verwendet. Er trägt das *E. coli male*-Gen, bei dem exakt die Signalsequenz deletiert wurde (kodierend für die Aminosäuren 2 bis 26), um eine cytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins zu ermöglichen. Die Expression erfolgt von einem *tac*-Promotor aus. Um eine geringe Basalexpression zu gewährleisten, trägt der Vektor auch das Gen für den *lac*-Repressor (*lacI^q*). Die Insertion eines Fragments stromabwärts von *male* kann bei Verwendung eines geeigneten *E. coli*-Wirtsstammes mittels Blau-Weiß-Selektion überprüft werden, da *male* 3'-terminal mit dem 5'-Ende von *lacZ*

(*lacZ α*) fusioniert ist. Zu erwähnen ist noch die Erkennungssequenz für die Endoproteinase Faktor Xa, die es bei geeigneter Konstruktion des Fusionsproteins ermöglicht, den MalE-Anteil wieder abzutrennen. Um ein gut lösliches CgtS4-Protein mit einer konstitutiven Autophosphorylierung zu erhalten, wurde ein Fusionsprotein konstruiert, bei dem der N-terminale Bereich der Sensor kinase (Aminosäure-Reste 1-105) entfernt und der restliche C-terminale Teil des Proteins über einen 26 Aminosäuren umfassenden Linker mit dem Maltose-Bindeprotein verbunden wurde. Bei der Herstellung des Expressionsplasmids für dieses Fusionsprotein wurde von dem Plasmid pXMJ19CgtSR4 ausgegangen, das ein 1969 bp großes *PstI-XbaI*-Fragment mit den Genen *cgtS4* und *cgtR4* trägt. Für die Konstruktion des Fusionsproteins wurde pXMJ19CgtSR4 mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *XbaI* geschnitten und ein 1585 bp großes Fragment isoliert. *SmaI* schneidet hinter Position 314 des kodierenden Bereiches von *cgtS4*, also hinter dem zweiten Basenpaar des 105. Codons.

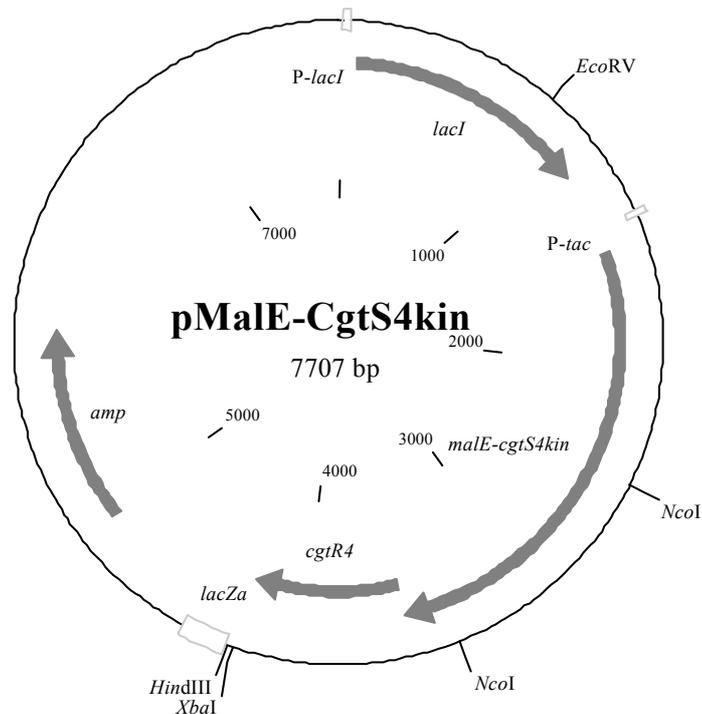


Abb. 4: Karte des Expressionsplasmids pMalE-CgtS4kin.

XbaI schneidet direkt hinter dem 3'-Ende von *cgtR4*. Das Plasmid pMal-c wurde zunächst mit *EcoRI* geschnitten, welches den Vektor linearisiert. Die 5'-überhängenden Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* aufgefüllt und das linearisierte Plasmid dann mit *XbaI* geschnitten. Zuletzt wurden der Vektor und das 1585-bp *SmaI-XbaI*-Fragment ligiert. Das aus der Klonierung resultierende Plasmid pMalE-CgtS4kin wurde durch

einen Restriktionsverdau mit *NcoI* einerseits sowie mit *HindIII* und *EcoRV* andererseits analysiert.

Zur kontrollierten Expression der *cgtSR4*-Gene in *E. coli* und *C. glutamicum* wurde das Plasmid pXMJ19CgtSR4 konstruiert. Dazu wurde mit Hilfe der Primer *cgtSR*-PstI-fw und *cgtSR*-XbaI-rv der *cgtSR4*-kodierende Bereich einschließlich der 31 bp vor dem *cgtS4*-Startcodon aus der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* 13032 amplifiziert (1988 bp) und in den „Shuttle“-Vektor (*E. coli* – *C. glutamicum*) pXMJ19 kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Der Vektor pXMJ19 ermöglichte die kontrollierte Expression der Zielgene durch einen induzierbaren *tac*-Promotor sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli*. Anschließend wurde das resultierende Plasmid pXMJ19CgtSR4 in einer Restriktionsanalyse mit den Enzymen *PstI* und *XbaI* kontrolliert.

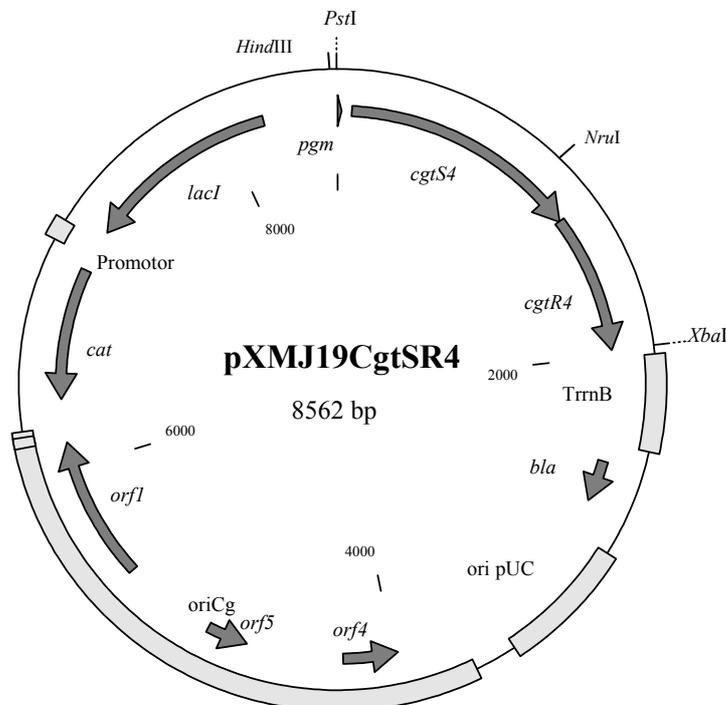


Abb. 5: „Shuttle“-Vektor (*E. coli* – *C. glutamicum*) für eine IPTG-induzierbare Expression der *cgtSR4*-Gene aus *C. glutamicum*.

Um das *cgtR4*-Gen getrennt von *cgtS4* in *C. glutamicum* zu exprimieren, wurde das Plasmid pXMJ19CgtR4 konstruiert. Dazu wurde der größte Teil des *cgtS4*-Gens durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *HindIII* und *NruI* aus dem Plasmid pXMJ19CgtSR4 deletiert. Die überhängenden 5'-Enden des verkürzten linearisierten Plasmids wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt und das Fragment anschließend religiert. Das resultierende Plasmid pXMJ19CgtR4 wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *EcoRV* und *BamHI* überprüft.

Ein Austausch des Aspartat-Restes an Position 52 von CgtR4 gegen einen Asparagin-Rest durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem „Quick-change Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) führte zu dem Derivat pXMJ19CgtR4D52N. Die dabei eingesetzten Primer (CgtR4-D52N-fw, CgtR4-D52N-rv, siehe Tab. 3) enthielten noch eine weitere „stille“ Mutation, durch die eine dritte *DraI*-Restriktionsschnittstelle in das mutierte pXMJ19CgtR4D52N-Derivat eingeführt wurde. Dies erlaubte eine einfache Unterscheidung von Ausgangsplasmid und mutiertem Plasmid durch Restriktionsanalyse. Während das Ausgangsplasmid nach einer Restriktion mit *DraI* Fragmente von 7144 und 339 bp ergab, führte die Restriktion des mutierten Plasmids mit *DraI* zu Fragmenten von 5115, 2039 und 339 bp, die in einem 1 %igen Agarosegel nachgewiesen werden konnten. Durch DNA-Sequenzanalyse wurde gezeigt, dass außer den gewünschten Basenpaar-Austauschen keine weiteren Mutationen im *cgtR4*-kodierenden Bereich von pXMJ19CgtR4D52N vorhanden waren. Analog zu dem D52N-Austausch wurde auch ein D52E-Austausch durchgeführt, der zu dem Plasmid pXMJ19CgtR4D52E führte. Die dabei eingesetzten Primer (CgtR4-D52E-fw, CgtR4-D52E-rv, siehe Tab. 3) enthielten noch eine weitere „stille“ Mutation, durch die eine neue *SacI*-Restriktionsschnittstelle in das mutierte Plasmid eingeführt wurde. Während das Ausgangsplasmid nach *SacI*-Verdau nur einmal geschnitten wurde, führte die Restriktion des mutierten Plasmids mit *SacI* zu Fragmenten von 567 und 6916 bp, die in einem 1 %igen Agarosegel nachgewiesen werden konnten. Durch DNA-Sequenzanalyse wurde wiederum gezeigt, dass außer den gewünschten Basenpaar-Austauschen keine weiteren Mutationen im *cgtR4*-kodierenden Bereich von pXMJ19CgtR4D52E vorhanden waren.

Um die Funktionalität eines His-getaggten CgtR4-Proteins in *C. glutamicum* zu testen, wurde das Plasmid pXMJ19CgtR4-His konstruiert. Dazu wurde der kodierende Bereich des *cgtR4*-Gens einschließlich des Plasmid-kodierten „Histidin-Tags“ aus dem Plasmid pET24-CgtR4His durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *XbaI* und *SmaI* herausgeschnitten. Anschließend wurde das 1965 bp große Fragment in den Vektor pXMJ19 kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Das resultierende Plasmid pXMJ19CgtR4-His wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *SmaI* und *XbaI* überprüft.

Zur kontrollierten Expression des *cgtR4*-Gens in *C. glutamicum* wurde zusätzlich das Plasmid pVWex2CgtR4 konstruiert. Dazu wurde mit Hilfe der Primer CgtR4-PstI-fw und *cgtSR-XbaI-rv* der *cgtR4*-kodierende Bereich einschließlich 52 bp vor dem *cgtR4*-Startcodon aus der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* amplifiziert und in den „Shuttle“-Vektor

(*E. coli* – *C. glutamicum*) pVWex2 kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Der Vektor pVWex2 ermöglichte die kontrollierte Expression der Zielgene durch einen induzierbaren *tac*-Promotor sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli*. Um Mutationen auszuschließen, die durch die PCR aufgetreten sein könnten, wurden das klonierte *cgtR4*-Gen und die Ligationstellen einer Sequenzanalyse unterzogen. Das durch pVWex2CgtR4 kodierte Gen war identisch mit dem chromosomal kodierten.

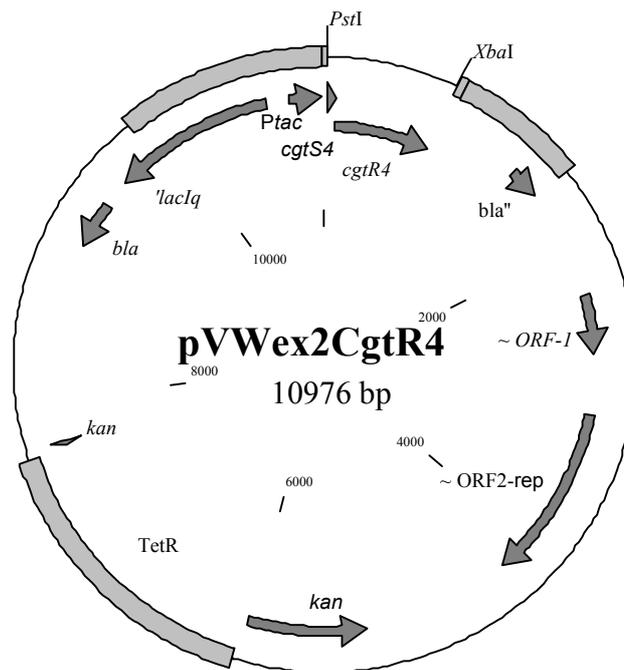


Abb. 6: „Shuttle“-Vektor (*E. coli* – *C. glutamicum*) für eine IPTG-induzierbare Expression des *cgtR4*-Gens aus *C. glutamicum*.

Zur kontrollierten Expression des *pgm*-Gens aus *C. glutamicum* wurde das Plasmid pXMJ19Pgm konstruiert. Dazu wurde mit Hilfe der Primer *pgm*-XbaI-fw und *pgm*-EcoRI-rv der *pgm*-kodierende Bereich einschließlich 51 bp vor dem *pgm*-Startcodon aus der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* amplifiziert und in den Vektor pXMJ19 kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Anschließend wurde die Klonierung durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Xba*I und *Eco*RI überprüft. Wie eine DNA-Sequenzanalyse zeigte, war das durch pXMJ19Pgm kodierte Gen identisch mit dem chromosomal kodierten.

Um eine konditionale Mutante zu erstellen, bei der die chromosomalen *cgtSR4*-Gene unter der Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors stehen, wurde das Plasmid pCGEX5KCgtS4 konstruiert. Dafür wurde der 5'-terminale Bereich des *cgtS4*-Gens, der für die Aminosäuren

1-213 kodiert, mit der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* 13032 als Matrize amplifiziert. Es wurden Primer verwendet (cgtS4-PstI-fw, cgtS4-EcoRI-rv, siehe Tab. 3), die eine *PstI*-Schnittstelle 30 bp vor dem postulierten *cgtS4*-Translationsstart und eine *EcoRI*-Schnittstelle hinter Codon 213 einfügten. Nach PCR-Amplifizierung wurde das 684 bp große Fragment einer Restriktion mit den Enzymen *PstI* und *EcoRI* unterzogen und anschließend in den Vektor pCGEX5K kloniert, der ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten wurde. Der Vektor pCGEX5K ist ein Derivat des Vektors pXMJ19, bei dem der Replikationsursprung für *C. glutamicum* 13032 deletiert und die Chloramphenicol-Resistenz gegen eine Kanamycin-Resistenz ausgetauscht wurde. Die Integration des Plasmids pCGEX5KCgtS4 ins Chromosom mittels homologer Rekombination ermöglichte die induzierbare Expression des *cgtS4*- und des *cgtR4*-Gens unter der Kontrolle des *tac*-Promotors. Um Mutationen auszuschließen, die durch die PCR aufgetreten sein könnten, wurde das klonierte *cgtS4*-Fragment und die Ligationsstellen einer Sequenzanalyse unterzogen.

3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die bei Polymerase-Kettenreaktionen (PCR), Sequenzierungen und ortsspezifischer Mutagenese eingesetzt wurden, sind in Tab. 3 aufgeführt. Sie wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tab. 3: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen, die mit Hilfe der Oligonukleotide eingeführt wurden, sind durch Fettdruck gekennzeichnet und das entsprechende Enzym in der letzten Spalte aufgeführt. Veränderte Basen in den Mutagenese-Primern sowie Sequenzen für einen Biotin-Tag sind unterstrichen und komplementäre Sequenzen in den „Cross-over“-PCR-Primern sind kursiv gedruckt.

Oligonukleotide	5'-3'-Sequenz	Enzym
Primer zur Konstruktion und Überprüfung von Deletions- und Integrationsmutanten		
Delta-cgtSR4-1	ATA TCC CGG GCA GGC AAA TGA CCC TCG TTA CG	<i>XmaI</i>
Delta-cgtSR4-2	<i>CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA</i> AGG TAG GGC GAG GCC CAT GAG	
Delta-cgtSR4-3	<i>TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG</i> GTG ACC GTG CGT GGA TTG GG	
Delta-cgtSR4-4	CTC CGG ATC CAA GCA AAA GTG AGC CCT GGC C	<i>BamHI</i>
cgtSR4-out-fw	CCA CCA CCA GAG CTC GCG GAT G	
cgtSR4-out-rv	GCA CGT GTG TCT GGT TTG CTG G	
Delta-cgtS4-3	<i>TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG</i> GCG TCC AAA GCA TCT GGG CGC	
Delta-cgtS4-4	CCG GTC TAG ACG GCT TCG GTT TCA GTA ACT CC	<i>XbaI</i>
cgtS4-out-rv	CGA GGA TTT GAT CGT CAA GTG GTA	
cgtS4-rv	CGC AGT CGT ACG AAT AGG TGA A	
Primer zur Konstruktion von Plasmiden		
cgtSR-PstI-fw	GGC GGC TGC AGC AAA CCA GGG TAA TAA GTA GC	<i>PstI</i>

cgtSR-XbaI-rv	TGG TTC TAG ACT ACA GCT CGA ATT TGT AGC C	<i>XbaI</i>
cgtS4-PstI-fw	GGC GGC TGC AGC AGG GTA ATA AGT AGC TAT TTG TA	<i>PstI</i>
cgtS4-EcoRI-rv	GGT GGA ATT CAG TTC GTT GAT CAT GTC GGC	<i>EcoRI</i>
pgm-XbaI-fw	GCG GCT CTA GAC ACG GCT AAG TAA ACG CGC G	<i>XbaI</i>
pgm-EcoRI-rv	GCC TAG AAT TCG CTA CTT ATT ACC CTG GTT TGC	<i>EcoRI</i>
CgtR4-PstI-fw	GGC GGC TGC AGC ACC TAT TCG TAC GAC TGC GTC	<i>PstI</i>
CgtS4-Nde-fw1	GGC GGC TGC ATA TGA GCA CTC TTC TTG CTT TCG TAT	<i>NdeI</i>
CgtS4-Nde-fw2	GGC GGC CTC ATA TGA CGA AAA TTA AAG ATC GGA TGC GTC	<i>NdeI</i>
CgtS4-Xho-rv	GGC GCT CGA GTG ATT TTT CCT TTC GGC GCC CAG	<i>XhoI</i>
Primer zur Amplifizierung von Promotorregionen für Gelretardationsexperimente		
cgtS4-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> AGG ACG TTG TGG TTC GTT TTG	
cgtS4-prom-rv	CTA CAA ATA GCT ACT TAT TAC CC	
pgm-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> GCG GCC CGG GTT GGC GGC	
pgm-prom-rv	AGG TAC TAG TTT GCC ACT TTA TG	
gluA-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> CTG TTG CGC GAG CTG ACA TAA	
gluA-prom-rv	AAG GGT AGC TTA AAG CAG TTT GT	
pstS-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> CCT GTG AGA ATA ATA AGA ATC GG	
pstS-prom-rv	GGG GAA GCC TTT CCG GTT TAA	
ugpA-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> TTC TGA GTA TTT TGG CTA CTA CA	
ugpA-prom-rv	GAG CGG AAA TGT TAT GTG ACC	
glpQ-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> GTA GAC ATT CAT GTA ACC GGC	
glpQ-prom-rv	CCT TTT CTG TGG GCT TTT TAA G	
ykvI-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> CTG AAG GAG CCT GGG ATG G	
ykvI-prom-rv	GGA ACA AAC CTT AGT AGG CTC	
orf1818-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> GTA CGC GGA GAT ACC CTA GA	
orf1818-prom-rv	GGC TTA ATT TTA GGC ATA GCA G	
orf2409-prom-fw	<u>GAGGAGTCGTCGATGTGGAGACC</u> AGT GAA AGA CCG TGG AAA TTG G	
orf2409-prom-rv	CTT ATG GAT AGC TAT TGG ATT GC	
helicase-fw1	AGC GAA AGC ATA GTG GTT TAA GTT	
helicase-rv1	GTG CTG CTA ACC CTT CGC GGT AAT	
helicase-fw2	CAA CTC TTC CCT CGA CGA CAA CAC	
helicase-rv2	AGG TTA AAG ATT AAC GCG TCT TAA	
orf312_prom_fw	GAG CCC ACC CAC CGG CTC TTC CAA	
orf312_prom_rv	CAA GAA TGT AAG GCG TGT CAC CTT	
orf828_prom_fw	CTA AAA CCA AGG TGA GCT TCC TCA	
orf828_prom_rv	GGC GCA ACT ATA GCG TGA TCA CCA	
orf2008_prom_fw	GAC CAG AGT TCT TCA AGG TAG AGC	
orf2008_prom_rv	GCC TAT AAC TAT AAC GGT GAA TGC AC	
orf2456_prom_fw	ACG CAA GGG AGC GGA GAA CAT TTA	

orf2456_prom_rv	CTC CTG CTT GAT TTA GCT TTC ACC
orf2622_prom_fw	CTC CAG TCG AGG CAC CTG TTG AGC
orf2622_prom_rv	CAC GTT ATG CAT GAT CAT GCA AAT TAT
orf3472_prom_fw	TCA AGT CGC CTA GCT TTA GAC CTA G
orf3472_prom_rv	CAG CAT AGG TTA GCG CAG CAT AAC
cgtR3_prom_fw	TCT GCA GAG GGC AAT GAG CTA GCG
cgtR3_prom_rv	CTC TTC CAT TGG TGT CCA TTA GCG
cgtR9_prom_fw	TCT AGC ACG GGT GCC TGA CGG CCC
cgtR9_prom_rv	CCA CCC TCG TTC AGT GCC CGG CGG

Primer für Kolonien-PCR

M13-fw-24mer	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC
M13-rv-24mer	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA
pEKEX2-fw	GTA TAA TGT GTG GAA TTG TGA GCG G
pEKEX2-rv	ATT TAA TCT GTA TCA GGC TGA AAA TC

Mutageneseprimer

CgtR4-D52N-fw	GAC ATC GTC CTT TTA <u>A</u> AC CTC ATG CTC CCA	<i>DraI</i>
CgtR4-D52N-rv	TGG GAG CAT GAG GTT <u>A</u> AG GAC GAT GTC	<i>DraI</i>
CgtR4-D52E-fw	GAC ATC GTC CTC TTA G <u>A</u> G CTC ATG CTC CCA GGC	<i>SacI</i>
CgtR4-D52E-rv	GCC TGG GAG CAT GAG <u>C</u> TC TAA GAG GAC GAT GTC	<i>SacI</i>

Sequenzierungsprimer (IRD800-markiert)

21mer-seq-fw	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG
21mer-seq-rv	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA
pEKEX2-fw	GTA TAA TGT GTG GAA TTG TG
pEKEX2-rv	ATT TAA TCT GTA TCA GGC TG
T7-Promotor	AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG
T7-Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG
M13 forward	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC
M13 reverse	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA

4 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

4.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde routinemäßig Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook, 1989) verwendet. Nur zur Regeneration der Zellen nach einer Transformation wurde SOC-Komplexmedium (Sambrook, 1989) eingesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt. Bei einer selektiven Kultivierung von Bakterienstämmen, die Antibiotika-Resistenzen trugen, wurden die Medien

mit den in Tab. 4 aufgeführten Antibiotika-Konzentrationen ergänzt. Alle *E. coli*-Stämme wurden in Schüttelkolben bzw. auf Agarplatten bei 37°C kultiviert.

4.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen für *C. glutamicum*

C. glutamicum-Stämme wurden üblicherweise in 'Brain Heart Infusion'-Medium (BHI-Medium, Difco) oder LB-Medium (Sambrook, 1989) kultiviert. Als Minimalmedium wurde CgXII-Minimalmedium (Keilhauer *et al.*, 1993) mit verschiedenen C-Quellen verwendet. Nach Elektroporation wurden die Zellen in BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) regeneriert und auf BHIS-Platten ausgestrichen. Alle *C. glutamicum*-Stämme wurden in Schüttelkolben (120 Upm) bzw. auf Agarplatten bei 30°C kultiviert.

Zusammensetzung der Kulturmedien:

LB-Medium

10 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 10 g/l NaCl

SOC-Medium

20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,4 mM KCl, nach dem Autoklavieren wurde pro 100 ml je 1 ml einer 2 M Glucoselösung und einer 2 M Magnesiumsalzlösung (1 M MgCl₂ x 6 H₂O und 1 M MgSO₄ x 7 H₂O), die zuvor steril filtriert wurden, zugegeben.

CgIII-Komplexmedium (Kase und Nakayama, 1972)

10 g/l Pepton (Difco), 10 g/l Hefeextrakt (Difco), 2 % (w/v) Glucose, 2,5 g/l NaCl, pH 7,4

CgXII-Minimalmedium

20 g/l (NH₄)₂SO₄, 5 g/l Harnstoff, 1 g/l K₂HPO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,25 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 42 g/l MOPS, 10 mg/l CaCl₂, 0,2 mg/l Biotin, 1 ml/l Spurensalzlösung, pH mit NaOH auf 7 einstellen, nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l, in verdünnter NaOH gelöst, sterilfiltriert) und 4 % (w/v) Glucose zugeben. Glucose und Spurensalze wurden separat autoklaviert, die Biotin-Lösung sterilfiltriert.

Spurensalzlösung

10 g/l FeSO₄ x 7 H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 1 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l CuSO₄, 20 mg/l NiCl₂ x 6 H₂O, zum Lösen mit HCl ansäuern (ad pH 1)

BHIS-Agar-Medium

37 g/l BHI, 15 g/l Agar, 91 g/l Sorbitol (separat autoklaviert)

Tab. 4: Antibiotika-Konzentrationen, die selektiven Medien zugesetzt wurden.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>		<i>C. glutamicum</i>		Stammlösung
	Selektion	Stammhaltung	Selektion	Stammhaltung	
Ampicillin/Carbenicillin	100 µg/ml				100 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	50 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml		50 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	10 µg/ml	2 µg/ml	5 µg/ml		10 mg/ml in 70 % Ethanol
Chloramphenicol	10 µg/ml		10 µg/ml		10 mg/ml in 50 % Methanol

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden wie folgt hergestellt: Ampicillin/Carbenicillin, 2 % in Wasser; Kanamycin, 2 % in Wasser; Tetracyclin, 0,5 % in 70 % Ethanol; Chloramphenicol, 1 % in 50 % Methanol. Mit Ausnahme von Tetracyclin (wurde in einer dunklen Flasche aufbewahrt) wurden alle Lösungen sterilfiltriert. Kanamycin wurde bei 4°C, alle anderen Antibiotika bei -20°C gelagert.

4.3 Messung des Wachstums von Bakterienkulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer (Pharmacia) bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der optischen Dichte ist bis zu einer Extinktion von 0,3-0,4 gegeben. Lag die gemessene Extinktion höher als 0,3, wurde die Probe entsprechend mit H₂O verdünnt.

4.4 Expressionskulturen in *E. coli*

2 l LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum wurden mit einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes angeimpft, der das gewünschte Expressionsplasmid trug. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 wurden die Kulturen bei 37°C und 120 Upm inkubiert. Die Expression des Zielgens wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG (End-Konzentration) induziert. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C 3 Stunden weiterinkubiert. Vor Induktion sowie 1, 2 und 3 Stunden danach wurde die OD₆₀₀ bestimmt sowie 1 ml-Proben entnommen und abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in (OD₆₀₀ x 100) µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20°C gelagert. Zur Verbesserung der Überexpression bestimmter Gene wurden die Expressionskulturen mit einer Einzelkolonie angeimpft und nach IPTG-Induktion über Nacht bei Raumtemperatur weiter inkubiert.

4.5 Stammhaltung von Bakterien

Zur Herstellung einer Glycerinkultur wurde eine 20 ml Übernacht-Kultur abzentrifugiert (10 min, 5200 g, 4°C) und die Zellen in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml sterilem Glycerin (87 %) wurde die Probe in zwei Aliquots (2 ml) aufgeteilt und in sterile 2 ml Cryo-Röhrchen überführt. Eine der so erhaltenen Glycerinkulturen wurde bei -20°C gelagert, die andere bei -75°C. Diese Dauerkulturen bleiben in der Regel über Jahre hinweg lebensfähig und dienen zum Animpfen von Agarplatten.

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Isolierung von DNA

5.1.1 Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach einer modifizierten Methode von (Birnboim und Doly, 1979) durchgeführt. Plasmide wurden ausgehend von 2-4 ml Übernacht-Kultur ('Minipräps') oder ausgehend von 100 ml Übernacht-Kultur ('Maxipräps') mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder dem „QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Methode des Miniprep-Kits beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an Silikat in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen, wegwaschen von Verunreinigungen und Elution der Plasmid-DNA mit Wasser oder Puffer ohne Salz. Beim „QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit“ wird die Plasmid-DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen an einen speziellen Anionenaustauscher gebunden, die Verunreinigungen gewaschen und die DNA mit Hochsalz-Puffer eluiert. Anschließend erfolgt ein Konzentrations- und Entsalzungsschritt durch Isopropanolfällung.

Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder dem „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ präpariert. Aufgrund des im Vergleich zu *E. coli* dickeren Mureinsacculus ging in jedem Fall eine 1-2-stündige Behandlung mit 15 µg/ml Lysozym bei 37°C voraus.

5.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte nach einem Protokoll von Dr. Steffen Schaffer (persönliche Mitteilung): Eine 5 ml LB-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert und das Zellpellet in 400 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2 % (w/v) Triton X-100, 20 mg/ml Lysozym, frisch zugesetzt) resuspendiert und 1 h

unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Um Proteine abzubauen, wurden dann 80 µl 10 % (w/v) SDS und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE) zugegeben und 30 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 Volumenanteile, pH 7,0, Roth) versetzt, 10 s gemischt und 3 min bei 15000 g und RT zentrifugiert, um organische und wässrige Phase zu trennen. Die obere, wässrige Phase mit der DNA wurde danach abgenommen und die DNA mit Isopropanol gefällt (siehe 5.2.3).

5.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAEXII Gel Extraction“-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

5.2 DNA-Reinigung

5.2.1 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die direkt für eine Restriktion bestimmt waren, wurden mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) gereinigt, um Primer und noch vorhandene Nukleotide zu entfernen. Die Methode beruht darauf, dass DNA in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen und bei niedrigem pH-Wert an eine Silicagel-Membran adsorbiert, während Primer, Salze und Nukleotide nicht binden. Die Membran wurde zur Reinigung ein- oder mehrmals mit Puffer gewaschen und die DNA mit TE-Puffer pH 8,5 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) eluiert.

5.2.2 Ethanolfällung

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, gemischt und mit 3 Vol. Ethanol (p.A., -20°C) gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 min bei 15000 g und 4°C wurde die DNA mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA) gelöst.

5.2.3 Isopropanolfällung

Die DNA wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt und durch Zentrifugation bei 15000 g (RT) sedimentiert. Anschließend wurde die DNA mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer gelöst.

5.3 Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Extinktionsmessung einer wässrigen Nukleinsäurelösung erfolgte in einer 100 µl Mikroküvette aus Quarzglas, dabei wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook, 1989):

Doppelstrang-DNA: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml.

Oligonukleotide: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 33 µg/ml.

Einzelstrang-DNA und RNA: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml.

Der Quotient E_{260}/E_{280} , der ein Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA ist, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

5.4 Restriktion

Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Produktinformationen für die einzelnen Enzyme (Roche Diagnostics bzw. New England BioLabs Inc.). Die notwendigen Pufferbedingungen wurden durch Zusatz von 1/10 Volumen 10-fach konzentriertem Restriktionspuffer eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der erforderlichen Menge an Enzym gestartet (1 U spaltet 1 µg DNA in 1 h). Es wurden Ansätze mit einem Volumen von insgesamt 20 µl (analytische Restriktion) oder 50 µl (präparative Restriktion) und 10-30 U Enzym hergestellt. Die Reaktionsansätze wurden 1-2 h (genomische DNA über Nacht) bei der für das betreffende Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mit 5 x Ladepuffer (0,2 % Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

5.5 5'-Dephosphorylierung gespaltener Plasmid-DNA

Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde durch Behandlung linearer Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektoranteils bei der Ligationsreaktion vermieden. Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Zur Dephosphorylierung der 5'-Stränge wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase („Shrimp alkaline phosphatase“, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 30-45 min bei 37°C inkubiert.

5.6 Auffüllreaktion mit Hilfe der „Klenow-Polymerase“

Um überhängende 5'-Enden eines DNA-Fragments aufzufüllen, wurde zu einem bereits mit einem Restriktionsenzym verdauten 20 µl-Ansatz 2 µl Klenow-Polymerase (2 U/µl) und 1 µl dNTP-Mix (End-Konz. von dATP, dGTP, dCTP und dTTP im Ansatz betrug je 0,5 mM) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert.

5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen. Die Phosphatgruppen im Rückgrat der DNA verleihen ihr eine negative Ladung. Dadurch kann die DNA beim Anlegen eines elektrischen Feldes innerhalb der Agarosematrix aufgetrennt werden. Die Wandergeschwindigkeit der einzelnen DNA-Moleküle ist dabei von der Agarosekonzentration des Gels, der elektrischen Feldstärke sowie der DNA-Konformation abhängig. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts ist. Bei gleichem Molekulargewicht zeigen ccc-DNA („covalently closed circular“) und oc-DNA („open circular“) gegenüber linearer DNA unterschiedliches Wanderungsverhalten. Agarosekonzentrationen von 0,8-2 % gewährleiten eine effiziente Auftrennung von DNA-Molekülen in einem Größenbereich von 0,2-7 kb. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. Die Agaroselösung wurde durch kurzes Aufkochen des Ultra-Pure Agarosepulvers (GibcoBRL) in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) hergestellt. Die flüssige Agarose wurde nach Abkühlen auf ca. 60°C auf einen Gelträger gegossen und ein Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesetzt. Nach Polymerisierung der Agarose und Entfernung des Kamms, wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Die DNA-Probe wurde mit 1/5 Volumen Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100-180 Volt. Als Standard diente *Hind*III-geschnittene λ -Phagen-DNA (200 ng/µl) und *Hind*III/*Eco*RI-geschnittene λ -Phagen-DNA (200 ng/µl), die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Damit wird ein Größenbereich von 0,5 bis 20 kb abgedeckt. Bei Fragmenten zwischen 0,1 und 1 kb wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker XIV (100 bp Leiter, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA durch 10-minütige Inkubation der Agarosegele in einer Lösung des interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (0,5 mg/l), gefolgt von einer 10-minütigen

Inkubation in H₂O, gefärbt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht mit einem ImageMaster[®]VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech) photographiert.

5.8 Ligation

Ligationen wurden mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) ca. 1 h bei RT durchgeführt. Die verwendete Vektor-DNA wurde in einem Mengenverhältnis von 1:2 bis 1:4 (Vektor:Insert) mit Insert-DNA gemischt, nachdem die DNA-Mengen beider Fragmente nach einer Gelelektrophorese anhand eines DNA-Standards abgeschätzt wurden.

5.9 Transformationstechniken

5.9.1 Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen

Die Präparation CaCl₂-kompetenter Zellen erfolgte nach Cohen *et al.*, 1972. 40 ml LB wurden mit 0,8 ml Übernachtskultur beimpft, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 4000 g, 4°C). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 ml eiskaltem CaCl₂ (50 mM) resuspendiert, erneut zentrifugiert (10 min, 4000 g, 4°C) und vorsichtig in 20 ml eiskaltem CaCl₂ resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 4000 g, 4°C). Anschließend wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem CaCl₂ resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und vorsichtig mit 290 µl Glycerin (87 %) vermischt. 200 µl-Aliquots wurden in gekühlte Reaktionsgefäße pipettiert und entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -75°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot von 50 µl kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt, gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 90 s bei 42°C im Wasserbad zur Induktion der Aufnahme der DNA in die Zellen inkubiert. Die Zellen wurden danach 2 min auf Eis abgekühlt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert, um den Bakterien die Möglichkeit zur Expression der Antibiotika-Resistenz-Gene zu geben. Volumina von 100-450 µl wurden auf selektive LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.9.2 Transformation von *C. glutamicum* mittels Elektroporation

Die Herstellung superkompetenter Zellen von *C. glutamicum* erfolgte nach van der Rest *et al.*, 1999. 10 ml LB-Medium supplementiert mit 2 % (v/v) Glucose wurden mit einer

Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und 16 h bei 30°C inkubiert. 100 ml Epo-Medium (LB-Medium, 4 g/l Isoniazid, 25 g/l Glycin, 1 % (v/v) Tween 80, Schäfer *et al.*, 1994) wurden mit dieser Vorkultur so inokuliert, dass die Kultur eine Start-OD₆₀₀ von 0,3 besaß. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 (ca. 24-28 h) wurde die Kultur bei 18°C und 120 Upm inkubiert, anschließend 10 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (10 min 4000 g, 4°C). Es folgten vier Waschschrte mit 50 ml eiskaltem 10 %igem (v/v) Glycerin, danach wurden die Zellen in 0,5 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und je 100 µl in eiskalte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die superkompetenten Zellen wurden entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -75°C gelagert.

Für die Elektroporation wurde ein 100 µl-Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl DNA gemischt (100-250 ng DNA für Plasmidtransformation; 1-2 µg DNA für eine chromosomale Integration) und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden einem Strompuls ausgesetzt, wobei folgende Parameter eingestellt wurden: Spannung, 2,5 kV; Kapazität, 25 µF; Widerstand, 600 Ω. Man erhält eine Zeitkonstante von 10-12 ms. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) zugegeben und der Ansatz in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 6 min bei 46°C, danach wurden die Zellen zur Regeneration unter leichtem Schütteln 90 min bei 30°C inkubiert und auf selektive BHIS-Platten ausplattiert.

5.10 Radioaktive Markierung von DNA

Die T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert den Transfer der terminalen Phosphatgruppe von ATP auf 5'-OH-Enden von DNA oder RNA. Um DNA-Fragmente mit hoher spezifischer Aktivität radioaktiv zu markieren, wurden ca. 200 fmol DNA nach Herstellerprotokoll für 30 min bei 37°C mit 4,5 U PNK (USB Corporation, Cleveland, USA) und 1,68 pmol [γ -³²P]-ATP (Amersham Pharmacia, Freiburg) inkubiert. ADP und nicht umgesetztes ATP wurden anschließend durch Reinigung mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) (siehe 5.2.1) abgetrennt.

5.11 Southern-Blot Hybridisierung

Für Southern-Hybridisierungen (Southern, 1975) wurden 5-10 µg der zu analysierenden chromosomalen DNA über Nacht mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und in einem Agarosegel (0,8 %) benachbart zu einem DIG-markierten Standard (DNA-Standard II+III, Roche Diagnostics, Mannheim) elektrophoretisch aufgetrennt. Um kleine und daher

leicht zu transferierende einzelsträngige DNA-Fragmente zu erhalten, wurde das Agarosegel zunächst 30 min in Depurinierungslösung (250 mM HCl), danach 30 min in Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend 30 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 3 M NaCl) inkubiert. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte mittels Vakuumblot. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Natrium-Citrat, pH 7,0) eingesetzt und der Transfer erfolgte für 1 h bei 50 mbar. Anschließend wurde die DNA durch UV-Belichtung (2 ½ min) auf der Membran fixiert.

Für die Herstellung der Sonden wurde das „DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set“ (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. DIG-Chem-Link ist eine spezielle cis-Platin Verbindung. Zwei der vier Koordinationsstellen des Pt-Atoms sind von den beiden Aminofunktionen eines Diaminoethan-Liganden besetzt. An die dritte Koordinationsstelle ist über einen aliphatischen „Spacer“ ein DIG-Molekül gebunden. Die vierte Koordinationsstelle trägt einen leicht abspaltbaren Nitratliganden. Bei Inkubation von DIG-Chem-Link in wässriger Lösung mit einer Nukleinsäure erfolgt unter Abspaltung von Nitrat eine koordinative Bindung an die Position N7 von Guanin- und Adenin-Basen. Die Bindung von DIG-Chem-Link ist zwar rein koordinativ, aber stabil genug, um die DNA-Denaturierung durch Kochen sowie die üblichen Hybridisierungs- und Waschbedingungen intakt zu überstehen. 1 µg der zu markierenden DNA wurden mit 1 µl DIG-Chem-Link gemischt, mit dest. H₂O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt und der Ansatz 30 min bei 85°C inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 µl Stop-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der DNA-Standard wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers markiert.

Für die Prähybridisierung wurde die Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre überführt und zunächst in 20 ml/100 cm² Membranoberfläche Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 1 % Blockierungsreagenz) 4 h bei 68°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Diese Lösung wurde dann durch eine vorgewärmte Hybridisierungslösung (20 ml/100 cm² Membranoberfläche) ersetzt, welche die frisch denaturierte (10 min Inkubation bei 95°C, dann sofort auf Eis abkühlen), DIG-markierte DNA-Sonde enthielt, und über Nacht bei 68°C inkubiert. Unspezifisch gebundene DNA wurde durch Waschen der Membran mit Lösung 1 (2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) bei RT (2 x 5 min) und nachfolgendem Waschen mit Lösung 2 (0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) bei 68°C (2 x 15 min) entfernt.

Für den immunologischen Nachweis der DNA:DNA-Hybride wurde die Membran kurz in Maleinsäure-Puffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, mit NaOH (fest) auf pH 7,5 (20°C) einstellen) gewaschen und 30 min in ca. 50 ml 1 %igem Blockierungsreagenz (1:10 Verdünnung der Stamm-Lösung (10 % (w/v) in Maleinsäure-Puffer) geschwenkt. Diese Lösung wurde durch 20 ml 1 %ige Blockierlösung ersetzt, die 2 µl eines Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugats enthielt (das entspricht einer 1:10000 Verdünnung, End-Konz. 75 mU/ml) und 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in Maleinsäure-Puffer gewaschen und danach 5 min in Detektions-Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl) äquilibriert. Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt und mit 1-2 ml CDP-*Star*TM-Lösung 5 min inkubiert und dann einige Minuten bis zu mehreren Stunden in einem Luminescent Image Analyzer (Fujifilm) exponiert. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die AIDA-Software (Version 2.0, Raytest Isotopenmessgerät GmbH) eingesetzt.

5.12 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona, 1987), zur Kontrolle von Transformanten, Insertions- und Deletionsmutanten sowie zur ortsgerichteten Mutagenese (siehe 5.14) eingesetzt. Bei der PCR wird mit Hilfe zweier Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzen, und einer DNA-Polymerase das betreffende DNA-Fragment dupliziert. Durch die Wiederholungen des Zyklus, der aus Denaturierung der DNA, dem Anlagern der Oligonukleotide („Annealing“) und der DNA-Kettenverlängerung („Extension“) besteht, kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Durch Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase können viele solcher Zyklen durchlaufen werden, ohne dass nach jedem Denaturierungsschritt die DNA-Polymerase neu zugesetzt werden muss (Tindall und Kunkel, 1988).

Die PCR wurde in einem Thermo-Cycler (Primus 25 von MWG-Biotech oder PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research) durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Komponenten richtete sich nach den jeweiligen Versuchsbedingungen. Als Annealing-Temperatur wurde die Temperatur gewählt, die 4°C unter dem niedrigsten T_m -Wert der Primer lag. Der T_m -Wert wurde durch die Nukleotid-Zusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt ($T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$). Dabei wurden nur die Nukleotide der Primer in die Berechnung einbezogen, die bereits im ersten Zyklus mit der Matrizen-DNA

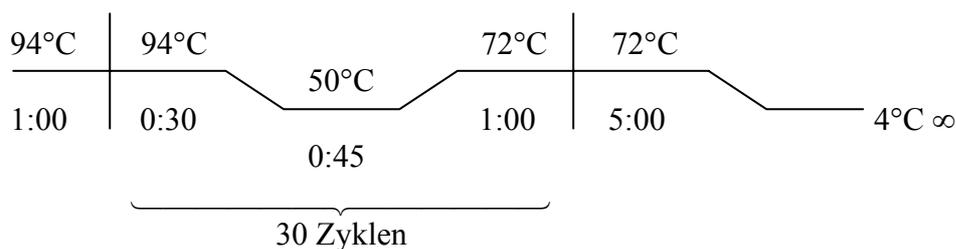
hybridisierten. Der Zeitraum der DNA-Kettenverlängerung wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert, wobei routinemäßig 1 min pro 1000 Basen berechnet wurde.

Für Routineamplifikationen wurde *Taq*-DNA-Polymerase und Puffer aus dem PCR-Kit von Qiagen (Hilden) eingesetzt. Zur Herstellung von PCR-Produkten mit einer möglichst geringen Fehlerrate wurde der „Expand™ High Fidelity“-PCR-Kit von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Dieser Kit enthält ein Gemisch aus *Taq*- und *Pwo*-DNA-Polymerase. Im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase besitzt die ebenfalls thermostabile *Pwo*-DNA-Polymerase eine sogenannte „Proofreading“-Funktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität), wodurch die Fehlerrate bei der Kettenverlängerung signifikant verringert wird (Barnes, 1994). Alle als Primer eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 3 aufgeführt.

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	1 µg
dNTP Mix	0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Primer vorwärts	40 pmol (Endkonzentration 0,4 µM)
Primer rückwärts	40 pmol (Endkonzentration 0,4 µM)
10 x Puffer (15 mM MgCl ₂)	10 µl
ddH ₂ O	ad 100 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl (= 5 U)

Reaktionsbedingungen (Beispiel):



5.13 Kolonien-PCR

Zur Kontrolle von *C. glutamicum*-Transformanten auf Anwesenheit des gewünschten Plasmids wurden Zellen der zu untersuchenden Klone direkt von der Platte mit einer Pipettenspitze abgenommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden die restlichen an der Pipettenspitze haftenden Bakterien in 100 µl Wasser resuspendiert, ausreichend geschüttelt und 10 min bei 95°C inkubiert. Durch das Erhitzen auf 95°C wurden

die Zellen lysiert und somit die zu analysierende Plasmid-DNA freigesetzt. Nach erneutem Schütteln wurden 5 µl dieser Suspension in einem 50 µl PCR-Ansatz als Matrize eingesetzt.

5.14 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene® nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Mutation wurden zwei komplementäre Oligonukleotide ausgewählt, die im zentralen Bereich die gewünschte Mutation enthielten und außerdem durch eine „stille“ Mutation eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle besaßen, die eine Unterscheidung von Ausgangsplasmid und mutiertem Plasmid mittels Restriktionsanalyse ermöglichen sollte. Die für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide wurden durch das Programm „The Primer Generator“ (Turchin und Lawler, 1999) ermittelt und sind einschließlich der eingeführten Restriktionsschnittstellen in Tab. 3 zusammengestellt. Zur Überprüfung der Mutagenese wurde das Kontrollplasmid pWhitescript™ verwendet, das eine Mutation im *lacZ*-Gen enthält. Durch die Mutagenese mit den Kontrollprimern (#1 und #2) wurde das intakte *lacZ*-Gen wiederhergestellt, was durch Blau-Weiß-Selektion auf Indikatorplatten, die IPTG (20 µl einer 100 mM Lösung) und X-Gal (20 µl einer 10 %igen (w/v) Lösung in Dimethylformamid (DMF)) enthielten, kontrolliert werden konnte. Bei erfolgreicher Mutagenese waren die Kolonien aufgrund der β-Galactosidase-Aktivität blau gefärbt.

Für die Mutagenese-Reaktion wurden folgende Ansätze hergestellt:

Mutagenese-Reaktion

5 µl 10 x Reaktionspuffer
 x µl Plasmid (5-50 ng)
 x µl Primer-forward (125 ng)
 x µl Primer-reverse (125 ng)
 1 µl dNTP-Mix (10 mM, jedes 2,5 mM)
 1 µl *Pfu-Turbo* DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

ad 50 µl ddH₂O

Kontrollreaktion

5 µl 10 x Reaktionspuffer
 2 µl pWhitescript (10 ng)
 1,25 µl Primer #1 (125 ng)
 1,25 µl Primer #2 (125 ng)
 1 µl dNTP-Mix
 1 µl *Pfu-Turbo* DNA-Polymerase
 (2,5 U/µl)

ad 50 µl ddH₂O

Die Mutagenese-Reaktion erfolgte in einem Thermo-Cycler (Primus 25, MWG Biotech) nach folgendem Schema:

Denaturierung der DNA	30 s	95°C	}	1 x
Denaturierung der DNA	30 s	95°C		
Primer-„Annealing“	60 s	55°C	}	16 x
Primer-„Elongation“ (2 min/kb)	12 min	68°C		

Im ersten Zyklus binden die Primer nur an die Ausgangs-DNA. Nach der Elongation entsteht eine Heteroduplex aus einem zirkulären Wildtypstrang und einem mutierten Strang, der dort, wo das elongierte 3'-Ende auf das 5'-Ende des Primers trifft, eine Lücke („Nick“) enthält. Der mutierte Strang ist demnach ein lineares Molekül. Nach erneuter Denaturierung können die Primer auch an die von der *Pfu*-DNA-Polymerase neu synthetisierten Stränge binden, aber nicht elongiert werden. Daraus folgt, dass bei allen durchlaufenen Zyklen ausschließlich die Ausgangs-DNA als Matrize für die Neusynthese der mutierten Stränge dient. Dadurch werden Fehler, die bei den neuen Strängen in seltenen Fällen auftreten können, nicht amplifiziert. Nach 16 Zyklen erhält man so ein Verhältnis 16:1 von mutierten Strängen zu Ausgangs-DNA. Das Ausgangsplasmid wurde aus *E. coli* DH5 α isoliert und war daher durch die DNA-Adenin-Methylase (*dam*-Genprodukt) methyliert. Die DNA-Adenin-Methylase transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die N6-Position des Adenin-Restes in der Sequenz GATC, die bei einem G+C-Gehalt von 50 % durchschnittlich einmal in 256 bp vorkommt. Der in der Mutagenese-Reaktion neu synthetisierten DNA fehlt diese Methylierung. Die Parental-DNA wurde mit *DpnI* geschnitten, einem Restriktionsenzym, welches spezifisch die hemimethylierte oder vollständige methylierte Sequenz 5'-Gm6ATC-3' schneidet. Es wurde 1 μ l *DpnI* (10 U/ μ l) je Reaktionsansatz hinzugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert.

E. coli[®] XL1-Blue superkompetente Zellen (Stratagene) wurden mit 1 μ l des *DpnI*-geschnittenen Mutagenese-Ansatzes transformiert. Die Transformationseffizienz wurde mit 1 μ l des pUC18-Plasmids (0,1 ng/ μ l) überprüft. Die transformierten Zellen wurden auf selektive LB-Platten ausplattiert und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolierung aus mehreren Klonen und eine Analyse mit dem Restriktionsenzym, für das eine neue Schnittstelle eingefügt worden war. Eines der mutierten Plasmide wurde dann einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen.

5.15 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, 1977. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem „DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung von Primern durchgeführt, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD800 markiert waren. Dadurch sind alle Sequenzierungsprodukte fluoreszenzmarkiert und können durch das LI-COR 4200 DNA-Sequenziergerät (MWG-Biotech) detektiert werden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Alle eingesetzten Primer sind in Tab. 3 aufgeführt.

Für die Sequenzierung wurde zunächst ein DNA/Primer-Premix nach folgendem Schema erstellt:

DNA/Primer-Premix: x μ l DNA (130 ng pro kb Ausgangs-DNA)
 2 μ l Primer (4 pmol)
 0,7 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO)
 ad 21 μ l H₂O

Je 4 μ l dieses Ansatzes wurden auf 4 PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit je 1 μ l der ddATP-, ddCTP-, ddGTP- bzw. ddTTP-Terminationsgemische versetzt. Die Sequenzierung wurde nach dem unten angegebenen Schema in einem Thermocycler durchgeführt:

Reaktionsbedingungen (Beispiel):

Denaturierung der DNA	2 min	95°C	} 30 x
Denaturierung der DNA	40 s	95°C	
Primer-„Annealing“	40 s	55°C	
Primer-Elongation	1 min	70°C	

Als Annealing-Temperatur wurde die Temperatur gewählt, die 4°C unter dem niedrigsten T_m-Wert der Primer lag (siehe 5.12). Nach Ablauf der Reaktion wurden zu jeder Probe jeweils 6 μ l Stop-Lösung aus dem Sequencing-Kit hinzugefügt. Unmittelbar vor dem Beladen des Sequenziergels wurden die Ansätze 2 min bei 94°C denaturiert. Es wurden je 1-1,5 μ l Probe pro Gelspur aufgetragen. Für die Herstellung eines 66 x 25 cm großen Sequenziergels mit einer Dicke von 0,25 mm wurde folgende Lösung hergestellt:

21 g	Harnstoff
5,0 ml	10 x TBE (890 mM Tris, 890 mM Borsäure (Sigma), 20 mM EDTA)
4,6 ml	„Long Ranger“-Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (50 %, Biozym)
0,5 ml	DMSO
32 ml	Aqua dest.
50 µl	TEMED
350 µl	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Laufbedingungen:

Spannung	2200	V
Strom	37	mA
Leistung	50	W
Temperatur	45	°C

Der Sequenzlauf wurde mit Hilfe des Programms „Data Collection Modell 4200 Single Dye DEV7“ Version 4.1 aufgezeichnet und mittels des Programms „Image Analysis Version 4.1“ ausgewertet. Die hieraus erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit dem UWGCG-Software-Paket analysiert (Devereux *et al.*, 1984).

5.16 Konstruktion von Deletionsmutanten

Deletionsmutanten von *C. glutamicum* wurden durch eine Kombination von „Cross-over“-PCR (Link *et al.*, 1997) und homologer Rekombination mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994), der in *C. glutamicum* nicht replizieren kann, konstruiert. Für die „Cross-over“-PCR wurde zunächst der 5'-flankierende Bereich des/der zu deletierenden Gens/Gene inklusive der ersten 57 Codons (Primer Delta-...-1 und Delta-...-2) bzw. der 3'-flankierende Bereich inklusive der letzten 39 Codons (Primer Delta-...-3 und Delta-...-4) des/der zu deletierenden Gens/Gene in einer PCR amplifiziert. Die inneren Primer (Delta-...-2 und Delta-...-3) besaßen eine 21 bp lange komplementäre Sequenz an ihrem 5'-Ende, die nicht von der *C. glutamicum*-DNA abgeleitet wurde. Die äußeren Primer (Delta-...-1 und Delta-...-4) enthielten eine Restriktionsschnittstelle, die für die Klonierung in pK19*mobsacB* genutzt wurde. Die beiden resultierenden PCR-Produkte wurden gereinigt und in einer anschließenden „Cross-over“-PCR mit den äußeren Primern als Matrize eingesetzt. Durch die Komplementarität der Enden, konnten die beiden Fragmente über die 21-bp-Sequenzen miteinander hybridisieren und verlängert werden, so dass ein Fusionsprodukt mit

der gewünschten Deletion entstand. Das PCR-Produkt wurde verdaut und mittels der terminalen Schnittstellen in den entsprechend verdauten Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Dieser Vektor ist mobilisierbar (enthält einen „origin of transfer“, *oriT*) und kann in *C. glutamicum* nicht replizieren. Nachdem das klonierte PCR-Fragment durch Sequenzierung überprüft worden war, wurden fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation in *C. glutamicum* eingebracht und der Transformationsansatz auf BHIS-Platten mit 15 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Bei Kanamycin-resistenten Klonen sollte das Plasmid mittels homologer Rekombination über eine der beiden flankierenden Sequenzen in das Chromosom integriert worden sein. Zur Überprüfung, ob das *sacB*-Gen noch intakt war, wurde die Integrationsmutante auf BHI-Agar mit Kanamycin (15 µg/ml) und Saccharose (10 % (w/v)) ausplattiert. Das *sacB*-Gen kodiert für das Exoenzym Levansucrase, welches Saccharose in Glucose und das Fructose-Polymer Levan umsetzt (Bramucci und Nagarajan, 1996). Dieses Polymer verhindert das Wachstum vieler gram-negativer und gram-positiver Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder *C. glutamicum*. Wie erwartet war nur auf den Platten ohne Saccharose Wachstum möglich. Um auf ein zweites Rekombinationsereignis zu selektieren, wurden Kanamycin-resistente Klone für 24 h in BHI-Medium kultiviert und anschließend auf BHIS-Platten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Auf diesem Medium sollten nur Zellen überleben, bei denen aufgrund einer zweiten homologen Rekombination das Plasmid aus dem Chromosom deletiert worden ist, so dass daher keine Levansucrase mehr gebildet wurde und die Kanamycin-Resistenz verloren ging. Hierbei kann entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt werden. Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden zunächst mittels Kolonien-PCR und anschließend durch Southern-Blot-Analyse überprüft.

6 Biochemische Methoden

6.1 Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle und Zellfraktionierung

E. coli-Zellen aus einer Expressionskultur wurden durch 10-minütige Zentrifugation (5200 g, 4°C) geerntet, einmal mit Aufschlusspuffer gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Bei der Reinigung von Proteinen mit „His-Tag“ diente TNI5-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) als Aufschlusspuffer, bei der Reinigung von Proteinen mit *Strep*-tag II TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). In beiden Fällen wurden die Zellen in 4 ml Aufschlusspuffer/g Feuchtgewicht resuspendiert. Bei der Reinigung von Proteinen, die mit dem Maltose-Bindeprotein fusioniert worden waren, wurden die Zellen in TKMD-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂,

5 mM DTT) resuspendiert. Unmittelbar vor dem Aufschluss wurde Proteaseinhibitor und zum Abbau der DNA 0,25 mg/ml DNase I hinzugefügt. Als Proteaseinhibitor diente Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), das in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt wurde, oder ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete Mini EDTA-free von Roche Diagnostics, Mannheim) in der Konzentration, die vom Hersteller angegeben wurde. Der Zellaufschluss erfolgte durch 4-5-malige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO[®] Spectronic Instruments) bei einem Druck von 108 MPa. Anschließend wurden noch intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min bei 27000 g, 4°C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstands (90 min bei 150000 g, 4°C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Je nach Bedarf wurde entweder der Überstand oder die sedimentierten Membranen für weitere Untersuchungen herangezogen. Die Zellfraktionen wurden durch SDS-PAGE analysiert.

Für den Aufschluss von *C. glutamicum*-Zellen wurden diese durch eine 10-minütige Zentrifugation (5200 g, 4°C) geerntet, einmal mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und in 4 ml Aufschlusspuffer (1 mM PMSF und 0,25 mg/ml DNase I in TE)/g Feuchtgewicht resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte in einer French-Press-Zelle (SLM AMINCO[®] Spectronic Instruments) bei 207 MPa. Die Effizienz des Aufschlusses wurde mikroskopisch kontrolliert und der Aufschluss ggf. bis zu sechsmal wiederholt. Anschließend wurden intakte Zellen sowie große Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min bei 27000 g, 4°C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (90 min bei 150000 g, 4°C), die zur Sedimentation der Membranen führte. Bis zur weiteren Verwendung wurde sowohl der Überstand als auch die sedimentierten Membranen auf Eis gelagert.

6.2 Zellaufschluss mit Amalgamator und Zellfraktionierung

C. glutamicum-Zellen (ca. 1,5 g Feuchtgewicht) wurden in 0,5 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, 1 mM PMSF) suspendiert und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß mit 0,5 g Glastperlen (0,13-0,15 mm Ø, BioSpec Products, Bartlesville, Oklahoma, USA) überführt. Die Zellen wurden dreimal 30 s in einem Amalgamator (Silamat, Vivadent) mechanisch aufgeschlossen. Nach jedem Durchgang wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 17600 g, 4°C) abgetrennt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde entweder einer Ultrazentrifugation (90 min bei 150000 g, 4°C) unterzogen, um die Membranproteine von den cytoplasmatischen Proteinen zu trennen, oder direkt für weitere Untersuchungen eingesetzt.

6.3 Solubilisierung von CgtS4 aus *E. coli*-Membranen

Zum Solubilisieren von CgtS4 aus den *E. coli*-Membranen wurden diese nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation (150000 g) im gleichen Volumen TNI5-Puffer aufgenommen, in dem das Zellpellet vor der Fraktionierung resuspendiert wurde (siehe 6.1). Diese Membransuspension wurde tropfenweise mit einer 10 %igen (v/v) Lösung von Lauryldimethylamin-N-Oxid (LDAO, Calbiochem-Novabiochem Corporation) in Wasser bis zu einer Endkonzentration von 1 g LDAO/g Protein versetzt und 30 min mit einem Rührfisch auf Eis gerührt. Um solubilierte Proteine von den Membranen zu trennen, erfolgte eine erneute Ultrazentrifugation (90 min, 150000 g). CgtS4 befand sich nun im Überstand und wurde anschließend über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 6.4.1) oder über StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie (siehe 6.4.3) aufgereinigt.

6.4 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

6.4.1 Affinitätschromatographie mittels Ni²⁺-Nitrilotriacetic-Acid (NTA)-Agarose

Die Aufreinigung von Proteinen, die einen C-terminalen Histidin-„Tag“ enthielten, erfolgte über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Porath *et al.*, 1975). Dafür wurden 15 ml-Polypropylen-Säulen mit 4 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) gefüllt, was einem Bettvolumen von 2 ml entspricht, und anschließend mit einer „Fritte“ abgedeckt. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) äquilibriert. Die Zahl im TNI-Puffer gibt die mM Imidazolkonzentration an. Anschließend wurden 4-5 ml des Ultrazentrifugations-Überstandes (siehe 6.1) auf die Säule gegeben. Um störende Partikel zu entfernen, wurde der Ultrazentrifugations-Überstand zuvor filtriert (0,2 µM-Filter). Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 ml TNI5- und 10 ml TNI30-Puffer entfernt. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit 10 x 1 ml TNI100-Puffer (CgtR4-His) bzw. TNI200-Puffer (CgtS4-His) eluiert. Proteine, die dann immer noch an die Ni²⁺-Ionen gebunden waren, wurden entweder durch Waschen mit 10 ml TNI400 oder durch Entfernen der Ni²⁺-Ionen mit 10 ml des EDTA enthaltenen „Strip“-Puffers (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA) entfernt. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 10 µl des Eluats mit jeweils 250 µl „Coomassie-Plus“-Protein-Assay-Reagenz (Pierce) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung zeigte an, ob die Fraktion Protein enthielt oder nicht. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei 4°C

gelagert oder sofort in 0,5 x Bindungspuffer umgepuffert (6.5). Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

6.4.2 Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz

Die Aufreinigung von Proteinen, die als Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein vorlagen, erfolgte über 15 ml Polypropylen-Säulen (Qiagen, Hilden), die mit 10 ml Amylose-Harz-Suspension (Amylose gebunden an Agarose; New England Biolabs) gefüllt waren, was einem Bettvolumen von 5 ml entsprach. Nach Abdecken der Säule mit einer Fritte wurde diese mit 5 Bettvolumen TKMD-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂ und 5 mM DTT) äquilibriert und mit 4-5 ml des filtrierten Ultrazentrifugations-Überstands beladen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 4 Bettvolumen TKMD-Puffer. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit 10 x 1 ml TKMD-Puffer, der 10 mM Maltose enthielt, eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden wie unter 6.4.1 beschrieben qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht und die proteinhaltigen Fraktionen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

6.4.3 Affinitätschromatographie mittels StrepTactin-Sepharose

Die Aufreinigung von Proteinen, die einen C-terminalen „*Strep*-tag II“ enthielten (Sequenz: WSHPQFEK), erfolgte über Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose (Skerra und Schmidt, 2000). Auf eine 15 ml Polypropylen-Säule wurden 4 ml StrepTactin-Sepharose (IBA, Göttingen) aufgetragen, woraus ein Bettvolumen von 2 ml resultierte. Um das Austrocknen des Säulenmaterials zu verhindern, wurde dieses nach dem Absetzen mit einer Fritte abgedeckt. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) äquilibriert. Anschließend wurden 1-2 ml des filtrierten Ultrazentrifugations-Überstands auf die Säule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 ml Puffer W entfernt, spezifisch gebundene Proteine wurden mit 10 x 1 ml Puffer E (Puffer W, 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Um die Säule zu regenerieren, wurde sie mit 30 ml Puffer R (Puffer W, 1 mM 4'-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure (HABA)) gewaschen. Ein Farbumschlag von gelb nach rot weist auf die Vollständigkeit des Regenerationsprozesses hin. Die eluierten Fraktionen wurden wie unter 6.4.1 beschrieben qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht und die proteinhaltigen Fraktionen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

6.4.4 Affinitätsreinigung von putativen Targetgenen von CgtSR4 mittels Dynabeads® Streptavidin

Zur Identifizierung von putativen Zielgenen, die durch das Zweikomponenten-System CgtSR4 reguliert werden, sollte ein spezifischer Bindungsassay durchgeführt werden. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Immobilisierung des Antwortregulators CgtR4-Strep an Dynabeads® Streptavidin (Dynal A. S, Oslo, Norwegen). Dabei handelt es sich um uniforme, supermagnetische „Beads“, die mit Streptavidin beschichtet sind. Auf diese Weise können Proteine, die mit einem *Strep*-tag II fusioniert sind, nicht-kovalent an die „Beads“ gebunden werden. Im folgenden Experiment wurden die Dynabeads® Streptavidin dazu verwendet, das *Strep*-tag II getaggte CgtR4-Protein zu immobilisieren, um so DNA-Fragmente aufzureinigen, die durch den Antwortregulator spezifisch gebunden werden.

Für die Immobilisierung von CgtR4-Strep wurde entweder das gereinigte Protein oder Rohextrakt des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)/pET24-CgtR4Strep mit den „Beads“ inkubiert. Dabei wurde das Protein in 5-fachem Überschuss eingesetzt unter der Annahme, dass 5-10 µg eines biotinylierten Antikörpers durch 1 mg „Beads“ gebunden werden kann. Pro Assay wurden 100 µl resuspendierte Dynabeads® Streptavidin in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und dreimal mit 500 µl Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA) gewaschen. Die Waschschrte erfolgten durch Sedimentation und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur in einem Dynal MPC-1 Magnethalter. Anschließend wurden die Dynabeads® Streptavidin in 100 µl Aufschlusspuffer resuspendiert, mit 500 µl Proteinrohextrakt versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (1000 Upm) inkubiert, damit die Dynabeads® Streptavidin nicht sedimentierten. Es folgten fünf Waschschrte mit 500 µl Puffer TN (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2 % Nonidet P-40) und drei mit 500 µl Bindepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 75 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zuletzt wurden die mit Protein beladenen Dynabeads® Streptavidin in 100 µl Bindepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die eigentliche Affinitätsreinigung wurden 300 µg chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* geschnitten, die beide eine 6 bp Erkennungssequenz besitzen und daher durchschnittlich 2 kb große DNA-Fragmente erzeugen sollten. Der Verdau wurde über Nacht durchgeführt und seine Vollständigkeit durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit Puffer TM (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂) auf eine Endkonzentration von 0,5 µg DNA/µl verdünnt und zusammen mit CgtR4-Strep-beladenen Dynabeads® Streptavidin für 30 min bei

Raumtemperatur geschüttelt (1000 Upm). Nach der Inkubation wurde der Ansatz dreimal mit 500 µl Bindepuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA zu eliminieren. Anschließend wurde die gebundene DNA mit 2 x 250 µl Elutionspuffer I (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), mit 2 x 80 µl Elutionspuffer II (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 600 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) und 2 x 50 µl Elutionspuffer III (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,2 M NaCl, 10 mM MgCl₂) eluiert. Die vereinigten Eluate I-III wurden mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt, mit 3,5 µl 1 M MgCl₂ und 1 µl einer Oligonukleotidlösung (1 µg/µl) als Carrier versetzt und Ethanol-gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 15 µl H₂O aufgenommen und der gesamte Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt.

Um das Bindungsverhalten des Antwortregulators auch unter phosphorylierten Bedingungen zu untersuchen, wurden die CgtR4-Strep-beladenen Dynabeads[®] Streptavidin mit BeF_x inkubiert. Dazu wurden die Protein-gekoppelten „Beads“ vor der DNA-Bindung in 500 µl Bindepuffer resuspendiert, der 100 µM BeCl₂ und 10 mM NaF enthielt, und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt (1000 Upm). Die beladenen Dynabeads[®] Streptavidin wurden in 100 µl Bindepuffer (+ 100 µM BeCl₂, 10 mM NaF) resuspendiert und mit der restriktionsverdauten DNA gemischt, der zuvor ebenfalls BeCl₂ und NaF zugesetzt wurden. Die folgenden Waschschriffe wurden ebenfalls in Gegenwart von BeF_x durchgeführt, die Elution erfolgte ohne Zugabe von BeCl₂ und NaF.

Zur Regeneration wurden die Dynabeads[®] Streptavidin 1 x mit 500 µl Elutionspuffer III, 2 x mit 500 µl Puffer TN und 3 x mit 500 µl Aufschlusspuffer gewaschen, abschließend in 100 µl Aufschlusspuffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

6.5 Pufferaustausch mit Hilfe von PD-10-Säulen (Pharmacia)

Die Umpufferung von Proteinen in 0,5 x Bindungspuffer (siehe 7.1) erfolgte mittels Gelfiltration mit Sephadex G-25 (PD-10-Säulen, Pharmacia). Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 25 ml des gewünschten Puffers, wurde 1 ml der gewünschten Proteinlösung auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde das Protein mit 10 x 0,5 ml des gewünschten Puffers eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden „gepoolt“ und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

6.6 Proteinbestimmung

6.6.1 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce, Rockford) durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Da diese Cu^{1+} -Ionen selektiv durch Bichinolydicarbonsäure (BCA) colorimetrisch detektiert werden können, ist eine Quantifizierung der Proteine möglich. Durch die Chelatbildung von zwei Molekülen BCA mit einem Kupfer-Ion wird ein blau-violett gefärbtes Produkt gebildet. Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, die in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear zu der Proteinkonzentration ist. Die Absorption wurde in einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer von Pharmacia bestimmt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) eine Verdünnungsreihe (von 25 $\mu\text{g/ml}$ bis 2 mg/ml) hergestellt und je 50 μl der verschiedenen Verdünnungen mit je 1 ml „Working Reagent“ versetzt, das durch Mischen des BCA-Reagenz A mit dem BCA-Reagenz B (50:1) hergestellt worden war. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze auf RT abgekühlt und die Absorption bei 562 nm gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde eine Eichkurve erstellt. Die Proben wurden so verdünnt, dass die Proteinkonzentrationen im linearen Bereich des Tests lagen. Von jeder Probe wurden zwei verschiedene Verdünnungen gemessen.

6.6.2 Proteinbestimmung nach dem Bio-Rad Protein Assay

Proteinkonzentrationen wurden routinemäßig nach der Methode von Bradford mit dem „Bio-Rad Protein Assay“ bestimmt (Bradford, 1976). Das Prinzip beruht auf der Bindung des Säurefarbstoffs „Coomassie Brilliant Blue“ G250 an aromatische und basische Aminosäure-Reste, insbesondere Arginin. Durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein kommt es zu einer Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form, was im sauren Milieu zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm führt. 200 μl der Bio-Rad Stammlösung, bestehend aus Farbstoff, Phosphorsäure und Methanol, wurden mit 800 μl einer verdünnten Proteinlösung versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Messungen erfolgten in einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer von Pharmacia.

6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970. Tab. 6 gibt die Zusammensetzung der Gellösungen für Trenn- und Sammelgele wieder. Die Volumina sind für zwei Minigele (80 x 100 x 0,75 mm, MiniProtean II-Apparatur, Bio-Rad) berechnet. Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Proben aus der Zellfraktionierung und der Affinitätschromatographie in *E. coli* sowie Rohextrakte aus *C. glutamicum* wurden mit 6 x Probenpuffer (350 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 6 % β -Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, nach Amersham Pharmacia Biotech) gemischt und 10 min bei 95°C denaturiert. Fraktionierte Proteinproben aus *C. glutamicum* wurden mit einem Volumen 2 x SDS-Probenpuffer (117 mM Tris-HCl pH 6,8, 3,3 % (w/v) SDS, 2 % β -Mercaptoethanol, 10 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Cytoplasmatische Proteine aus dem Rohextrakt wurden vor dem Auftragen 10 min bei 95°C denaturiert. Membranproteine wurden entweder ebenfalls 10 min bei 95°C oder 20 min bei 60°C denaturiert. Als Proteingrößenstandard wurde der „Broad Range Protein Marker“ von New England Biolabs verwendet.

Tab. 6: Zusammensetzung der Gellösungen für die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.

	12 %	15 %	6 %
	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	2,5 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (w/v)	4 ml	5 ml	2 ml
10 % SDS (w/v)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
dH ₂ O	3,35 ml	2,35 ml	5,35 ml
10 % Ammoniumpersulfat (w/v)	50 μ l	50 μ l	50 μ l
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 μ l	10 μ l	10 μ l

6.8 Färbung von Gelen mit kolloidalem Coomassie (Pierce)

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele dreimal 15 min mit bidest. H₂O gewaschen, 1 h in ca. 20 ml GelCode[®]Blue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und dann überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. H₂O (1 bis 24 h) entfernt.

6.9 Western-Blot

Zur immunologischen Detektion von Proteinen durch Western-Blotting wurden die Proteine nach Auftrennung im SDS-Gel durch elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond-C extra, Amersham Life Science) mit Hilfe einer Mini-Trans-Blot Transfer Zelle (BioRad Laboratories) übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Das Polyacrylamidgel wurde nach Abschluss der Elektrophorese 15-30 min bei RT in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membran und sechs auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-3MM-Papiere wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde das Blot-Sandwich folgendermaßen aufgebaut: In die offene Kassette wurde zunächst auf die Kathodenseite ein mit Transferpuffer gesättigtes Kunststoffpolster, nachfolgend drei getränkte Whatman-3MM-Papiere, das äquilibrierte Gel, die äquilibrierte Membran, drei Whatman-3MM-Papiere und erneut ein getränktes Kunststoffpolster gelegt. Die Kassette wurde verschlossen, in die dafür vorgesehene Halterung eingeschoben und in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Der Kühlkern wurde ebenfalls eingesetzt und die Kammer mit Transferpuffer befüllt, bis das Blot-Sandwich vollständig überschichtet war. Der Transfer erfolgte 1 h bei 100 V.

Zur immunologischen Detektion der Proteine wurde die Membran zunächst 1-2 h in Blockierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20, 5 % (w/v) Milchpulver) bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 10 min mit TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20) gewaschen und 2 h bei RT mit dem primären Antikörper, der spezifisch für das zu untersuchende Protein ist, inkubiert. Sowohl das Antiserum gegen CgtS4 als auch das gegen CgtR4, die beide aus Kaninchen stammen, wurden 1:1000 in 1 x Blockierungspuffer verdünnt. Nach zwei weiteren Waschstritten mit TTBS (je 5 min) wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper („Goat-anti-rabbit-IgG alkaline phosphatase conjugate“, BioRad Laboratories) in einer 1:3000 Verdünnung in Blockierungspuffer eine Stunde bei RT inkubiert. Bevor die Farbreaktion durchgeführt wurde, erfolgten weitere Waschstritte des Blots in Blockierungslösung (2 x), TTBS (2 x) und einmal in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl). Das alkalische Phosphatase-Konjugat wurde mit Nitrotetrazoliumblau (300 µg/ml; Stammlösung 30 mg/ml

in 70 % (v/v) Dimethylformamid) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Natriumphosphat (200 µg/ml; Stammlösung 20 mg/ml in H₂O) in alkalischem Phosphatase-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) detektiert. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen der Membran in dest. H₂O (5 min) gestoppt. Anschließend wurde die Membran getrocknet.

6.10 Phosphorylierungs-Experimente

Gereinigtes CgtS4-His (1,07-1,60 µM) wurde mit oder ohne CgtR4-Strep (1,98-5,94 µM) mit radioaktiv markiertem γ -[³²P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Bioscience, Freiburg) versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Endkonzentration an ATP betrug 26,78-40,17 µM. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet wurde, erfolgte in Zeitabständen von 1-60 min die Probenentnahme von 7 µl-Aliquots. Diese wurden mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Ladepuffer (124 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 4,6 % SDS, 1,4 M β -Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenolblau) gemischt, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Bis alle Proben entnommen waren, wurden diese auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (ohne vorherige Inkubation bei 95°C!). Nach der Elektrophorese wurde die Lauffront der Gele abgetrennt, die Gele auf Whatman-3MM-Papier transferiert und unter Vakuum 45-60 min bei 80°C getrocknet. Die Analyse der phosphorylierten Proteine auf den Gelen erfolgte mit einem PhosphoImager-System (Fuji BAS 1800) unter Verwendung des Softwareprogramms Aida 2.11 (Raytest Straubenhardt).

6.11 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität zur Analyse der transkriptionellen Aktivität spezifischer Promotor-Fusionen

Zur Konstruktion und Charakterisierung transkriptioneller Fusionen mit dem *cat*-Reporter-gen wurde der autonom replizierende „Shuttle“-Vektor (*E. coli* – *C. glutamicum*) pET2 verwendet (Vasicova *et al.*, 1998), der zur Analyse von Promotoraktivitäten in einem „multicopy“ System in *C. glutamicum* eingesetzt werden kann. Die transkriptionelle Aktivität von spezifischen Promotoren kann durch Messung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität, ein Enzym, welches durch das *cat*-Reporter-gen kodiert wird, getestet werden. Die putativen Promotoren des *pst*- und *ugp*-Operons aus *C. glutamicum* wurden in den Vektor pET2 kloniert (Malgorzata Krause). Die resultierenden Plasmide pET2-*pst* und pET2-*ugp* sowie das Leerplasmid pET2 wurden in die zu untersuchenden *C. glutamicum*-Stämme

eingebraucht. Um die erhaltenen Daten mit Ergebnissen der Transkriptomanalyse vergleichen zu können, wurden die Stämme unter exakt gleichen Bedingungen kultiviert wie für die DNA-Chip-Experimente. Die Expression des *cat*-Reportergens, kontrolliert durch den vorangeschalteten, zu untersuchenden Promotor, wurde durch Messung der CAT-Aktivität untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 50 ml 0,08 M Tris-HCl (pH 7) gewaschen und in 1 ml Puffer resuspendiert. Es folgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall (Cyclus 0,5, Amplitude 55 %, 6 min Puls, Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH). Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (1 h, 13000 g, 4°C) und der erhaltene Rohextrakt bis zur Bestimmung der CAT-Aktivität auf Eis gelagert. Die CAT-Aktivität wurde photometrisch mit einem UV-Visible Spectrophotometer (UV-160 1PC, Shimadzu) bei 412 nm und 37°C bestimmt. Die Chloramphenicol-Acetyltransferase katalysiert dabei die Acetylierung von Chloramphenicol.

Reaktion:



Das reduzierte CoA reagiert mit 5,5'-Dithionitrobenzoesäure (DTNB) zu Disulfid-CoA und Thionitrobenzoesäure sowie einem molaren Äquivalent an freiem 5-Thio-2-Nitrobenzoat. Letzteres besitzt bei 412 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und kann photometrisch bestimmt werden.

Die Durchführung erfolgte in einem 1 ml-Ansatz nach folgendem Schema:

0,9 M Tris-HCl, pH 7,8	100 μl
0,9 mM Acetyl-CoA (frisch angesetzt)	100 μl
DTNB [3,6 mg/ml] (frisch angesetzt)	100 μl
Rohextrakt	20-100 μl
ddH ₂ O	ad 900 μl

Nach Vorwärmen der Proben auf 37°C (ca. 5 min) wurde die Messung durch Zugabe von 100 μl Chloramphenicol (2,5 mM) gestartet. Die Aktivität wurde nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ($E = \epsilon \times d \times c$) berechnet. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (siehe 6.6.2).

6.12 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen CgtR4

Die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen CgtR4-His wurde durch K. L. Schimz nach eigenem Protokoll durchgeführt (persönliche Mitteilung). Nachdem das Prä-Immuneserum des zu immunisierenden Kaninchens in seiner Reaktion gegen *C. glutamicum* Rohextrakt getestet wurde, erfolgte die Auftrennung von 300 µg des durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteins CgtR4-His durch SDS-PAGE und die Färbung mit kolloidalem Coomassie. Die Proteinbande von CgtR4-His wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in eine „X-Press“-Zelle (Bachhofer) überführt, für 48 h bei -25°C tiefgefroren und homogenisiert. 4,3 g des jetzt Creme-artigen Gels wurden mit Adjuvanz (MPL+TDM+CWS-Emulsion; Sigma, Deisenhofen) in 2,8 ml 0,9 % NaCl und 1,5 ml „Incomplete Freund’s Adjuvanz“ (Sigma, Deisenhofen) gründlich vermengt. $\frac{2}{3}$ dieses Gemisches (= 200 µg Antigen) wurde einem Kaninchen als erste Immunisierung injiziert, die zweite Immunisierung („Boost“) erfolgte zwei Wochen später mit 100 µg Antigen, die dritte Immunisierung wurde acht Wochen später mit 150 µg Antigen durchgeführt. Die erste Blutung wurde sechs Wochen nach der ersten Injektion vorgenommen und 12 Wochen nach der ersten „Boost“-Reaktion wurde die finale Blutung durchgeführt. Das Antiserum wurde bei -20°C gelagert.

6.13 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

6.13.1 Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-Fingerabdruck-Analysen wurden entweder Gelstückchen aus Proteinbanden von Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mit Pasteurpipetten ausgestochen oder vollständige Proteinbanden mit einem Skalpell herausgeschnitten, zerkleinert und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis und Langen, 1997). Die Gelstückchen wurden 2 x 10 min mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat gewaschen und anschließend in 30 % (v/v) Acetonitril (ACN) für 20 min in einer Vakuumzentrifuge (Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY) getrocknet. Die Proben wurden mit 1 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/µl Trypsin („Sequencing grade modified Trypsin“, Promega, Mannheim) rehydratisiert und nach 20 min erfolgte die Zugabe von weiteren 2 µl 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin. Anschließend wurden die Proben bei 37°C über Nacht verdaut. Durch die Zugabe von 6 µl Wasser, 15 min Inkubation, Zugabe von 5 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30 % (v/v) ACN und nochmals 10 min Inkubation wurden die Peptide eluiert. Bis zur Massenspektrometrie wurden die Peptide bei -20°C gelagert.

6.13.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

0,5 µl der erhaltenen Peptidlösung wurden auf einer Probenplatte mit 0,5 µl einer gesättigten Lösung von α -Cyano-4-Hydroxy-trans-Zimtsäure in 50 % (v/v) ACN, 0,25 % (v/v) TFA gemischt. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der „Calibration Mixtures“ 1 und 2 des „Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“ (Applied Biosystems, Weiterstadt), die unmittelbar neben dem Probenspot aufgetragen wurden. Die Analyse der Proben erfolgte in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die „Voyager Control Panel Software 5.0“ und die „Voyager Data Explorer Software 3.5“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der GPMW-Software 4.0 (Lighthouse Data) oder dem MS-Fit-Programm (Clauser *et al.*, 1999) genutzt. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten, wobei der Unterschied zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen durfte und die Fehler der einzelnen Peptide einem Muster folgten, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte.

7 Analyse von DNA-Protein-Interaktionen

7.1 Gelretardationsexperimente

Um zu untersuchen, ob CgtR4 an putative Zielgene binden kann, wurden die Promotorregionen dieser Gene (300 bp stromaufwärts des Startcodons) in einer PCR amplifiziert, über ein Agarosegel gereinigt und anschließend mit γ -[³²P]-ATP und T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert (siehe 5.10). ADP und nicht umgesetztes ATP wurden mittels „PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) entfernt. Um CgtR4 zu phosphorylieren, wurde eine Verdünnungsreihe des His-getaggten Proteins (0,1-12,5 µM) in 0,5 x Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin) in einem 20 µl Ansatz mit 20 µM MalE-CgtS4kin und 10 mM ATP für 1 h bei 37°C inkubiert. Nicht-phosphorylierte Ansätze wurden entweder in Abwesenheit von ATP oder aber ohne ATP und MalE-CgtS4kin für 1 h bei 37°C inkubiert. Bei größeren Screening-Ansätzen wurden, soweit nicht anders beschrieben, nur zwei Verdünnungen von CgtR4-His getestet (2 µM und 10 µM). Direkt im Anschluss wurde die Bindungsreaktion in 1 x

Bindungspuffer angesetzt. Der 20 µl Ansatz enthielt 2 µg poly-(dI-dC) als Kompetitor-DNA, ca. 1 nM des markierten DNA-Fragments und je 4 µl aus den verschiedenen CgtR4-His-Ansätzen (End-Konz. 0,02-2,5 µM). Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze mit 2 µl einer 0,1 %igen Xylencyanol-Lösung versetzt und 11 µl auf ein 10 %iges natives Polyacrylamidgel (Acrylamid:Bisacrylamid 75:1) geladen. Als Gel- und Elektrophorese-Puffer diente 0,5 x TBE (1 x TBE = 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 180 V für ca. 70 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier für 1,5 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und mittels eines PhosphorImagers (Fuji BAS 1800) ausgewertet. Um die Spezifität einer Bindung nachzuweisen, wurde der Ansatz mit der höchsten CgtR4-His-Konzentration doppelt angesetzt und mit einem 80- oder 100-fachen Überschuss unmarkierter DNA-Sonde bzw. poly-(dI-dC) versetzt.

8 Genexpressionsanalysen

8.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Methode des Kits beruht auf einer Lyse der Bakterien in Gegenwart von Guanidinisothiocyanat (GITC) und β-Mercaptoethanol, die zu einer sofortigen Inaktivierung der RNasen führt und somit die Isolierung intakter RNA gewährleistet. Anschließend wird die RNA in Gegenwart von Ethanol und einer speziellen, hochkonzentrierten Salz-Puffer-Lösung (RNeasy, Qiagen) an eine Silicagel-Membran adsorbiert, die selektiv einzelsträngige RNA-Moleküle ab einer Größe von 200 bp bindet.

Ca. 20 ml einer *C. glutamicum*-Kultur wurden in vorgekühlte, mit 25 g Eis beladene 50 ml Falcon-Gefäße gefüllt und abzentrifugiert (5 min, 4200 g, 4°C). Das Zellpellet wurde entweder direkt zur RNA-Präparation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -75°C gelagert. Für die weitere Präparation wurden die abzentrifugierten Zellen in 350 µl RLT-Puffer (RNeasy, Qiagen) resuspendiert und in Gegenwart von 250 mg Zirkonium/Silica-Perlen (Ø = 0,1 mm, ROTH, Karlsruhe) 30 s in einem Amalgamator mechanisch aufgeschlossen (Silamat, Vivadent, Ellwangen). Nach Abtrennen von Zelltrümmern und intakten Zellen durch Zentrifugation (2 min, 14000 g) wurde der Überstand mit 250 µl Ethanol (abs.) vermischt, auf die RNeasy-Säulchen aufgetragen und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Die Membran wurde mit 350 µl RW1 Puffer (RNeasy, Qiagen) gewaschen (15 s, 8000 g) und anschließend wurde ein Mix aus 10 µl

DNase I (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden) und 70 µl RDD Puffer (RNase-free DNase Set, Qiagen, Hilden) auf die Säulchenmembran gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und mit 500 µl RPE Puffer (RNeasy, Qiagen) gewaschen. Die Säulchen wurden für 15 s bei 8000 g zentrifugiert und erneut mit 500 µl RPE Puffer gewaschen (2 min, 14000 g). Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, um restliches Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde die RNA mit 30-50 µl Nuklease-freiem H₂O eluiert (1 min, 8000 g). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 5.3). Die Reinheit (E_{260}/E_{280} , i.d.R. 1,7-2,0) wurde außerdem durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -20°C.

8.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden von gleichen Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (20-25 µg) synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Die cDNA-Sonden wurden durch Umschreibung präparierter RNA in DNA mittels reverser Transkriptase und Zufalls-Hexamer-Primern synthetisiert. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 570 nm, grün, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 670 nm, rot, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet.

20-25 µg der jeweiligen RNA wurde in einem 15 µl Ansatz mit 500 ng Zufalls-Hexanukleotid-Primern (in ddH₂O gelöst, Amersham Pharmacia) für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis (2 min), wurde die reverse Transkription durchgeführt. Der Ansatz (30 µl) enthielt 3 µl Cy3-dUTP (1 mM) oder Cy5-dUTP (1 mM), 6 µl 1.Strang Puffer (End-Konz. 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0,6 µl Nukleotidmix (End-Konz. 500 µM dATP, dGTP, dCTP, 200 µM dTTP, Invitrogen) und 2 µl Superscript-II Reverse Transcriptase (End-Konz. 400 U; Life Technologies, Inc., Rockville, MD) (Wendisch *et al.*, 2001). Nach der cDNA-Synthese (110 min, 42°C) wurde die RNA durch Zusatz von 10 µl NaOH (0,1 N) hydrolysiert (10 min, 70°C) und mit 10 µl HCl (0,1 N) neutralisiert. Um nicht eingebaute Nukleotide abzutrennen, wurde der Ansatz (50 µl) mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt und mittels Ultrazentrifugationseinheiten (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach) eingengt. Die Cy3- und Cy5-markierten Sonden wurden vereinigt, wieder mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt und

erneut bis auf ein Volumen von 14,5 µl eingeengt. Die so erhaltene Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNA der zu vergleichenden RNA-Proben wurde sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

8.3 DNA-Chip-Technologie

Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Chip-Technologie zur Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster und das verwendete Robotersystem zur Herstellung von DNA-Chips beruht auf dem an der Stanford University entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996) und wurde am Institut für Biotechnologie durch Dr. Volker F. Wendisch und Dr. Tino Polen etabliert (Lehnen *et al.*, 2002; Polen, 2002; Wendisch *et al.*, 2001). Dabei werden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2000). Detaillierte Informationen sind zusätzlich im Internet unter MGuide, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide> zu beziehen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Chips wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe V. F. Wendisch zur Verfügung gestellt.

Auf die Chips wurden 3530 PCR-Produkte (ca. 300-500 bp) von 3567 putativen *C. glutamicum*-Genen aufgebracht. *C. glutamicum* ATCC13032 diente als Matrize für die Amplifizierung der Genfragmente mittels PCR. Die verwendeten Primer wurden durch die Firma GeneScan AG (Freiburg) synthetisiert. Für die spätere Immobilisierung der DNA auf dem Chip wurden die DNA-Chip-Glasobjektträger zunächst mit Poly-L-Lysin beschichtet (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2000). Die Auftragung der PCR-Produkte (150-300 ng/µl) erfolgte mit einem computergesteuerten Robotersystem auf eine Fläche von 2 cm x 2 cm auf einen Objektträger. Dabei wurden etwa 0,1-1 nl PCR-Produkt pro Spot aufgetragen. Die Spots hatten einen Durchmesser von etwa 60-120 µm. Neben den PCR-Produkten der amplifizierten *C. glutamicum*-Gene wurden zusätzlich Hybridisierungskontrollen (Lambda-DNA, PCR-Produkt eines *E. coli*-Gens und genomische DNA von *E. coli*) auf den Chip aufgebracht. Für die Datennormalisierung (siehe 8.7) wurde genomische *C. glutamicum*-DNA an verschiedenen Stellen auf dem Chip angeordnet.

8.4 Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Bevor die hergestellten DNA-Chips in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden, erfolgte eine chemische Nachbehandlung. Diese diente einerseits der Blockierung von Nukleinsäure-bindenden ε-Aminogruppen freier Seitenketten von Poly-L-Lysin an Stellen, an denen keine DNA aufgetragen wurde, und andererseits zur Immobilisierung der DNA. Zur Erzeugung hybridisierungsfähiger einzelsträngiger DNA aus der doppelsträngigen DNA

erfolgte eine thermische Nachbehandlung. Um die mögliche Verlustrate von DNA-Chips zu minimieren, erfolgte jede Nachbehandlung mit nur 10 DNA-Chips, die in kurzer Zeit (max. 5 Wochen) durch Hybridisierungsexperimente verbraucht wurden.

Für eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Spot-Fläche, wurden die DNA-Chips im ersten Schritt der Nachbehandlung durch Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (Sigma, Deisenhofen) über der Oberfläche einer 1 x SSC-Lösung inkubiert (100 ml, 30 s - 15 min). Da die aufgetragene DNA zur Herstellung der DNA-Chips ursprünglich in 3 x SSC-Lösung gelöst vorlag, zieht das getrocknete Salz und die DNA innerhalb jeder Spot-Fläche Wasser aus der umgebenden feuchten Kammerluft an. Die Spots auf den DNA-Chips rehydratisierten, was an der Bildung von die Spot-Fläche umspannenden Wassertröpfchen zu erkennen war. Während der Inkubation (30 s - 15 min) verteilen sich infolge der Brown'schen Molekularbewegung die DNA-Moleküle, deren negativ geladene Phosphatreste noch nicht ausreichend durch die positiv geladenen ϵ -Aminogruppen der Poly-L-Lysin-Seitenketten fixiert wurden. Zur Fixierung der DNA-Moleküle auf der Oberfläche erfolgte nach dem Rehydratisieren eine „Blitztrocknung“ für 5 Sekunden bei 100°C (Shalon *et al.*, 1996). Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (650 μ J, UV-Stratalinker, Stratagene) erneut auf den Objektträger immobilisiert. Zum Blockieren der freien Poly-L-Lysin beschichteten Oberfläche, die nicht mit DNA bedeckt war, erfolgte eine 25-minütige Inkubation in Methyl-2-Pyrrolidinon-Lösung (0,2 M Bernsteinsäure-Anhydrid, 50 mM Na-Borat). Dabei reagieren die ϵ -Aminogruppen der freien Seitenketten des Poly-L-Lysins mit Bernsteinsäure-Anhydrid zu einem Amid (Shalon *et al.*, 1996). Unmittelbar danach wurden die DNA-Chips für 1,5 min in 95°C heißem Wasser zum Denaturieren der DNA-Doppelstränge inkubiert. Um eine anschließende Renaturierung der DNA-Doppelstränge zu verhindern, wurden die Chips in eiskaltem Ethanol inkubiert (2 min, 95 % Ethanol, 4°C) und auf diese Weise die DNA-Einzelstränge „fixiert“. Danach erfolgte zur Trocknung eine Zentrifugation (5 min, 50 g). Die trockene Lagerung der nachbehandelten DNA-Chips bis zu ihrer Verwendung erfolgte im Exsikkator (Shalon *et al.*, 1996).

8.5 DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Die vereinigten und aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden wurden dazu in 20 μ l Hybridisierungspuffer (20 μ g Poly-A; 3 x SSC; 25 mM HEPES pH 7,0, 0,23 % (v/v) SDS) für 2 min bei 100°C denaturiert und anschließend für

5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Poly-A (Sigma, Deisenhofen) diente als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz und die Endkonzentration von 3 x SSC sicherte stringente Hybridisierungsbedingungen (Zimmer *et al.*, 2000). Vor der Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA (2 cm x 2 cm) ein Spezialdeckgläschen gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung über der DNA-Chip-Fläche sicher zu stellen (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA). Damit die Probenlösung während der Hybridisierung bei 65°C nicht austrocknet, wurden zur Gewährleistung einer ausreichend hohen Feuchtigkeit in der Kammer mehrfach kleine Tropfen 3 x SSC-Lösung am Rand des DNA-Chips aufgetragen, dann die vorbereitete Probenlösung unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer wasserdichten Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., York Haven, USA) 5 h bis 16 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte DNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen der DNA-Chips für je 5 min in 1 x SSC/0,03 % (w/v) SDS und danach in 0,05 x SSC bei Raumtemperatur (Zimmer *et al.*, 2000). Durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

8.6 Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips

Um die mRNA-Spiegel zu bestimmen, wurde die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Da das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben korreliert, ist es ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel 1 (Shalon *et al.*, 1996).

Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenePix 4000 A laser scanner (Axon Inc., USA) verwendet. Die DNA-Chip-Oberfläche (10 x 10 µm Raster) wird zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppe von Cy3- und Cy5-dUTP mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen bestrahlt, je eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und Cy5-dUTP (635 nm), und die daraufhin emittierte Fluoreszenz wird mit lichtempfindlichen Kathoden bei 570 nm (Cy3-Fluoreszenz) und bei 670 nm (Cy5-Fluoreszenz) registriert. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird. Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert (GenePix Pro 3.0 Software). Hierdurch

wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die ‚GenePix Array List‘ (erstellt von T. Polen) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen bzw. zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen (genomische *C. glutamicum*-DNA, λ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *E. coli*).

8.7 Auswertung von DNA-Chips

Die Berechnung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{Spot-Hintergrund}}$. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um die durch die Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen *et al.*, 1998). Die Normalisierung erfolgte für jeden DNA-Chip über die genomische DNA von *C. glutamicum*.

Anhand des Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisses, das bei Hybridisierung der Sonden mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* gemessen wurde und gleich 1 sein sollte (Eisen *et al.*, 1998), wurden die einzelnen Spots normiert. Dazu wurde aus den einzelnen Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnissen der gesamten auswertbaren Spots genomischer DNA der Mittelwert bestimmt. Der Kehrwert dieser Mittelwerte diente als Korrekturfaktor zur Normalisierung. Bei Multiplikation des Korrekturfaktors mit dem experimentellen Ergebnis ergibt sich im Mittelwert ein Verhältnis von 1 für die chromosomale DNA. Die Verhältnisse aller genspezifischen Spots wurden dann mit diesem Faktor multipliziert (Khodursky *et al.*, 2000). Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die Berechnung von p-Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, EXCEL 2000, Microsoft). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhaltnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhaltnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky *et al.*, 2000). Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit p-Werten $>0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant verändert gegenüber der genomischen DNA betrachtet.

Ein p-Wert von 0,05 bedeutet, dass die ermittelten relativen RNA-Level sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von den mRNA-Levels genomischer DNA unterscheiden.

IV ERGEBNISSE

1 Identifizierung und Charakterisierung der Gene des Zweikomponenten-Systems CgtSR4 aus *C. glutamicum*

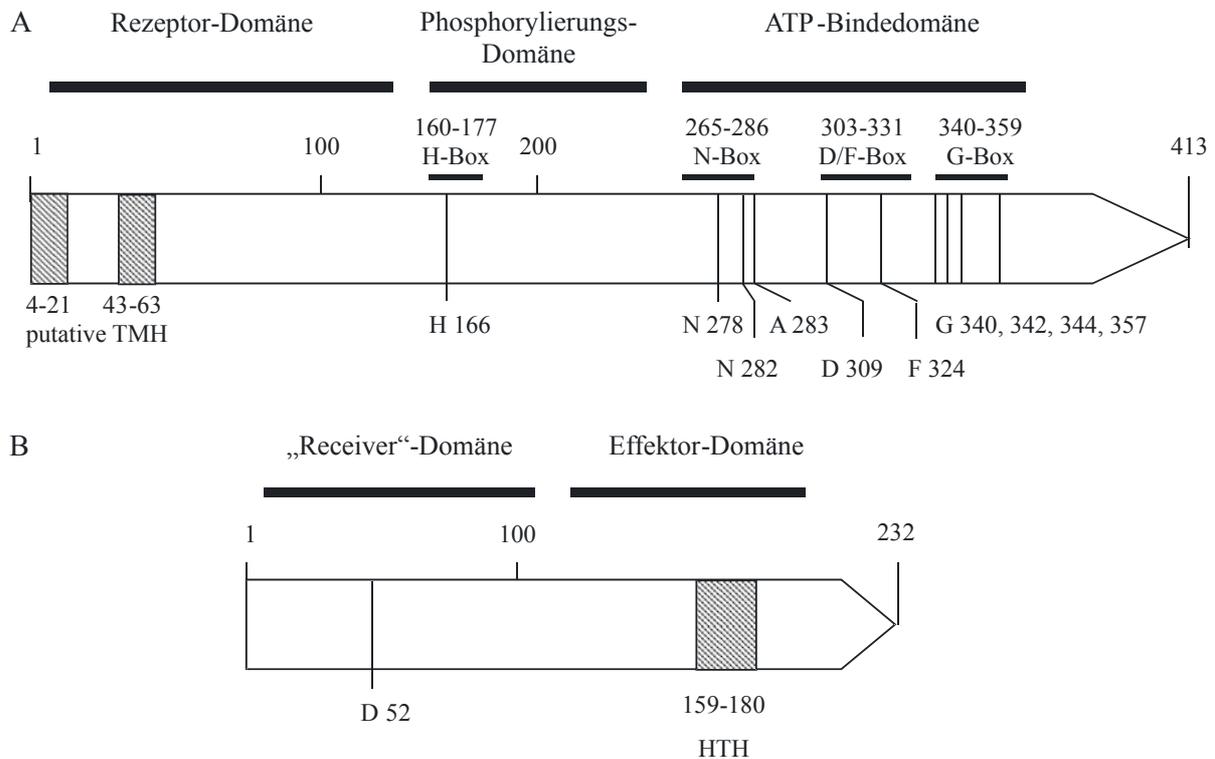


Abb. 7: Domänenorganisation der Sensorkinase CgtS4 (A) und des „Response“-Regulators CgtR4 (B) aus *C. glutamicum*. (A) Die Sensorkinase besteht aus einer N-terminalen Rezeptor-Domäne und der C-terminalen Kinase-Domäne. Die Kinase-Domäne ist aus der Phosphorylierungs-Domäne mit dem phosphorylierten Histidin-Rest und der ATP-bindenden Domäne mit den N-, D-, F- und G-Boxen zusammengesetzt. (B) Der „Response“-Regulator besteht aus einer N-terminalen „Receiver“-Domäne, die den phosphorylierten Asparat-Rest enthält und einer C-terminalen Effektor-Domäne mit einem DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motiv.

Das Zweikomponenten-Regulationssystem CgtSR4 wurde im Rahmen der Genomsequenzierung durch die Degussa AG in dem Gram-positiven Aminosäure-Produzenten *Corynebacterium glutamicum* identifiziert. Es besteht aus der Sensorkinase CgtS4 und dem Antwortregulator CgtR4. Das *cgtS4*-Gen besitzt eine postulierte Länge von 1242 bp und kodiert für ein Protein aus 413 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 45165 Da. Die Sensorkinase CgtS4 gehört zur Klasse I der Histidin-Proteinkinasen und zeigt einen typischen modularen Aufbau. Sie besteht aus einer N-terminalen Sensor-Domäne und einer Kinase-Domäne und enthält die konservierten Sequenzmotive H-, N-, D-, F- und G-Box, die für Sensorkinasen charakteristisch sind (siehe Abb. 7A). Eine Datenbanksuche mit der Proteinsequenz von CgtS4 ergab, dass es in den phylogenetisch nah mit *C. glutamicum*

verwandten Spezies *C. efficiens*, *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *Streptomyces coelicolor* homologe Proteine mit 82, 67, 53, 52 und 41 % Identität gibt. Wie in dem Sequenzalignment in Abb. 8 zu erkennen ist, sind insbesondere die Phosphorylierungs-Domäne und die ATP-Bindedomäne stark konserviert, aber auch im N-terminalen Bereich, der vermutlich für die Reizerkennung verantwortlich ist, gibt es signifikante Übereinstimmungen.

Das direkt stromabwärts von *cgtS4* lokalisierte Gen des Antwortregulators *cgtR4* hat eine Größe von 699 bp und kodiert für ein Protein aus 232 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 25999,9 Da. CgtR4 gehört zur PhoB- und OmpR-Subfamilie und wirkt somit als Transkriptionsregulator (siehe Abb. 7B). Das Sequenzalignment in Abb. 9 macht deutlich, dass es wie im Fall von CgtS4 in den Spezies *C. efficiens* (87 % Identität), *C. diphtheriae* (81 % Identität), *M. tuberculosis* (70 % Identität), *M. leprae* (68 % Identität) und *S. coelicolor* (67 % Identität) sehr stark konservierte Proteine gibt. Es ist daher anzunehmen, dass die homologen Systeme die gleiche Funktion haben wie CgtS4/CgtR4 in *C. glutamicum*. Insofern haben also die Untersuchungen mit *C. glutamicum* auch für die genannten Organismen Relevanz.

Abb. 8 (nächste Seite): Sequenzalignment der Sensor kinase CgtS4 aus *C. glutamicum* mit homologen Proteinen aus *C. efficiens*, *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *S. coelicolor*. Aminosäuren, die in mindestens drei Sequenzen identisch sind, wurden schwarz unterlegt, konservativ ausgetauschte Aminosäuren grau. Die putativen Transmembranhelices (TMH), die charakteristischen H-, N-, D-, F- und G-Boxen sowie die Bereiche, die für die Synthese von Peptidantikörpern ausgewählt wurden, sind gekennzeichnet. Der phosphorylierbare Histidin-Rest innerhalb der H-Box ist mit einem Stern markiert.

		— putative TMH-1 —		— putative TMH-2 —	
<i>C. glutamicum</i>	1	VSTLLAFV	LGVVLMGLALPAYTKIKDRMR---	RHKSAVTLSENQVTTVGGQVHLHAIQGSF	
<i>C. efficiens</i>	1	MSTFFAFL	LGVVVAGLALPAYGWAKERFR---	RHKSAATTLAENQVTTVGGQVHLHAIQGSF	
<i>C. diphtheriae</i>	1	MYVVI	AFVVLGVL	SGLALPA	LKWVVRG-----RSYRTAKKGNKVVTTVSQMLHLITVQGSF
<i>M. tuberculosis</i>	1	VTVFSALL	LAGVLS	SALALAVGGA	VMRLTSRVVEQQRQVATEWSGITVVSQMLQCVITLMP
<i>M. leprae</i>	1	VTVFSALL	LAGVLS	GLAFVVGIV	AGIRLSPRLIERRORLANEWAGITVVLQMLQRIIALMP
<i>S. coelicolor</i>	1	MDVNA	AVAAVAAT	AGVLT	GVIAVLAERWSEERQKRPTRTSLHTDPVLPFGVDTVLSVLR
		— Peptid-Seq. —			
<i>C. glutamicum</i>	58	TGITVVDRTG	VILSNGRAHEL	GI	VHE-RSVDGNVWRVAQEA
<i>C. efficiens</i>	58	TGITVVDRTG	VILSNGRAHSL	GI	VHQ-RTVNSDVWRVAQEA
<i>C. diphtheriae</i>	55	TGMAV	IDATGAVLLSN	VRSHEMG	IVHE-RILNPDLELAQEA
<i>M. tuberculosis</i>	61	IGA	AVDTHR	DVVYLN	RAKELGLVRD-RQLDDQAWRAARQALGGED
<i>M. leprae</i>	61	IGA	AVDTYR	DVVYLN	EQAKELGLVRD-RQLDDQAWRAAQAALGGDD
<i>S. coelicolor</i>	60	SSAV	VIDEADAV	VKASSA	AYALGLVRRGRLAVPMLQMARTRDGEIRQVELDLPRRN
		— H-Box —			
<i>C. glutamicum</i>	117	RPGSRITAV	QAVVKPLTLL	DDRFV	IYASDESENVRMESARRDFVANVSHELKTPVGGMA
<i>C. efficiens</i>	117	RPGNRVTA	VRAVVKPLTLL	DDRFV	IYATDESENVRMESARRDFVANVSHELKTPVGGMA
<i>C. diphtheriae</i>	113	---	NRITSVRA	VVKPLTLL	VDNRYVVIYSTDESENVORMEAAARRDFVANVSHELKTPVGGMA
<i>M. tuberculosis</i>	120	G--	RSGLSVH	GCHARLL	SEEDRRFAVVFVHDQSDYARMEAAARRDFVANVSHELKTPVGAMA
<i>M. leprae</i>	120	G--	RSGLSVH	GCHARLL	SEKDRRFVAVVFVHDQSDYVRMEAAARRDFVANVSHELKTPVGAMA
<i>S. coelicolor</i>	120	GR	GEALAV	SARVAPL	GR---SRLVLLLVEDLLEARRIEAVRRDFVANVSHELKTPVGALS
*					
<i>C. glutamicum</i>	177	LLAEAL	MESSDD	PEQVEY	FGSRLHREAHRMADMTNELISLSKLOGAERLPDMEPVQADDI
<i>C. efficiens</i>	177	LLAEAL	MEAVDD	PEQVEY	FGARLHREAHRMADMTNELISLSKLOGAERLPDMEPVKVDII
<i>C. diphtheriae</i>	170	LLAEAT	TEASDD	QEQVEY	FGNRLYKEAHLADMTNELISLSKLOGAERLPDLEPVSVDRV
<i>M. tuberculosis</i>	178	LLAEAL	ASADD	SETVRR	FAEKVLI
<i>M. leprae</i>	178	LLAEAL	ASADDA	ETVSR	FAEKVLI
<i>S. coelicolor</i>	176	LLSEAV	MDAADD	PEAVR	ERFAGRMQIEATRLTNLVQELIDLSRVQNDPDDAEPVRVDEL
		— N-Box —			
<i>C. glutamicum</i>	237	I	SEAIERTQ	LAADNAN	IELIRGDRIGVWVEADRSLLV
<i>C. efficiens</i>	237	I	DEAIERTQ	LAADNAQ	IELVVRGDRIDVWVNAERSLLV
<i>C. diphtheriae</i>	230	I	DEAIAR	NVLAADNAG	IELNRGKPCNAMVMGDMTLLV
<i>M. tuberculosis</i>	238	V	SEAIRH	KVAADNAD	IEVRTDAPSNL
<i>M. leprae</i>	238	V	SEAIAR	HKVAADTA	AEVRTDPPSGLRVLGDQTL
<i>S. coelicolor</i>	236	V	AEAI	DRCRHAA	GTKQITMAAGGTADLHVRGNRGQIAAALGNL
		— D/F-Box —		— G-Box —	
<i>C. glutamicum</i>	297	QSI	RN----	DVVMIR	VTRDRGIGIAPEDQGRVFERFRVDKARSRQTGGTGLGLAIVKHVM
<i>C. efficiens</i>	297	QNV	CN----	DVVMIR	VTRDRGIGIAPEDQGRVFERFRVDKARSRQTGGTGLGLAIVKHVM
<i>C. diphtheriae</i>	290	T	ISRD---	GRVLR	IRVTDNGIGISVENQKR
<i>M. tuberculosis</i>	298	R	RRRG----	ANIEI	AVTDRGIGIAPEDQERVFERFRGDKARSRATGGSGLGLAIVKHVA
<i>M. leprae</i>	298	R	RRRG----	DNIEI	AVTDRGIGIAPEDQERVFERFRGDKARSRATGGSGLGLAIVKHVA
<i>S. coelicolor</i>	296	A	RRVA	APGGDL	IEIAVTDQIGIGISEKDKERVFERFRVDPARSRATGGTGLGLAIVKHVV
		— Peptid-Seq. —			
<i>C. glutamicum</i>	353	ANHGG	SISL	WSRPGT	GSTFTLELPHYHESKEPAGSKQGP
<i>C. efficiens</i>	353	ANHGG	NISL	WSRPGT	GSTFTLELPHYHESKPAETPKRVGLD
<i>C. diphtheriae</i>	347	ANHGG	DVTL	WSRPGT	GSTFTLELPHYHETD-----T-----GRRKDK
<i>M. tuberculosis</i>	354	ANH	DGTIR	VWSK	PGTGSTFTLALPALTEAYHD-----DERPEQAREPELRSNRSQREHE
<i>M. leprae</i>	354	ANH	NGSIC	VWSK	PGTGSTFTLSIPAAPLYQDN-----DEQSGQPRGCDMWLNRQPQREHE
<i>S. coelicolor</i>	356	A	SHGGE	VTVWSA	EQQSGSTFTLRLEAGLARDRAQ---RRSDRAGLSAETERS
<i>C. glutamicum</i>	413	S	-----	-----	-----
<i>C. efficiens</i>	413	T	-----	-----	-----
<i>C. diphtheriae</i>	384	N	-----	-----	-----
<i>M. tuberculosis</i>	408	L	S	-----	-----
<i>M. leprae</i>	409	E	F	K	S
<i>S. coelicolor</i>	414	A	P	F	E

<i>C. glutamicum</i>	1	MTRILIVDEEESLADPLAFLLRKEGFDTIAGDGPTALVEFSRNEIDIVLLDMLPGMSG
<i>C. efficiens</i>	1	MTTILIVDEEESLADPLAFLLRKEGFDTIAGDGPTALVEFSRNDIDIVLLDMLPGMSG
<i>C. diphtheriae</i>	1	MTSILIVDEEESLADPLAFLLRKEGFDVVIAGDGPSALVEFDRNAIDIVLLDMLPGMSG
<i>M. tuberculosis</i>	1	MTSVLIVDEEESLADPLAFLLRKEGFEATVVTDGFAALAEFDRAGADIVLLDMLPGMSG
<i>M. leprae</i>	1	-----VSPPOGGFEPTVVTDGFAALAEFDRSGADIVLLDMLPGMSG
<i>S. coelicolor</i>	1	VTRVLVVEDEESFSDALSYMLRKEGFEVAIATTGPDGLDEFERNGADIVLLDMLPGLPG
		*
<i>C. glutamicum</i>	61	TDVCKELRVSSTVPVIMVTARDSEIDKVVGLELGADDYVTKPYSSRELIARIRAVLRRCG
<i>C. efficiens</i>	61	TDVCKELRLVSNVPVIMVTARDSEIDKVVGLELGADDYVTKPYSSRELIARIRAVLRRCG
<i>C. diphtheriae</i>	61	TDVCKRLRAVSSVPVIMVTARDSEIDKVVGLELGADDYVTKPYSSRELIARIRAVLRRCG
<i>M. tuberculosis</i>	61	TDVCKQLRARSSVPVIMVTARDSEIDKVVGLELGADDYVTKPYSAARELIARIRAVLRRCG
<i>M. leprae</i>	43	TDVYKQLRVRSSVPVIMVTARDSEIDKVVGLELGADDYVTKPYSAARELIARIRAVLRRCG
<i>S. coelicolor</i>	61	TEVCRQLRCRSNVPVIMVTAKDSEIDKVVGLEIGADDYVTKPFSARELIARIRAVLRRCG
		HTH-Motiv
<i>C. glutamicum</i>	121	VTETEAEELPDDQILEGGRVVRMDVDSHTVTVGCEFPVSMPLKEFDLLEYLIRNAGRVLTR
<i>C. efficiens</i>	121	DTEAEAAEDDQILEGGRVVRMDVDSHTVTVDCKAVNMPLKEFDLLEYLIRNAGRVLTR
<i>C. diphtheriae</i>	121	----E--TIEESDEILCSGRIHMDVVRHTVTVDCGEEISMPPLKEFDLLEYLMRNSGRVLTR
<i>M. tuberculosis</i>	121	D---D--DSEMSDGVLESGPVRMDVVRHVSVNGDTITLPLKEFDLLEYLMRNSGRVLTR
<i>M. leprae</i>	103	D---D--DSEISDGVLESGPLRMDVVRHVSVNGYAITLPLKEFDLLEYLMRNSGRVLTR
<i>S. coelicolor</i>	121	E-----PEEVAPAALEAGPVRMDVDRHVTVGCTKVDLPLKEFDLLEMLIRNAGRVLTR
<i>C. glutamicum</i>	181	GQLIDRIVGADYVGDTKTLDVHVKRLRSKIEEPPSRPRYLVTVRGLGYKFEEL
<i>C. efficiens</i>	181	GQLIDRIVGADYVGDTKTLDVHVKRLRSKIEEPPSRPRHLVTVRGLGYKYEL
<i>C. diphtheriae</i>	175	GQLIDRVGADYVGDTKTLDVHVKRLRSKIEEPPSAPCHVTIVRGLGYKYED
<i>M. tuberculosis</i>	176	GQLIDRVGADYVGDTKTLDVHVKRLRSKIEADPANPVHLVTVRGLGYKLEEG
<i>M. leprae</i>	158	GQLIDRVGADYVGDTKTLDVHVKRLRSKIEADPANPVHLVTVRGLGYKLES
<i>S. coelicolor</i>	175	MLIDRVGADYVGDTKTLDVHVKRLRAKIEPDEGAPRYLVTVRGLGYKLEP

Abb. 9: Sequenzalignment des Antwortregulators CgtR4 aus *C. glutamicum* mit homologen Proteinen aus *C. efficiens*, *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *S. coelicolor*. Aminosäuren, die in mindestens drei Sequenzen identisch sind, wurden schwarz unterlegt, konservativ ausgetauschte Aminosäuren grau. Der konservierte Aspartat-Rest ist mit einem Stern gekennzeichnet und das Helix-Turn-Helix-Motiv ist ebenfalls markiert.

Vergleicht man die Genanordnung der homologen Regulationssysteme mit der von *cgtSR4*, so fällt auf, dass mit Ausnahme von *S. coelicolor* die entsprechenden Gene immer stromabwärts des Gens für die Phosphoglyceratmutase liegen (siehe Abb. 10). Bis auf das SenX3/RegX3-System aus *M. tuberculosis* wurde bisher keines dieser Zweikomponenten-Systeme charakterisiert. Für *M. tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass die Gene *senX3* und *regX3* ein Operon bilden, das positiv autoreguliert wird (Himpens *et al.*, 2000). Über die Funktion von SenX3/RegX3 ist allerdings ebenfalls nichts bekannt. In *S. coelicolor* liegen die *cgtSR4*-homologen Gene divergent zum *phoU*-Gen, dessen Genprodukt in *E. coli* eine Rolle bei der Phosphatmangel-Antwort spielt.

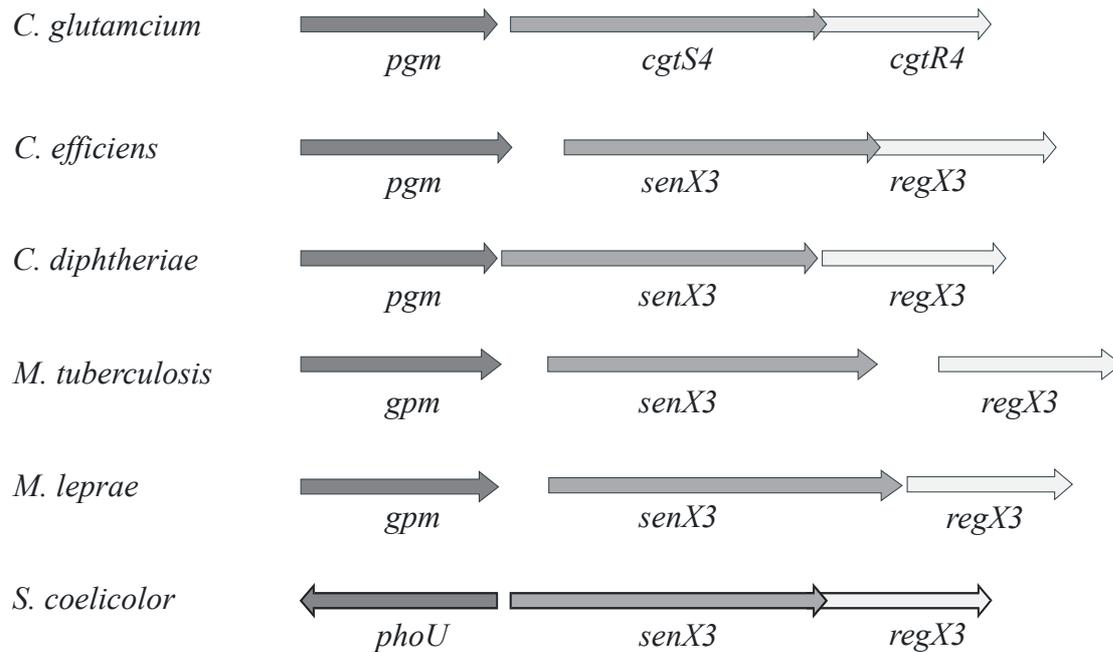


Abb. 10: Genanordnung CgtSR4-homologer Zweikomponenten-Systeme. *Pgm*, *gpm*, Phosphoglyceratmutase; *senX3*, Sensorkinase; *regX3*, Antwortregulator; *phoU*, mögliche Kontrolle des Pho-Regulons. Die Gennamen in *C. diphtheriae* und *S. coelicolor* wurden willkürlich nach den zuerst beschriebenen Genen in *M. tuberculosis* benannt.

2 Computergestützte Topologieanalysen der Sensorkinase CgtS4

Transmembrane α -Helices in Proteinen können durch Hydrophobizitätsanalysen mit relativ großer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden (Kyte und Doolittle, 1982). Aufgrund der Ladungsverteilung in den „Loops“, die die Membranhelices verbinden, lassen sich außerdem Rückschlüsse darauf gewinnen, ob diese „Loops“ auf der positiv oder der negativ geladenen Seite der Membran lokalisiert sind (Melen *et al.*, 2003). Mit Hilfe des im Internet zur Verfügung stehenden Programms TopPred 2 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>; Claros und von Heijne, 1994; von Heijne, 1992) wurde ein solcher „Hydrophobizitätsplot“ für die Sensorkinase CgtS4 erstellt (siehe Abb. 11).

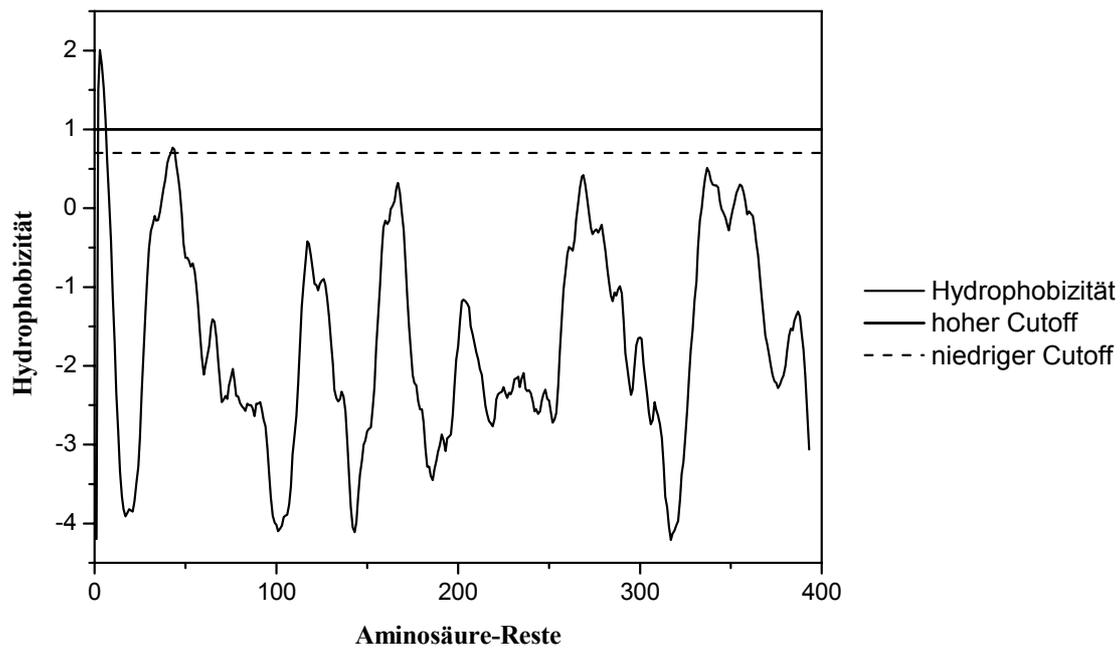


Abb. 11: Hydrophobizitätsprofil von CgtS4. Auf der y-Achse ist die durchschnittliche Hydrophobizität der einzelnen Aminosäure-Reste gemäß der Algorithmen von Kyte und Doolittle aufgetragen, die Anzahl der Aminosäure-Reste ist auf der x-Achse aufgetragen. Hydrophobizitätswerte größer als 1 deuten stark auf die Bildung einer Transmembranhelix hin.

Der postulierte N-Terminus von CgtS4 weist im Bereich der Aminosäuren 4-21 eine sehr hohe Hydrophobizität auf, was die Existenz einer Transmembranhelix in dieser Region sehr wahrscheinlich macht. Ein zweiter Bereich von mäßig hoher Hydrophobizität umfasst die Aminosäuren 43-63 und könnte eventuell auch eine Transmembranhelix bilden, wenn auch mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit. CgtS4 scheint also entweder über eine einzige Transmembranhelix in der Cytoplasmamembran verankert zu sein oder aber es besitzt zwei Transmembranhelices, die durch einen periplasmatischen „Loop“ aus circa 21 Aminosäuren verbunden sind. Hydrophobizitätsanalysen für die homologen SenX3-Proteine aus *C. efficiens*, *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* und *S. coelicolor* zeigten, dass auch sie am N-Terminus einen Bereich mit sehr hoher Hydrophobizität besitzen, der vermutlich eine Transmembranhelix bildet. Auch der zweite hydrophobe Bereich von CgtS4 ist in den homologen Proteinen vorhanden, allerdings variiert die Hydrophobizität relativ stark (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Putative Transmembranhelices in CgtS4 und SenX3 in *C. glutamicum* und nah verwandten Spezies. In Spalte 2 ist die Region der putativen Transmembranhelices angegeben, in Spalte 3 ist die durchschnittliche Hydrophobizität der putativen Helices aufgeführt. Werte größer als 1 deuten stark auf die Bildung einer Transmembranhelix hin.

	putative Transmembranhelices	durchschnittliche Hydrophobizität der Helices
<i>C. glutamicum</i>	4-21	2,241
	43-63	0,772
<i>C. efficiens</i>	5-24	2,221
	43-63	0,772
<i>C. diphtheriae</i>	2-24	2,134
	43-63	0,916
<i>M. tuberculosis</i>	7-29	2,071
	46-66	1,438
<i>M. leprae</i>	7-29	2,158
	46-66	0,692
<i>S. coelicolor</i>	7-29	2,061

Eine Analyse der zweiten hydrophoben Region von CgtS4 (Aminosäure-Reste 43-63) mit dem Programm „Helical Wheel Viewer for Alpha Helices“ (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>) ergab, dass die von diesem Bereich vermutlich ausgebildete α -Helix einen stark amphipatischen Charakter besitzt. Das heißt, die eine Seite der Helix besteht überwiegend aus hydrophoben Aminosäure-Resten, während die entgegengesetzte Seite einen hohen Anteil an hydrophilen Aminosäure-Resten enthält. Auch die entsprechenden Bereiche aus den homologen SenX3-Proteinen zeigten diese Eigenschaft, während die zum Vergleich analysierte N-terminale Transmembranhelix von CgtS4 praktisch nur aus hydrophoben Resten besteht (siehe Abb. 12). Eine amphiphile Helix könnte im Cytoplasma über ihre hydrophobe Region an die Membran assoziiert sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich die amphiphilen Helices eines CgtS4-Dimers zusammenlagern und in diesem Zustand tatsächlich die Membran durchspannen.

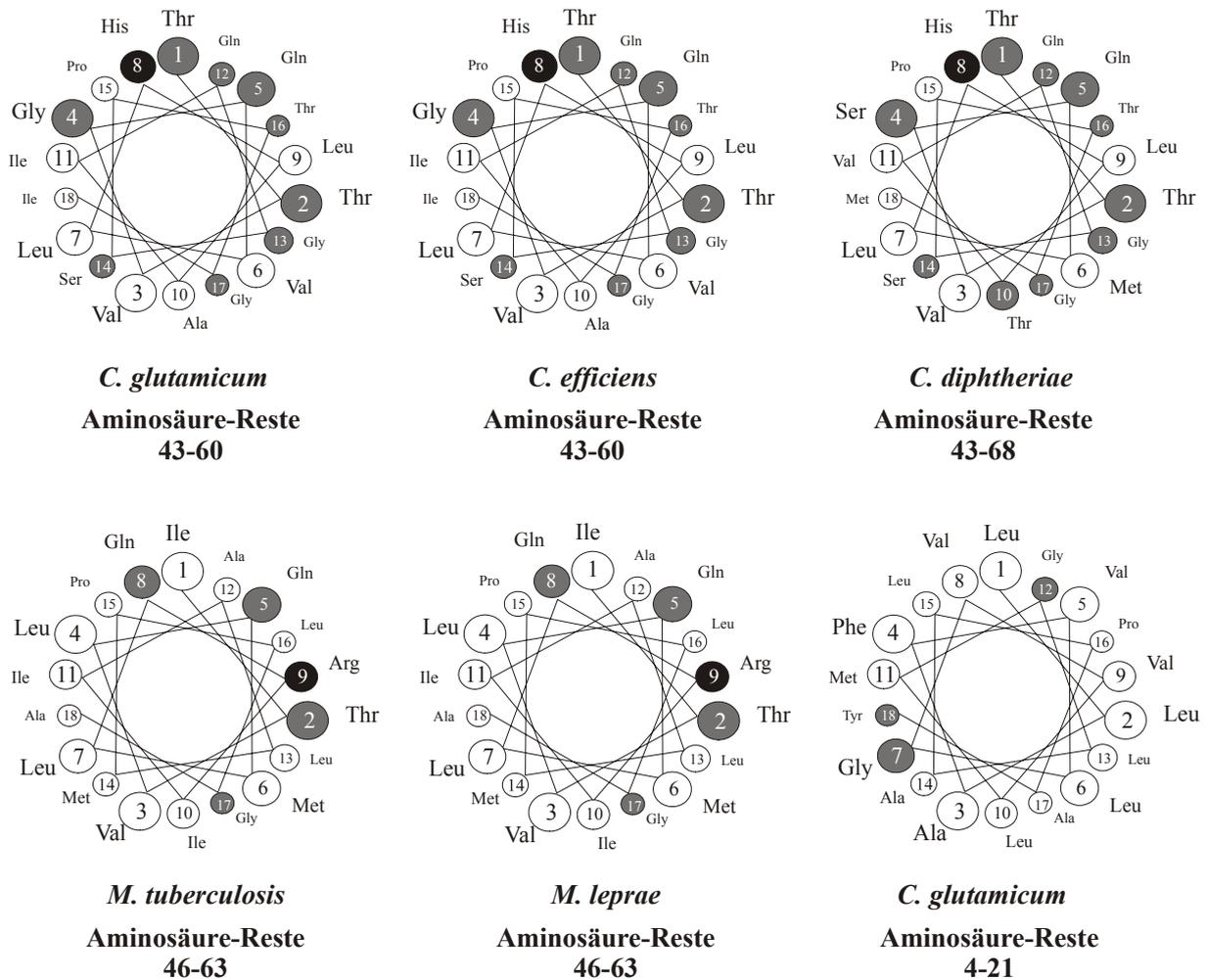


Abb. 12: Mögliche α -helicale Anordnung der Aminosäure-Reste der zweiten putativen Transmembranhelix von CgtS4 aus *C. glutamicum* bzw. SenX3 aus *C. efficiens*, *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis* und *M. leprae*. Zum Vergleich ist die N-terminale, stark hydrophobe Transmembranhelix von CgtS4 aufgeführt. Polare Aminosäure-Reste sind grau, geladene Aminosäuren schwarz und unpolare Aminosäuren weiß markiert.

3 Lokalisation der Sensorkinase CgtS4 in *C. glutamicum* 13032

Um nachzuweisen, dass CgtS4 in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, wurden Peptid-Antikörper gegen das Protein synthetisiert (Firma Eurogentec). Dazu wurden die Bereiche der Aminosäuren 107-121 (LDVHPDRNPRRPGSR) und 399-413 (RTTASKASGRRKEKS) ausgewählt. Die beiden synthetischen Peptide wurden mit Hilfe eines zusätzlichen N-terminalen Cystein-Restes an das Trägerprotein Hämocyanin gekoppelt und anschließend gemeinsam zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Um die Spezifität der erhaltenen Immunsereen zu untersuchen, wurden Zellen von *C. glutamicum* in LB-Medium kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet ($OD_{600} = 6-7$), mittels einer French-Press-Zelle aufgeschlossen und anschließend fraktioniert. Der Zellextrakt wurde zwei Zentrifugationsschritten (30 min 27000 g und 60 min 150000 g) unterzogen und Aliquots der Membranproteine (Ultrazentrifugations-Sediment), der löslichen Proteine

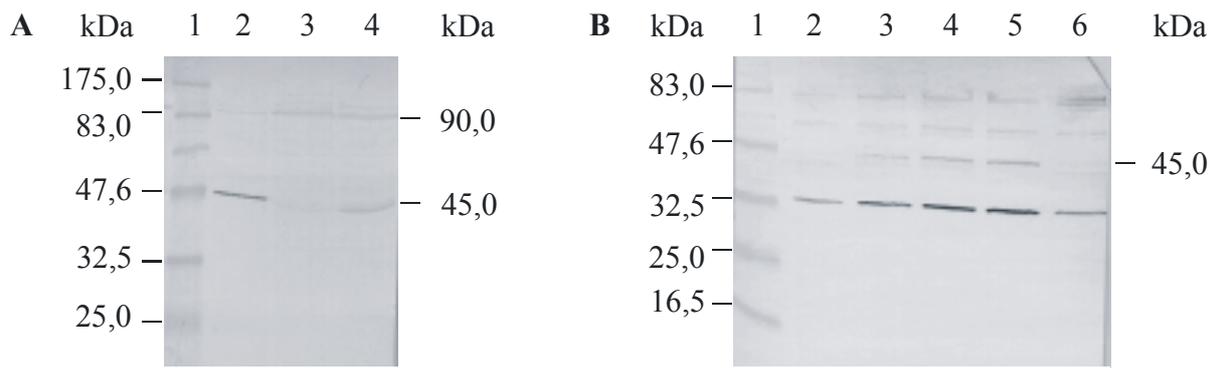


Abb. 13: **A** Western-Blot-Analyse mit Peptidantikörpern gegen CgtS4 zum Nachweis des Proteins in verschiedenen Zellfraktionen von *C. glutamicum*. Spur 1, vorgefärbter Protein-Standard; Spur 2, Fraktion der Membranproteine (Ultrazentrifugations-Sediment); Spur 3, Fraktion der löslichen Proteine (Ultrazentrifugations-Überstand); Spur 4, Gesamt-Zellextrakt. **B** Western-Blot-Analyse zur Kontrolle der Spezifität des Immunsersums. Spur 1; vorgefärbter Protein-Standard; die Spuren 2-5 enthalten das Lysat ganzer Zellen von *E. coli* DH5 α /pXMJ19CgtSR4 vor (Spur 2) sowie 1, 2 und 3 h nach IPTG-Induktion (Spur 3-5); Spur 6 enthält den Gesamt-Zellextrakt des Kontrollstammes *E. coli* DH5 α /pXMJ19 3 h nach IPTG-Induktion.

(Ultrazentrifugations-Überstand) und des Gesamt-Zellextrakts wurden benachbart zu einem vorgefärbten Marker in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Darauf folgte die Immun-Reaktion mit verschiedenen Verdünnungen der Testseren (1:100 bzw. 1:1000). Das jeweilige Prä-Immunsersum wurde ebenfalls getestet (Verdünnung 1:1000). Auf diese Weise wurden alle erhaltenen Proben des Antisera untersucht und das Antiserum mit der größten Spezifität ausgewählt. Anschließend wurde die Anwesenheit von CgtS4 in verschiedenen Zellfraktionen untersucht. Dazu wurden die Zellen von *C. glutamicum* auf die gleiche Weise wie in den Kontrolluntersuchungen kultiviert, fraktioniert und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für einen Western-Blot mit den Peptidantikörpern gegen CgtS4 eingesetzt. Das Antiserum wurde dabei in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Aus Abb. 13 ist ersichtlich, dass in der Fraktion der Membranproteine eine starke 45 kDa-Bande sowie eine sehr schwache 90 kDa-Bande detektierbar ist, in der Fraktion der löslichen Proteine dagegen nur eine 90 kDa-Bande. In der Fraktion des Zellextrakts sind beide Banden zu erkennen. Die 45 kDa große Bande entspricht der berechneten Masse der monomeren Sensor kinase (45 kDa). Bei der 90 kDa-Bande könnte es sich entweder um eine unspezifische Reaktion oder aber um ein CgtS4-Dimer handeln. Da alle Sensor kinasen als Dimere fungieren, ist eine solche Annahme naheliegend, allerdings würden sich daraus zwei Schlussfolgerungen ergeben: (i) Unter den gewählten Bedingungen führte das Detergenz SDS nicht zu einer vollständigen Denaturierung von CgtS4. (ii) In seiner monomeren Form ist CgtS4 Membran-gebunden, während die dimere Form überwiegend als lösliches Protein

vorliegt. Um die Relevanz dieser Überlegungen zu zeigen, muss durch Analyse der *cgtS4*-Deletionsmutante überprüft werden, ob es sich bei der 90-kDa-Bande um ein CgtS4-Dimer oder um eine unspezifische Reaktion des Antiserums handelt.

Zum Zweck einer weiteren Kontrolle der Spezifität der erhaltenen CgtS4-Peptidantikörper wurde eine Expressionskultur mit dem *E. coli*-Stamm DH5 α /pXMJ19CgtSR4 durchgeführt. Erwartungsgemäß sollte nach IPTG-Induktion die Intensität der 45 kDa CgtS4-Bande deutlich zunehmen und in dem Kontrollstamm *E. coli* DH5 α /pXMJ19 völlig fehlen. Die Zellen der beiden Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert, anschließend wurde 1 mM IPTG zugegeben und dann weitere drei Stunden inkubiert. Unmittelbar vor IPTG-Zugabe sowie 1, 2 und 3 h danach wurden Proben entnommen und der Proteinrohextrakt durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte die Immunreaktion mit einer 1:1000-Verdünnung des CgtS4-Antiserums. In den Proben, die nach der Induktion entnommen worden waren, zeigte sich eine ca. 45 kDa große Proteinbande, die im Laufe der Zeit an Intensität zunahm. Vor der Induktion sowie in den Proben der Negativ-Kontrolle *E. coli* DH5 α /pXMJ19 konnte diese Bande nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 13). Zusätzlich traten noch weitere Banden auf, bei denen es sich um *E. coli*-Proteine handelt, die unspezifisch mit dem Peptidantikörper reagieren. Eine dieser unspezifischen Banden reagierte sogar stärker als CgtS4 selbst. Im Gegensatz zu *C. glutamicum* war bei Expression von *cgtS4* in *E. coli* keine spezifische 90 kDa große Bande zu erkennen. Dies deutet an, dass die 90 kDa-Bande aus einer unspezifischen Reaktion der Peptidantikörper resultiert.

4 *In vitro* Charakterisierung des Zweikomponenten-Systems CgtSR4

Basierend auf der grundlegenden Wirkungsweise von Zweikomponenten-Systemen sollte die Sensorkinase CgtS4 die Aktivität des „Response“-Regulators CgtR4 durch Phosphorylierung und ggf. auch durch Dephosphorylierung regulieren. Um die verschiedenen Schritte des Signaltransduktionsweges von der Signalerkennung bis hin zur transkriptionellen Aktivierung von bisher nicht bekannten Zielgenen *in vitro* charakterisieren zu können, wurden Derivate von CgtS4 und CgtR4 in *E. coli* überproduziert und gereinigt.

4.1 Reinigung der Sensorkinase CgtS4 und eines verkürzten Derivats durch Affinitätschromatographie

Um CgtS4 zu reinigen, wurden sowohl His-Tag- als auch *Strep*-tag II-Fusionsproteine konstruiert. Das Anfügen von sechs Histidin-Resten erlaubt die Aufreinigung der Fusionsproteine über eine Ni²⁺-NTA-Affinitätssäule. Das *Strep*-tag II/*Strep*Tactin-System beruht auf der hochaffinen Bindung des *Strep*-tag II-Peptids (WSHPQFEK) an das Streptavidin-Derivat *Strep*Tactin. Durch Desthiobiotin kann die Bindung jedoch unter milden Bedingungen wieder gelöst werden (Skerra und Schmidt, 2000). Neben dem vollständigen getaggtten CgtS4-Protein wurde auch ein verkürztes Derivat konstruiert, dem die Aminosäure-Reste 1-21 fehlen, um Informationen über die Lokalisation von CgtS4 in Abwesenheit der N-terminalen Transmembranhelix zu gewinnen. Die resultierenden Plasmide pET24-CgtS4His und pET24-CgtS4Δ1-21His kodieren für CgtS4-Derivate mit acht zusätzlichen Aminosäure-Resten am C-Terminus (LEHHHHHH) sowie einem N-terminalen Methionin-Rest. Die Plasmide pET24-CgtS4Strep und pET24-CgtS4Δ1-21Strep kodieren für CgtS4-Derivate mit zehn zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren (VEWSHPQFEK) sowie einem N-terminalen Methionin-Rest. Zur Synthese der rekombinanten CgtS4-Derivate wurden die entsprechenden Plasmide in den Wirtstamm *E. coli* C43(DE3) oder alternativ in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Nach IPTG-Induktion der Expression war in Zellextrakten aller vier Stämme eine dominante Proteinbande mit der für das jeweilige Fusionsprotein erwarteten Größe sichtbar (CgtS4-His, 46,3 kDa; CgtS4Δ1-21His, 44,2 kDa; CgtS4-Strep, 46,5 kDa; CgtS4Δ1-21Strep, 44,4 kDa). Obwohl ein beträchtlicher Anteil der überproduzierten Proteine in Form von Proteineinschlusskörpern vorlag, war ein signifikanter Anteil auch in der Membranfraktion lokalisiert (Sediment der Ultrazentrifugation, siehe Abb. 14). Dies galt nicht nur für die vollständigen CgtS4-Derivate, sondern auch für das N-terminal verkürzte CgtS4Δ1-21Strep-Derivat. Selbst wenn der zweite hydrophobe Bereich des CgtS4-Proteins (Reste 43-63) keine Transmembranhelix ausbildet, so deutet dieses Ergebnis doch darauf hin, dass diese Region zu einer Lokalisation des Proteins an der Membran führt und unterstützt die Annahme, dass die Aminosäure-Reste 43-63 eine amphiphile α -Helix bilden. CgtS4Δ1-21His konnte nur in sehr geringen Mengen in der Membranfraktion nachgewiesen werden, das Protein lag nahezu vollständig in Form von Proteineinschlusskörpern vor.

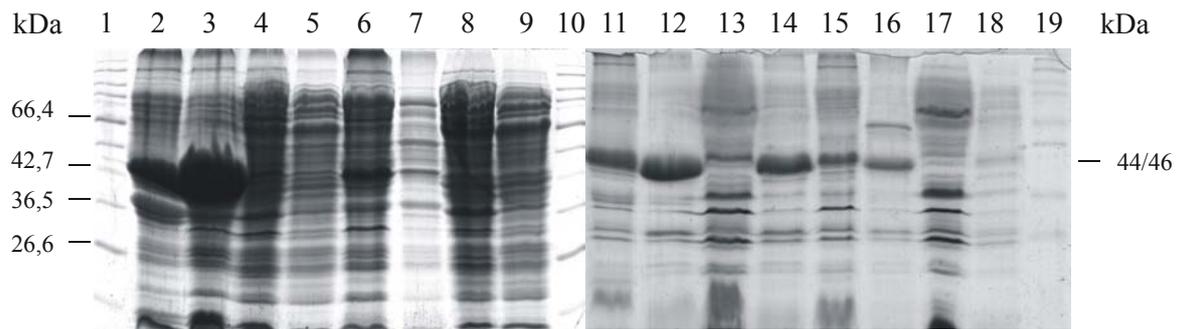


Abb. 14: SDS-PAGE-Analyse der Zellfraktionierung von CgtS4-His, CgtS4Δ1-21His, CgtS4-Strep und CgtS4Δ1-21Strep. Es wurden 12 %ige Trenngele eingesetzt, die mit Coomassie gefärbt wurden. Spur 1, Protein-Standard; Spur 2, 27000 g Sediment von CgtS4-His; Spur 3, 27000 g Sediment von CgtS4Δ1-21His, Spur 4, 27000 g Überstand von CgtS4-His; Spur 5, 27000 g Überstand von CgtS4Δ1-21His; Spur 6, Ultrazentrifugations-Sediment von CgtS4-His; Spur 7, Ultrazentrifugations-Sediment von CgtS4Δ1-21His; Spur 8, Ultrazentrifugations-Überstand von CgtS4-His; Spur 9, Ultrazentrifugations-Überstand von CgtS4Δ1-21His; Spur 10, Protein-Standard; Spur 11, 27000 g Sediment von CgtS4-Strep; Spur 12, 27000 g Sediment von CgtS4Δ1-21Strep; Spur 13, 27000 g Überstand von CgtS4-Strep; Spur 14, 27000 g Überstand von CgtS4Δ1-21Strep; Spur 15, Ultrazentrifugations-Sediment von CgtS4-Strep; Spur 16, Ultrazentrifugations-Sediment von CgtS4Δ1-21Strep; Spur 17, Ultrazentrifugations-Überstand von CgtS4-Strep; Spur 18, Ultrazentrifugations-Überstand von CgtS4Δ1-21Strep; Spur 19, Protein-Standard

Um die CgtS4-Derivate aus der Membran zu isolieren, wurde zunächst für die Solubilisierung 4 % Triton X-100 verwendet. Durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde jedoch gezeigt, dass die CgtS4-Derivate noch immer in der Membranfraktion lokalisiert waren. Anschließend erfolgte eine Solubilisierung mit 2 % Lauryldimethylamin-N-Oxid (LDAO). Nach einer erneuten Ultrazentrifugation (1 h 150000 g) befand sich ein Teil der gewünschten Proteine im Überstand (siehe Abb. 15), der Rest verblieb im Ultrazentrifugations-Sediment. Die Solubilisierung verlief also nicht vollständig. Die Überstände der Ultrazentrifugation wurden für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine über eine Ni²⁺-NTA-Säule bzw. eine StrepTactin-Sepharose-Säule eingesetzt. Die Solubilisierung und Reinigung der CgtS4-Derivate wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abb. 15). Es konnten jeweils Proteinbanden der erwarteten Größe detektiert werden. Mit Ausnahme von CgtS4Δ1-21Strep wurde nur wenig Protein aus den Membranen solubilisiert. Entsprechend wurden unterschiedliche Mengen auf die Affinitätssäulen aufgetragen. Die Banden der aufgereinigten Proteine sind in allen Fällen nur schwach ausgeprägt. Ein Grund für die schwachen Banden neben der geringen eingesetzten Proteinmenge ist, dass den Waschpuffern versehentlich kein Detergenz zugesetzt wurde, so dass die Konzentration des solubilisierenden Detergenz im Verlauf der Reinigung immer geringer wurde und ein Teil der Proteine möglicherweise auf der Säule präzipitierte.

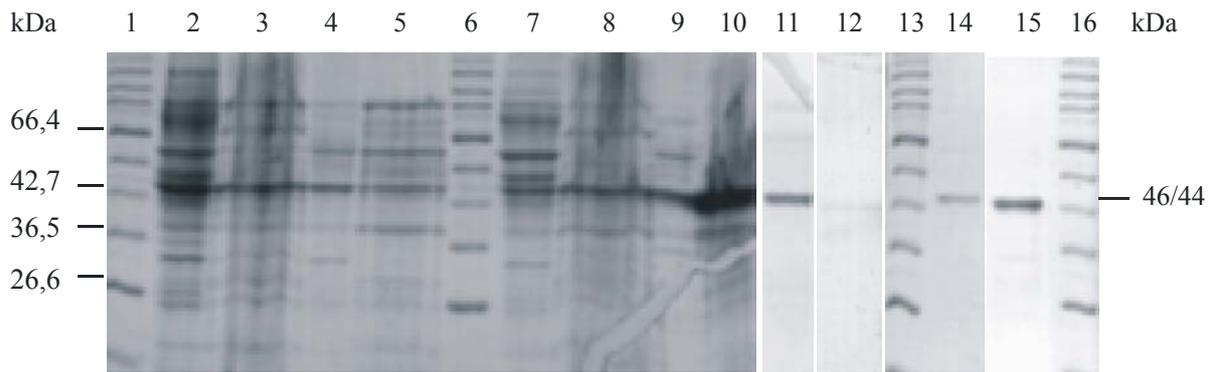


Abb. 15: SDS-PAGE-Analyse verschiedener Fraktionen bei der Solubilisierung und Reinigung von CgtS4-His, CgtS4Δ1-21His, CgtS4-Strep und CgtS4Δ1-21Strep. Die Proteine wurden über ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Spur 1, Protein-Standard; Spur 2, Membranproteine C43(DE3)/pET24-CgtS4His, die nicht solubilisiert wurden; Spur 3, solubilisierte Membranproteine aus C43(DE3)/pET24-CgtS4His; Spur 4, Membranproteine BL21(DE3)/pET24-CgtS4Δ1-21His, die nicht solubilisiert wurden; Spur 5, solubilisierte Membranproteine aus BL21(DE3)/pET24-CgtS4Δ1-21His; Spur 6, Protein-Standard; Spur 7, Membranproteine C43(DE3)/pET24-CgtS4Strep, die nicht solubilisiert wurden; Spur 8, solubilisierte Membranproteine aus C43(DE3)/pET24-CgtS4-Strep; Spur 9, Membranproteine BL21(DE3)/pET24-CgtS4Δ1-21Strep, die nicht solubilisiert wurden; Spur 10, solubilisierte Membranproteine aus BL21(DE3)/pET24-CgtS4Δ1-21Strep; Spur 11, gereinigtes CgtS4-His; Spur 12, gereinigtes CgtS4Δ1-21His; Spur 13, Protein-Standard; Spur 14, gereinigtes CgtS4-Strep; Spur 15, gereinigtes CgtS4Δ1-21Strep; Spur 16, Protein-Standard

4.2 Überproduktion und Reinigung von MalE-CgtS4kin

Um für die *in vitro* Phosphorylierung von CgtR4 ein CgtS4-Protein mit konstitutiver Kinase-Aktivität zur Verfügung zu haben, wurde ein CgtS4-Derivat konstruiert, bei dem die cytoplasmatische Kinase-Domäne (Aminosäuren 119-413) an das C-terminale Ende des Maltose-Bindeproteins von *E. coli* (MalE) mit deletierter Signalsequenz fusioniert wurde (siehe Abb. 16).

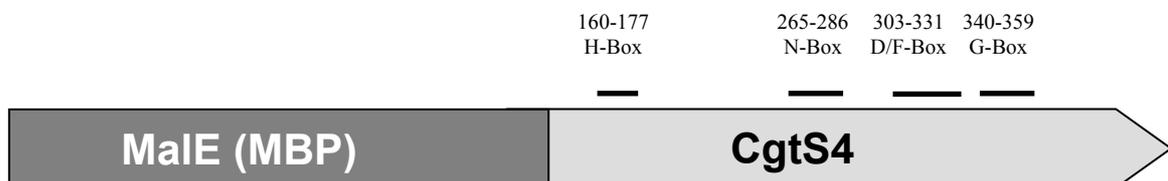


Abb. 16: Schematische Darstellung des CgtS4-Derivats MalE-CgtS4kin. N-terminal befindet sich das Maltose-Bindeprotein aus *E. coli* ohne dessen Signalsequenz und C-terminal die Kinase-Domäne von CgtS4. Die Kinase-Domäne ist aus der Phosphorylierungs-Subdomäne mit dem konservierten Histidin-Rest und der ATP-Binde-Subdomäne mit der N-, D-, F- und G-Box zusammengesetzt.

In mehreren Fällen konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Domäne, wenn sie als separates Protein mit dem MalE-Bindeprotein fusioniert wurde, konstitutive Autokinase-Aktivität

aufweist (Kaspar *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 1993). Das Maltose-Bindeprotein soll die Löslichkeit des Fusionsproteins erhöhen und dadurch die Bildung von Einschlusskörpern verhindern. Das Fusionsprotein MalE-CgtS4kin (75 kDa) wurde in *E. coli* DH5 α überproduziert und mittels Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abb. 17).

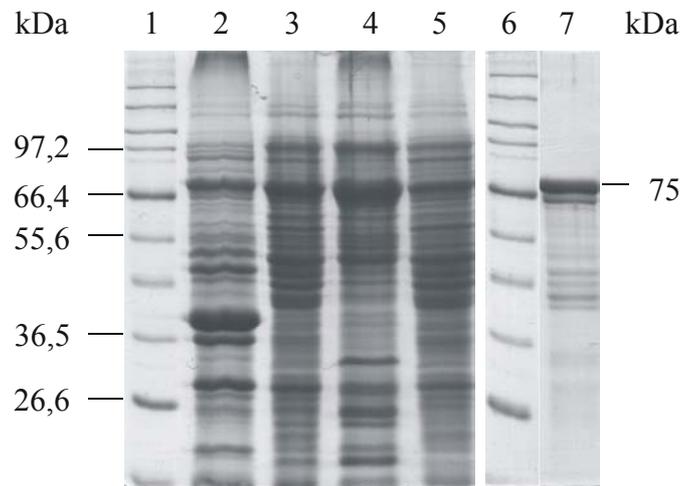


Abb. 17: SDS-PAGE-Analyse verschiedener Fraktionen bei der Reinigung von MalE-CgtS4kin durch Affinitätschromatographie an Amylose-Harz. Spuren 1 und 6, Protein-Standard; Spur 2, Sediment des 27000 g Zentrifugationsschrittes; Spur 3, Überstand des 27000 g Zentrifugationsschrittes; Spur 4, Sediment der Ultrazentrifugation; Spur 5, Überstand der Ultrazentrifugation; Spur 7, MalE-CgtS4kin nach Reinigung über eine Amylose-Säule.

Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, befand sich nach der Zellfraktionierung ein signifikanter Anteil des überproduzierten Proteins im Ultrazentrifugations-Überstand, der für die Reinigung über eine Amylose-Säule eingesetzt wurde. Induktion und Reinigung von MalE-CgtS4kin wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel verfolgt. Die Fraktion, die mit Maltosehaltigem Puffer von der Amylose-Säule eluiert wurde, enthielt hauptsächlich ein Protein mit der für MalE-CgtS4kin erwarteten Größe (75 kDa). Die zusätzlich auftretenden Banden zwischen 40 und 66 kDa stellen höchstwahrscheinlich Abbauprodukte aus dem Maltose-Bindeprotein (40 kDa) mit unterschiedlich großen Anteilen der CgtS4-Kinase-Domäne (32 kDa) dar. Für die Gelretardationsexperimente wurde das Fusionsprotein mittels Gelfiltration mit Sephadex G-25-Säulen in 0,5 x Bindungspuffer umpuffert.

4.3 Überproduktion und Reinigung von CgtR4 mittels Ni-NTA- und StrepTactin-Affinitätschromatographie

4.3.1 Reinigung von CgtR4-His

Zur Überproduktion und Reinigung des Antwortregulators CgtR4 wurde das Expressionsplasmid pET24-CgtR4His konstruiert. Der gesamte kodierende Bereich des *cgtR4*-Gens wurde durch einen *NdeI/SalI*-Verdau aus dem Plasmid pCGEX1CgtR4 herausgeschnitten und in den mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen pET24b-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid kodiert für ein rekombinantes CgtR4-Protein, das am C-Terminus acht zusätzliche Aminosäuren trägt (VEHHHHHH). Für die Überproduktion von CgtR4-His wurde pET24-CgtR4His in den Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) transferiert. Nach Induktion mit IPTG konnte in Zellextrakten eine dominante Bande von 27 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht der berechneten Masse von CgtR4-His. Für die Reinigung des Proteins wurden die Zellen mit Hilfe einer French-Press-Zelle aufgeschlossen und anschließend durch zwei Zentrifugationsschritte (27000 g und 150000 g) fraktioniert. In den ersten Versuchen befand sich ein signifikanter Anteil von CgtR4-His im Ultrazentrifugations-Überstand, es lag aber auch ein beträchtlicher Teil in Form von Protein-Einschlusskörpern vor (siehe Abb. 18). Je öfter die Überproduktion von CgtR4-His durchgeführt wurde, desto geringer wurde der Anteil des überproduzierten Proteins im Ultrazentrifugations-Überstand und umso größere Mengen des Proteins lagen in Einschlusskörpern vor. Auch eine neue Transformation vom *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mit pET24-CgtR4His führte nur zu geringen Verbesserungen. Die Ursache für diese Unterschiede in der Löslichkeit von CgtR4-His ist unklar. Im gegenwärtigen Protokoll zur CgtR4-Reinigung werden 2 l Expressionskulturen mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 kultiviert, die Expression mit 1 mM IPTG induziert und anschließend über Nacht bei 20°C weiterinkubiert. Trotz eines relativ geringen Anteils von CgtR4-His im Ultrazentrifugations-Überstand konnten immer noch ausreichende Mengen des Proteins daraus isoliert werden. Wie in Abb. 18 zu erkennen, war das isolierte CgtR4-His > 95 % rein.

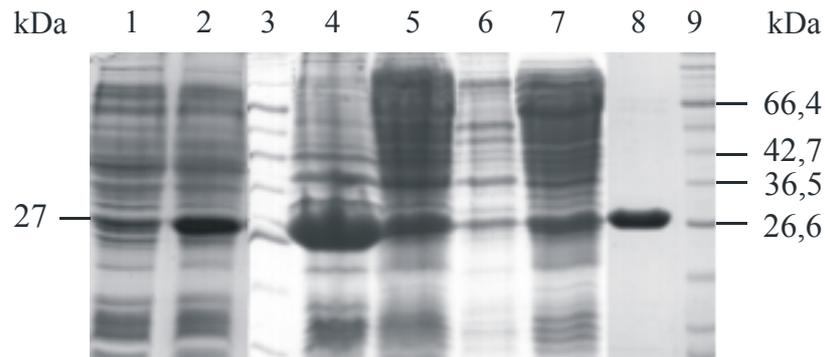


Abb. 18: Coomassie-gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Überproduktion, Lokalisation und Aufreinigung von CgtR4-His durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Spur 1 und 2, Zell-Lysat von *E. coli* BL21(DE3)/pET24-CgtR4His vor und 3 h nach IPTG-Induktion; Spur 3 und 9, Protein-Standard; Spur 4, Sediment des 27000 g Zentrifugationsschrittes; Spur 5, Überstand des 27000 g Zentrifugationsschrittes; Spur 6, Sediment der Ultrazentrifugation; Spur 7, Überstand der Ultrazentrifugation; Spur 8, CgtR4-His nach Reinigung über eine Ni-NTA-Säule.

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um CgtR4 handelte, wurde die entsprechende Proteinbande im Gel mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide nach Elution aus dem Gel durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Ein vollständiger Trypsin-Verdau des CgtR4-Proteins sollte 17 Peptide ergeben. Acht dieser Peptide konnten im zugehörigen Massenspektrum eindeutig nachgewiesen werden, was aufgrund der hohen Massengenauigkeit für eine eindeutige Identifizierung des Proteins ausreichte (siehe Tab. 6). CgtR4-His wurde als Antigen für die Herstellung von polyklonalem Antiserum aus Kaninchen eingesetzt.

Tab. 6: Peptidmassenfingerprintanalyse von CgtR4-His, das durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus dem Ultrazentrifugations-Überstand aus *E. coli* BL21(DE3)/pET24-CgtR4-His isoliert wurde. Die Δ ppm-Werte geben die Abweichungen der experimentell bestimmten zu den berechneten monoisotopischen Massen an.

m/z	Δ ppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
2756,5137	54,6450	82-106	DSEIDKVVGLELGADDYVTKPYSSR	
2427,354	63,3029	119-140	RGVTETEAEELPLDDQILEGGR	
2271,2139	50,4892	120-140	GVTETEAEELPLDDQILEGGR	
2069,1631	51,9968	88-106	VVGLELGADDYVTKPYSSR	
1375,8055	31,6788	69-81	SVSTVPVIMVTAR	1 Met-ox
1359,8112	32,5167	69-81	SVSTVPVIMVTAR	
1327,736	29,3667	208-218	SKIEEPPSRPR	
1224,6216	25,7096	187-197	IWGADYVGDTK	
1112,5958	23,2071	210-218	IEEPPSRPR	

4.3.2 Reinigung von CgtR4-Strep

Alternativ zum „His-Tag“ wurde CgtR4 auch mit einem „Strep-tag II“ fusioniert. Dazu wurde das *cgtR4*-Gen auf die gleiche Weise wie unter Abschnitt 4.3.1 beschrieben in den Vektor pET24b-Strep kloniert. Das resultierende Plasmid pET24-CgtR4Strep (siehe III 2.1) kodiert für ein rekombinantes CgtR4-Protein, das am C-Terminus zehn zusätzliche Aminosäure-Reste trägt (VEWSHPQFEK). Die Überproduktion des Proteins in *E. coli* BL21(DE3) nach IPTG-Induktion konnte im Zellextrakt als dominante 27 kDa-Bande nachgewiesen werden (siehe Abb. 19). Ähnlich wie bei CgtR4-His wurden auch bei der Aufreinigung von CgtR4-Strep durch Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose noch Spuren von ein paar weiteren Proteinen mitgereinigt. Das CgtR4-Strep-Protein wurde für die Identifizierung von putativen Zielgenen durch Bindungsstudien mit „magnetic beads“ eingesetzt (siehe 7.2).

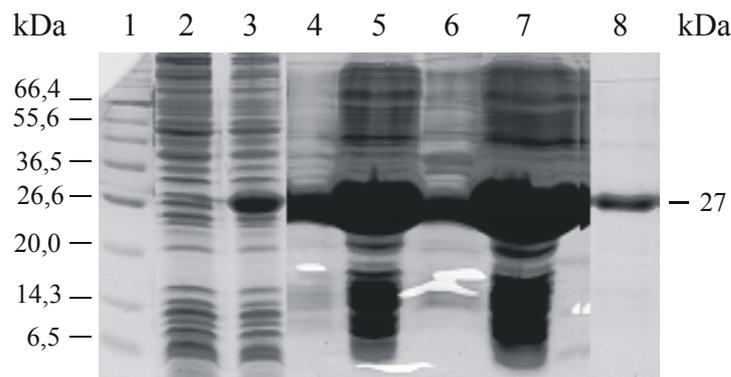


Abb. 19: Coomassie-gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Überproduktion, Lokalisation und Aufreinigung von CgtR4-Strep über StrepTactin-Affinitätschromatographie. Spur 1, Protein-Standard; Spur 2 und 3, Zell-Lysate von *E. coli* BL21(DE3)/pET24-CgtR4Strep vor und 3 h nach IPTG-Induktion; Spur 4, Sediment des 27000 g Zentrifugationsschrittes; Spur 5, Überstand des 27000 g Zentrifugationsschrittes; Spur 6, Sediment der Ultrazentrifugation; Spur 7, Überstand der Ultrazentrifugation; Spur 8, CgtR4-Strep nach Reinigung über eine StrepTactin-Sepharose-Säule.

4.4 *In vitro* Phosphorylierung von CgtS4 und CgtR4

4.4.1 Phosphorylierung von CgtS4-His und CgtR4-Strep

Für Phosphorylierungsstudien kann die vollständige Sensorkinase aus mehreren Gründen ungeeignet sein. Zum einen tendiert sie als Membranprotein bei Überproduktion zur Bildung von Einschlusskörpern, zum anderen kann es sein, dass in der isolierten Form die Aktivität der Kinase-Domäne durch die Sensor-Domäne inhibiert wird, solange sie nicht durch ein passendes Signal aktiviert worden ist. Einige der bis jetzt gereinigten Sensorkinasen, z. B. KdpD (Nakashima *et al.*, 1993) oder DcuS (Janausch *et al.*, 2002) zeigten im solubilisierten

Zustand keine Autophosphorylierungsaktivität, sondern erst nach Rekonstitution in Proteoliposomen. Andere, wie z. B. NarX (Walker und DeMoss, 1993) zeigten auch im solubilisierten Zustand Autophosphorylierungsaktivität. Um zu untersuchen wie sich die vollständige Sensorkinase CgtS4 verhält, wurde ein Phosphorylierungs-Experiment mit CgtS4-His und CgtR4-Strep durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Ansätze mit einem Volumen von 60 μl erstellt, die beide 1,6 μM CgtS4-His enthielten, sowie ein Gemisch von γ -[^{32}P]-ATP und nicht-radioaktivem ATP. Nach Starten der Reaktion durch ATP-Zugabe wurden die Ansätze bei Raumtemperatur inkubiert und nach 1, 10, 20 und 30 min jeweils 5 μl -Proben entnommen, sofort mit 5 μl eiskaltem 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer gemischt und auf Eis aufbewahrt. Nach 30 min wurde zu Ansatz 1 20 μl TKMD-Puffer gegeben, zu Ansatz 2 dagegen 20 μl einer 5,94 μM CgtR4-Strep-Lösung in TKMD-Puffer. Dadurch wurde die CgtS4-His-Konzentration um den Faktor 1,5 verdünnt, ebenso die Konzentration von ATP. Die Konzentration des Antwortregulators betrug 1,98 μM . Nach 31, 40, 50 und 60 min wurden weitere Proben entnommen. Um in diesen Proben die gleiche Menge an CgtS4-His zu erhalten wie in den Proben vor der Zugabe von Puffer bzw. CgtR4-Strep, wurde das Probenvolumen um das 1,5-fache auf 7,5 μl erhöht. Diese Proben wurden entsprechend mit 7,5 μl 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer gemischt. Zur Analyse wurden je 8 μl der Proben der ersten 30 min und 12 μl der Proben der letzten 30 min ohne vorheriges Erhitzen auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass gleich große Mengen an CgtS4-His auf das Gel gegeben wurden. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und mit Hilfe eines PhosphoImagers analysiert. Wie in dem resultierenden Autoradiogramm in Abb. 20 zu erkennen ist, wurde das vollständige CgtS4-His-Protein phosphoryliert. Die Autophosphorylierungsreaktion erreicht nach ca. 30 min ihr Maximum. Die Intensität der Banden nimmt danach nur noch geringfügig zu. Die Transphosphorylierungs-Reaktion läuft innerhalb einer Minute nahezu vollständig ab und erfolgt damit sehr schnell (siehe Abb. 20B). Die Intensität der Banden des Antwortregulators nimmt im weiteren Verlauf des Versuches nicht mehr signifikant zu. Die Signale von CgtS4-His nehmen nach Zugabe von CgtR4-Strep kontinuierlich ab. Vermutlich würde man nach ca. 2 h keine Banden von CgtS4-His mehr sehen.

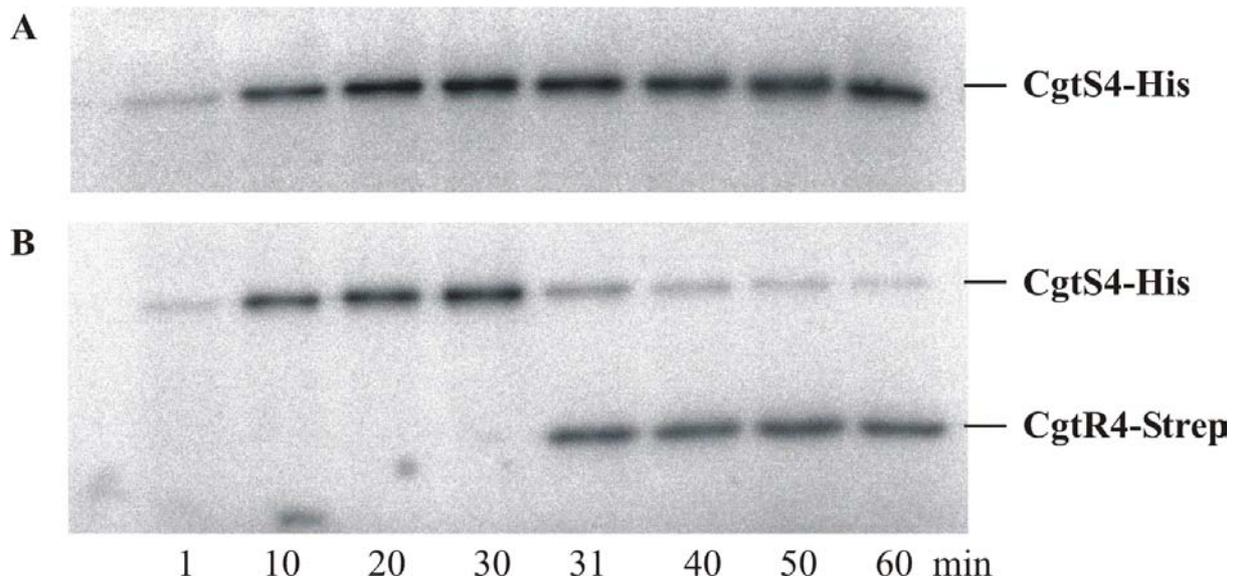


Abb. 20: Autophosphorylierung von CgtS4-His und Phosphoryltransfer auf CgtR4-Strep. 1,6 μM CgtS4-His wurde mit einem Gemisch aus γ - ^{32}P -ATP und nicht-radioaktivem ATP mit einer Gesamtkonzentration von 40,17 μM sowie einer spezifischen Aktivität von 12,56 mCi/mmol in zwei 60- μl -Ansätzen bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden zu den angegebenen Zeiten (1-30 min) 5- μl -Proben entnommen und ebenso wie die folgenden Proben mit dem gleichen Volumen 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt. Nach 30 min Inkubation wurden zu den verbliebenen 40 μl des ersten Ansatzes (A) 20 μl TKMD-Puffer und zu Ansatz 2 (B) 20 μl CgtR4-Strep-Lösung zugesetzt, so dass die Konzentration von CgtS4-His auf 1,07 μM und die des ATPs auf 26,78 μM absank. Die Konzentration von CgtR4-Strep betrug 1,98 μM . Nach der Zugabe von CgtR4-Strep wurden 7,5 μl Proben entnommen. Auf das 12 %ige SDS-Polyacrylamidgel wurden 8 μl der Proben vor Zugabe des Antwortregulators und 12 μl der Proben nach Zugabe des Antwortregulators ohne vorheriges Erhitzen aufgetragen. Nach Durchführung der SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und mit einem PhosphorImager analysiert.

4.4.2 Phosphorylierung von Male-CgtS4kin und CgtR4-His

In einem weiteren Versuch wurde die Autophosphorylierung von Male-CgtS4kin und der Phosphoryltransfer von Male-CgtS4kin auf den Antwortregulator CgtR4-His untersucht. Dazu wurde gereinigtes Male-CgtS4kin- und CgtR4-His-Protein eingesetzt, die in TKMD-Puffer gelöst waren. Zu diesem Zweck wurde der Antwortregulator von TNI100- in TKMD-Puffer umgepuffert. Der Ansatz mit einem Volumen von 54 μl enthielt 20 μM Male-CgtS4kin und 10 μM CgtR4-His und wurde bei Raumtemperatur mit radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP inkubiert (End-Konz. 0,336 μM , spez. Aktivität 3000 Ci/mmol). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 5- μl -Proben entnommen, sofort mit gleichem Volumen 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer vermischt und einer SDS-PAGE unterworfen. Anschließend wurden die Gele mit einem PhosphorImager ausgewertet. Das Autoradiogramm des SDS-Polyacrylamidgels ist in Abb. 21 zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Proteine phosphoryliert wurden. Bei Male-CgtS4kin sind bereits nach 10 min Banden zu erkennen, die sich in ihrer Intensität nicht signifikant verändern. Die Phosphorylierung von CgtR4-His kann man erst nach 20 min erkennen. Die Intensität der Banden nimmt dann aber

stark zu. Das zeigt, dass zunächst eine Autophosphorylierung von Male-CgtS4kin stattfindet und dann ein Phosphoryltransfer auf CgtR4-His. Nach 80 min ist die CgtR4-Bande jedoch nicht mehr zu detektieren, was auf eine Dephosphorylierung von CgtR4-His durch den Antwortregulator selbst oder durch Male-CgtS4kin hindeutet.

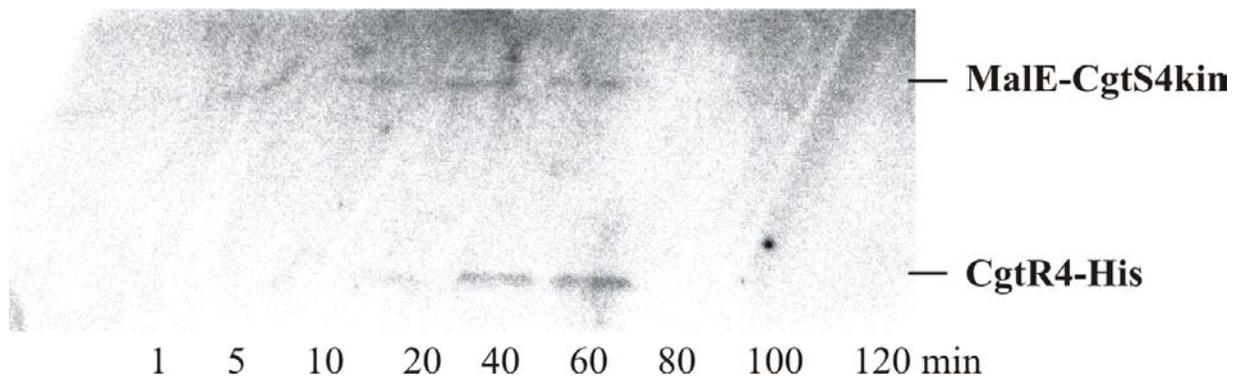


Abb. 21: Autophosphorylierung von Male-CgtS4kin und Phosphoryltransfer auf CgtR4-His. 10 μ M Male-CgtS4kin wurden mit 20 μ M CgtR4-His und 0,336 μ M γ -[32 P]-ATP (3000 Ci/mmol) in TKMD-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden zu den angegebenen Zeiten (1-120 min) 5- μ l-Proben entnommen und mit dem gleichen Volumen 2-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer gemischt. Anschließend wurden diese Proben ohne vorheriges Erhitzen auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Durchführung der SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und mit einem PhosphorImager analysiert.

5 Versuche zur Deletion von *cgtSR4* aus dem Chromosom von *C. glutamicum*

5.1 Konstruktion und Charakterisierung der *cgtSR4*-Deletionsmutante

Zur genetischen Charakterisierung des Zweikomponenten-Regulationssystems CgtSR4 aus *C. glutamicum* sollte ausgehend vom Wildtyp-Stamm ATCC13032 eine Mutante konstruiert werden, der die *cgtSR4*-Gene fehlen. Dazu wurde eine Methode eingesetzt, die zuvor von Niebisch und Bott (Niebisch und Bott, 2001, 2003) beschrieben wurde. Durch eine „cross-over“-PCR wurden die Codons 20-413 von *cgtS4* sowie die Codons 1-220 von *cgtR4* durch eine 21 bp lange Sequenz ersetzt, die für die Aminosäuresequenz CLSLVDG kodiert. Nach der zweiten homologen Rekombination wurden 20 Saccharose-resistente und Kanamycin-sensitive Klone durch eine PCR mit Kontroll-Primern, die außerhalb des deletierten Bereichs hybridisieren, analysiert, wobei jedoch kein Produkt der erwarteten Größe (916 bp) erhalten werden konnte. Stattdessen wurde in allen Fällen ein 2736 bp-Wildtyp-Fragment amplifiziert. Auch bei einer Wiederholung des zweiten Rekombinationsschrittes zeigten alle 20 untersuchten Kan^S-Sacc^R-Klone die Wildtyp-Situation und keine Deletion der *cgtSR4*-Gene.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Zweikomponenten-System CgtSR4 für *C. glutamicum* essentiell sein könnte.

5.1.1 Konstruktion eines Plasmids zur kontrollierten Expression von *cgtSR4* in *C. glutamicum*

Wenn die Gene *cgtS4* und *cgtR4* oder zumindest eines der beiden Gene essentiell sind, kann eine chromosomale Deletion von *cgtSR4* nur in einem Stamm gelingen, der die *cgtSR4*-Gene auch Plasmid-kodiert exprimiert. Zur regulierten Expression von *cgtSR4* wurde das Plasmid pXMJ19CgtSR4 konstruiert. Es enthält die vollständigen *cgtSR4*-Gene einschließlich 31 bp stromaufwärts des postulierten *cgtS4*-Translationsstarts unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, so dass eine IPTG-abhängige Expression der Zielgene möglich ist (siehe III 2.1). Zur Überprüfung, ob eine Deletion der *cgtSR4*-Gene in Gegenwart des Plasmids pXMJ19CgtSR4 möglich ist, wurde das Plasmid in den Stamm *C. glutamicum* 13032::pK19*mobsacB*Δ*cgtSR4* eingebracht und dann erneut auf den zweiten Rekombinationsschritt selektioniert, und zwar in Abwesenheit von IPTG. Die PCR-Analyse ergab, dass von 10 getesteten Kan^S-Sacc^R-Klonen fünf ein PCR-Fragment der gesuchten Größe (916 bp) ergaben, während bei den restlichen fünf Klonen wieder das 2736 bp große Wildtyp-Fragment amplifiziert wurde. Die erfolgreiche *cgtSR4*-Deletion wurde durch Southern-Blot Analyse bestätigt. Als Sonde wurde fast das gesamte *pgm*-Gen eingesetzt, da dieser Sequenzbereich nicht mit dem komplementierenden Plasmid pXMJ19CgtSR4 hybridisieren konnte (siehe Abb. 22). Mit dieser DIG-markierten Sonde wurde in *SphI*-verdauter chromosomaler DNA des Wildtyps ein 2,7 kb (2693 bp) großes Fragment und in chromosomaler DNA der Integrationsmutante ein 2,7 kb (2693 bp) und ein 10 kb (10041 bp) großes Fragment detektiert. In der Deletionsmutante wurde erwartungsgemäß ein 5 kb (4996 bp) Fragment nachgewiesen (siehe Abb. 23, Spur 2, 4 u. 5), da durch die Deletion von *cgtSR4* eine *SphI*-Schnittstelle entfernt worden war.

Zur Kontrolle wurde der zweite Rekombinationsschritt in Gegenwart des Leerplasmids pXMJ19 wiederholt. Alle 10 getesteten Kan^S-Sacc^R-Klone zeigten die genetische Wildtyp-Situation (2736 bp großes Fragment), nicht jedoch das 916 bp Fragment der Deletionsmutante. Dieses Ergebnis bestätigte, dass eine Deletion der chromosomalen Gene *cgtS4* und *cgtR4* nur möglich ist, wenn diese zusätzlich Plasmid-kodiert exprimiert werden und bekräftigt die Annahme, dass das Zweikomponenten-System CgtSR4 unter den

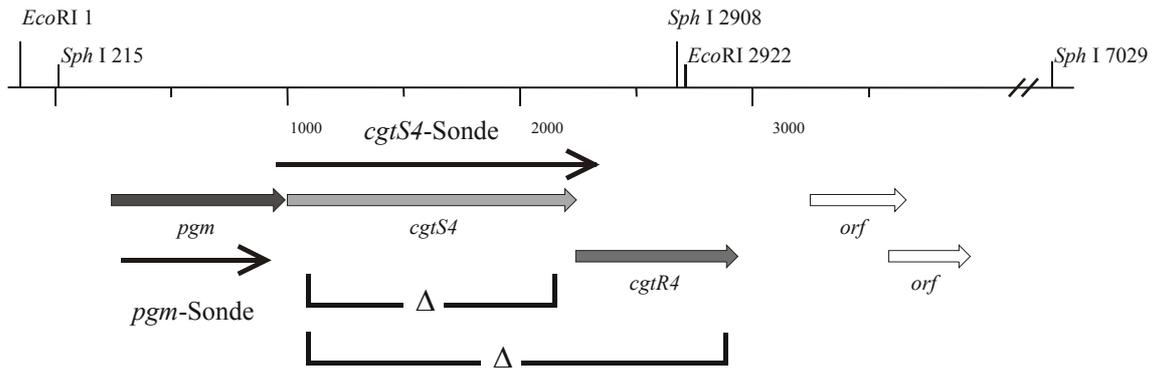


Abb. 22: Physikalische Karte der Genregion von *cgtSR4* in *C. glutamicum* ATCC13032 (Wildtyp). Die in den Mutanten *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtSR4 und *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* deletierten Fragmente sind markiert.

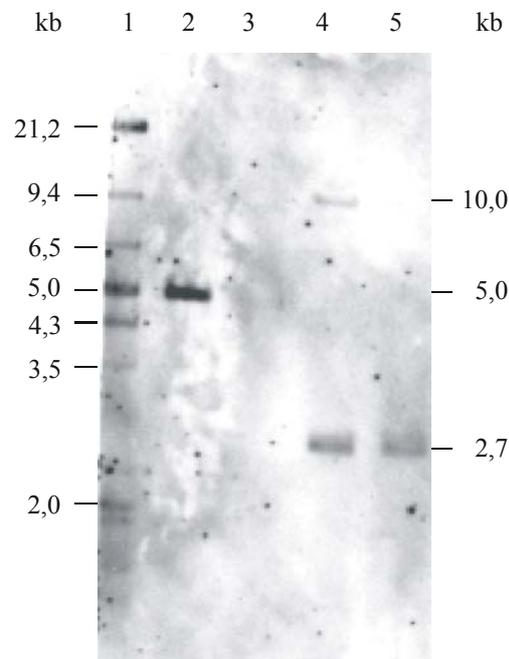


Abb. 23: Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtSR4 (Spur 2), *C. glutamicum*::pK19mobsacB Δ *cgtSR4* (Spur 4) und *C. glutamicum* 13032 (Spur 5). Die DNA wurde mit *Sph* I verdaut und nach Elektrophorese und Blotten mit der DIG-markierten *pgm*-Sonde hybridisiert. (Spur 1, DIG-markierter DNA-Standard II+III (Roche Diagnostics))

gewählten Bedingungen für *C. glutamicum* essentiell ist. Die Tatsache, dass eine Induktion der Plasmid-kodierten *cgtSR4*-Gene durch IPTG nicht notwendig war, deutete an, dass der *tac*-Promotor eine ausreichende Basalexpression erlaubt. Deshalb wurden auch die folgenden Experimente ohne Zugabe von IPTG durchgeführt. Bei Ausnahmen wurde entsprechend darauf hingewiesen.

5.1.2 Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Plasmid-vermittelte Expression des Antwortregulator-Gens *cgtR4* ausreicht, um eine Deletion der chromosomalen *cgtSR4*-Gene zu ermöglichen. Dafür wurde das Genfragment der Sensor kinase (1083 bp) aus dem Plasmid pXMJ19CgtSR4 herausgeschnitten und so das Plasmid pXMJ19CgtR4 konstruiert (siehe III 2.1). Nach Durchführung des zweiten Rekombinationsschrittes in Gegenwart des Plasmids pXMJ19CgtR4 besaßen 6 von 8 durch PCR getestete Kan^S-Sacc^R-Klone eine chromosomale Deletion der *cgtSR4*-Gene. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Gegenwart von CgtR4 allein ausreicht, um eine chromosomale Deletion der *cgtSR4*-Gene zu ermöglichen. Der Antwortregulator muss also auch in Abwesenheit der zugehörigen Sensor kinase CgtS4 und somit auch des regulierenden Signals aktiv sein. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: (i) CgtR4 ist in seiner phosphorylierten Form aktiv und in Abwesenheit von CgtS4 gibt es eine unspezifische Phosphorylierung durch eine oder mehrere der anderen 12 Sensor kinasen der Zelle oder durch Acetylphosphat. (ii) CgtR4 ist in seiner unphosphorylierten Form aktiv und wird durch Phosphorylierung inaktiviert. Ein solches Verhalten wurde zuvor auch für andere Zweikomponenten-Systeme beschrieben, z. B. das HoxJ/HoxA-System aus *Ralstonia eutropha* (Lenz und Friedrich, 1998; Lenz *et al.*, 2002) oder das HupT/HupR-System aus *Rhodobacter capsulatus* (Dischert *et al.*, 1999).

Um die Funktionalität eines „His-getaggen“ CgtR4-Proteins zu testen, wurde der zweite Rekombinationsschritt zur Deletion von *cgtSR4* in Gegenwart eines Plasmid-kodierten *cgtR4*-Gens wiederholt, das für ein CgtR4-Derivat mit acht zusätzlichen C-terminalen Aminosäure-Resten (VEHHHHHH) kodiert. Auch in diesem Fall besaßen fünf der 12 analysierten Kan^S-Sacc^R-Klone eine *cgtSR4*-Deletion. Das bedeutet, dass der C-terminale His-Tag die Aktivität von CgtR4 nicht nachhaltig beeinträchtigt. Diese Aussage war wichtig für die spätere Verwendung von CgtR4-His in Gelretardationsexperimenten, da auf diese Weise ausgeschlossen werden konnte, dass negative Resultate auf einer Inaktivierung von CgtR4 durch den His-Tag beruhen.

5.1.2.1 Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ und 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$

Die Versuche zur Deletion von *cgtSR4* haben gezeigt, dass die *cgtR4*-Expression für *C. glutamicum* essentiell ist. Zur näheren Charakterisierung der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ bzw. 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$ wurde das Wachstumsverhalten in Flüssigkultur untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die beiden Mutanten als auch der Wildtyp in CgXII-Minimalmedium mit 2 % Glucose vergleichbare Wachstumsraten ($\mu = 0,29 \text{ h}^{-1}$) aufwiesen, unabhängig davon, ob sie in Gegenwart von IPTG kultiviert wurden oder nicht (siehe Abb. 24). Es fällt jedoch auf, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (End-OD₆₀₀ 37,7 bzw. 35,6, + 1 mM IPTG) eine geringere End-OD₆₀₀ erreichen. *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ wächst bis zu einer OD₆₀₀ von 23,3 bzw. 19,1 (+ 1 mM IPTG) und *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$ erreicht nur eine OD₆₀₀ von 12,4 bzw. 15,5 (+ 1 mM IPTG). Der Zusatz von IPTG wirkt sich also nur geringfügig auf die Wachstumsrate aus.

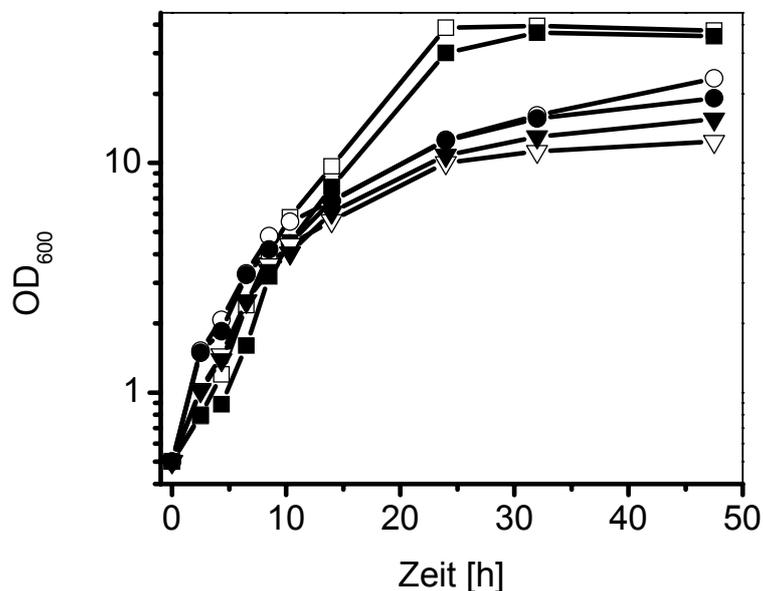


Abb. 24: Wachstum von *C. glutamicum* 13032/pXMJ19, *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ und *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$ in CgXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose bei 30°C. (□) *C. glutamicum* 13032/pXMJ19; (■) *C. glutamicum* 13032/pXMJ19, + 1 mM IPTG; (○) *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$; (●) *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$, + 1 mM IPTG; (▽) *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$; (▼) *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtSR4$; + 1 mM IPTG

5.2 Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4*

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Deletion der chromosomalen *cgtSR4*-Gene abhängig ist von einer Plasmid-kodierten Expression von *cgtR4*, nicht aber von *cgtS4*. Dies deutete darauf hin, dass der Antwortregulator CgtR4 auch in Abwesenheit seiner zugehörigen Sensorkinase aktiv ist. Demzufolge sollte eine Deletion des chromosomalen *cgtS4*-Gens in *C. glutamicum* möglich sein. Zum Ausschalten der Sensorkinase wurden die Basen 58-1203 des *cgtS4*-Gens (entspricht den Aminosäuren 20-401) deletiert und durch eine 21 bp-Sequenz (TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG) ersetzt. Nach der homologen Rekombination wurden die acht erhaltenen Kan^S-Sacc^R-Klone einer PCR-Analyse unterzogen, bei der sechs Klone die gewünschte *cgtS4*-Deletion zeigten (916 bp PCR-Fragment) und zwei die Wildtyp-Situation (2041 bp PCR-Fragment). Die erfolgreiche Deletion wurde in einer Southern-Blot-Analyse bestätigt. Als Sonde diente dabei das gesamte *cgtS4*-Gen, das mit den Primern *cgtSR*-PstI-fw und *cgtS4*-Xho-rv in einer PCR amplifiziert und anschließend mit Digoxigenin markiert wurde. Mit dieser Sonde wurde in *Eco*RI-verdauter chromosomaler DNA des Wildtyps ein 2,9 kb großes Fragment detektiert, in der DNA der Deletionsmutante dagegen ein 1,8 kb großes Fragment (siehe Abb. 25).

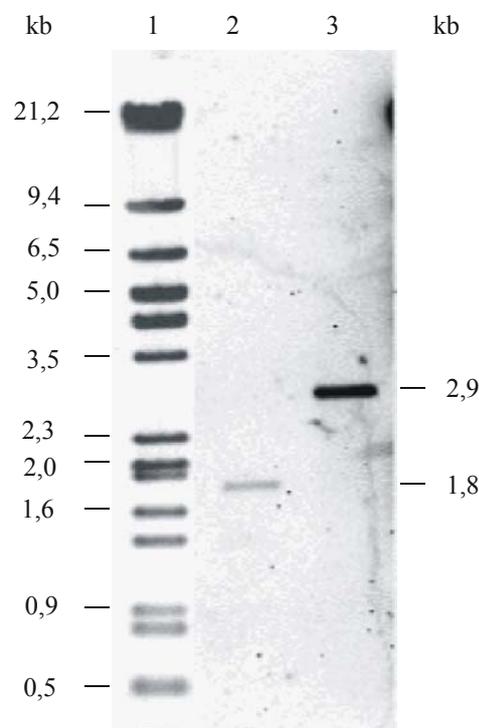


Abb. 25: Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* (Spur 2) und *C. glutamicum* 13032 (Spur 3). Die DNA wurde mit *Eco*RI verdaut und nach Elektrophorese und Blotten mit der DIG-markierten *cgtS4*-Sonde hybridisiert. (Spur 1, DIG-markierter DNA-Standard II+III (Roche Diagnostics))

5.2.1 Wachstumsverhalten der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtS4$

Zur näheren Charakterisierung der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtS4$ wurden Wachstumsversuche in Flüssigkultur durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der $\Delta cgtS4$ -Stamm in CgXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose im Vergleich zum Wildtyp ($\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$) eine deutlich geringere Wachstumsrate ($\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$) aufweist (siehe Abb. 26). Beide Stämme erreichen jedoch die gleiche End-OD₆₀₀. Ähnliche Resultate erbrachte die Kultivierung auf Agarplatten mit BHIS-Vollmedium, bei der die $\Delta cgtS4$ -Mutante nach drei Tagen Inkubation bei 30°C deutlich kleinere Kolonien bildete als der Wildtyp.

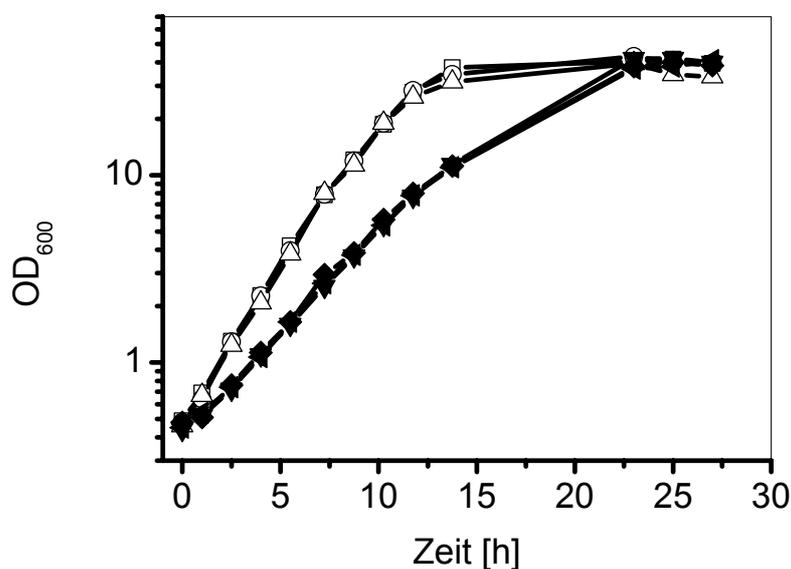


Abb. 26: Wachstum von *C. glutamicum* 13032 (\square , Δ , \circ) und *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtS4$ (\blacktriangleleft , \blacklozenge , \blacktriangledown) in CgXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose bei 30°C.

5.3 Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4$ in Gegenwart von CgtR4-D52N und CgtR4-D52E

Die Signaltransduktion erfolgt bei Zweikomponenten-Systemen durch eine Phosphorylierungskaskade. Die durch Autokinase-Aktivität phosphorylierte Sensorkinase überträgt ihre Phosphorylgruppe auf einen hochkonservierten Aspartat-Rest des Antwortregulators, der im typischen Fall im phosphorylierten Zustand die Expression von bestimmten Zielgenen oder das Zellverhalten moduliert. Aufgrund von vergleichenden Sequenzanalysen mit anderen Antwortregulatoren wurde postuliert, dass der Aspartat-Rest an Position 52 von CgtR4 während der Signaltransduktion phosphoryliert wird.

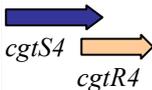
Um die Frage zu beantworten, ob die Phosphorylierung des D52-Restes von CgtR4 für seine essentielle Aktivität nötig ist, wurde die Deletion der *cgtSR4*-Gene in Gegenwart des

Plasmids pXMJ19CgtR4D52N versucht. Dieses Plasmid kodiert für ein CgtR4-Derivat, dessen Aspartat-52-Rest durch ortsgerichtete Mutagenese gegen Asparagin ausgetauscht wurde. Darüber hinaus enthält dieses Plasmid eine weitere stille Mutation in Codon 50 von *cgtR4*, durch die eine zusätzliche *DraI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde, die eine einfache Unterscheidung von Ausgangsplasmid und mutiertem Plasmid ermöglicht. Diese Schnittstelle schließt den Aminosäureaustausch in Codon 52 mit ein. Das Plasmid pXMJ19CgtR4D52N wurde in den Stamm *C. glutamicum*::pK19*mobsacB*Δ*cgtSR4* eingebracht und auf den zweiten Rekombinationsschritt selektioniert. Von vier durch PCR-Analyse getesteten Kan^S-Sacc^R-Klonen besaßen zwei eine *cgtSR4*-Deletion. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die Phosphorylierung des Antwortregulators CgtR4 für seine essentiellen Funktionen nicht notwendig ist, und dass anscheinend die unphosphorylierte Form von CgtR4 aktiv ist. Eine Isolierung des Plasmids pXMJ19CgtR4D52N aus einer der erhaltenen Deletionsmutanten und die Restriktion mit *DraI* ergab, dass die D52N-Mutation immer noch vorhanden war. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass die erfolgreiche Deletion durch unbekannte, sekundäre Mutationen im Plasmid-kodierten *cgtR4*-Gen oder im Chromosom ermöglicht wurde.

Parallel zu dem zuvor beschriebenen Experiment wurde versucht, die *cgtSR4*-Deletion in Gegenwart von CgtR4-D52E durchzuführen. Untersuchungen an dem Zweikomponenten-System NtrB/NtrC aus *E. coli*, welches an der Stickstoff-Regulation beteiligt ist, haben gezeigt, dass ein Austausch des phosphorylierten Aspartat-Restes 54 gegen Glutamat zu einem konstitutiv aktiven Antwortregulator führte (Klose *et al.*, 1993). Der Grund hierfür könnte sein, dass der Glutamat-Rest in diesem Protein die Funktion des phosphorylierten Aspartat-Restes erfüllen kann und so z. B. zu einer veränderten Konformation des Proteins führt. Zwei der vier in Gegenwart des Plasmids pXMJ19CgtR4D52E isolierten Kan^S-Sacc^R-Klone besaßen eine *cgtSR4*-Deletion. Unter der Annahme, dass CgtR4 im unphosphorylierten Zustand aktiv ist, kann man dieses Ergebnis so interpretieren, dass im Falle von CgtR4 der Glutamat-Rest nicht die Funktion eines phosphorylierten Aspartat-Restes übernehmen kann.

In Tab. 7 sind alle oben beschriebenen Experimente zur Konstruktion einer chromosomalen Deletion von *cgtSR4* noch einmal zusammengefasst. Darüber hinaus enthält die Tabelle zwei weitere Versuchsergebnisse, die bei Untersuchungen zu einer möglichen Regulation der *pgm*-Expression durch CgtSR4 durchgeführt wurden (siehe 7.1). Dies führte insgesamt zu 107 analysierten Kan^S-Sacc^R-Klonen, die *cgtR4* nicht Plasmid-kodiert enthielten und alle die Wildtyp-Situation zeigten, während von 38 Kan^S-Sacc^R-Klonen, die *cgtR4* bzw. mutierte Derivate Plasmid-kodiert enthielten, 20 eine *cgtSR4*-Deletion enthielten.

Tab. 7: Zusammenfassung der Versuche zur Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4$. Die in den Integrationsstamm 13032::pK19*mobsacB* $\Delta cgtSR4$ eingeführten Plasmide sind in Spalte 1 und 2 aufgeführt, sonstige Zusätze unter der Spalte „Additive“. Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind in den Spalten 4-6) dargestellt. Insgesamt zeigten von 107 analysierten Kan^S-Sacc^R-Klonen, die *cgtR4* nicht Plasmid-kodiert enthielten, alle die Wildtyp-Situation, während von 38 Kan^S-Sacc^R-Klonen, die *cgtR4* bzw. mutierte Derivate Plasmid-kodiert enthielten, 20 eine *cgtSR4*-Deletion aufwiesen.

Plasmid	Insert	Additive	PCR-Analyse von Kan ^S -Sacc ^R -Klonen		
			Getestet	WT	$\Delta cgtSR4$
--	--	--	40	40	0
pXMJ19	--	--	9	9	0
pXMJ19CgtSR4		--	10	5	5
pXMJ19CgtR4		--	8	2	6
pXMJ19CgtR4-His		--	12	7	5
pXMJ19CgtR4D52N		--	4	2	2
pXMJ19CgtR4D52E		--	4	2	2
pXMJ19Pgm		+/- IPTG	12/33	12/33	0/0
pXMJ19Pgm		4 % Glc 1 % Pyr	13	13	0

6 Konstruktion einer konditionalen Mutante

Da eine chromosomale Deletion von *cgtSR4* nur in Gegenwart einer Plasmid-kodierten Kopie von *cgtR4* möglich war, sollte ein *C. glutamicum*-Stamm konstruiert werden, der die chromosomalen *cgtSR4*-Gene unter der Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors enthält, um eine durch IPTG regulierbare Expression von *cgtSR4* zu ermöglichen. Dazu wurde das Plasmid pCGEX5KCgtS4 konstruiert (siehe III 2.1). Es enthält die Codons 1-213 des *cgtS4*-Gens einschließlich 30 bp stromaufwärts des postulierten *cgtS4*-Translationsstarts, um eine homologe Rekombination zu ermöglichen. Das Plasmid pCGEX5K ist ein Derivat des Vektors pXMJ19, bei dem der Replikationsursprung für *C. glutamicum* 13032 deletiert und die Chloramphenicol-Resistenz gegen eine Kanamycin-Resistenz ausgetauscht wurde. Durch Integration des Plasmids pCGEX5KCgtS4 ins Chromosom mittels homologer Rekombination sollte einerseits ein nicht funktionsfähiges Genfragment des *cgtS4*-Gens entstehen und andererseits ein vollständiges *cgtS4*-Gen unter der Kontrolle des Vektor-kodierten *tac*-Promotors (siehe Abb. 27). Das Plasmid pCGEX5KCgtS4 wurde durch Elektroporation in *C. glutamicum* 13032 transferiert und Kanamycin-resistente Integrierten

(*C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4) selektioniert. Die korrekte Integration von pCGEX5KCgtS4 wurde durch PCR mit den Primern pEKEX2-fw und cgtS4-rv überprüft.

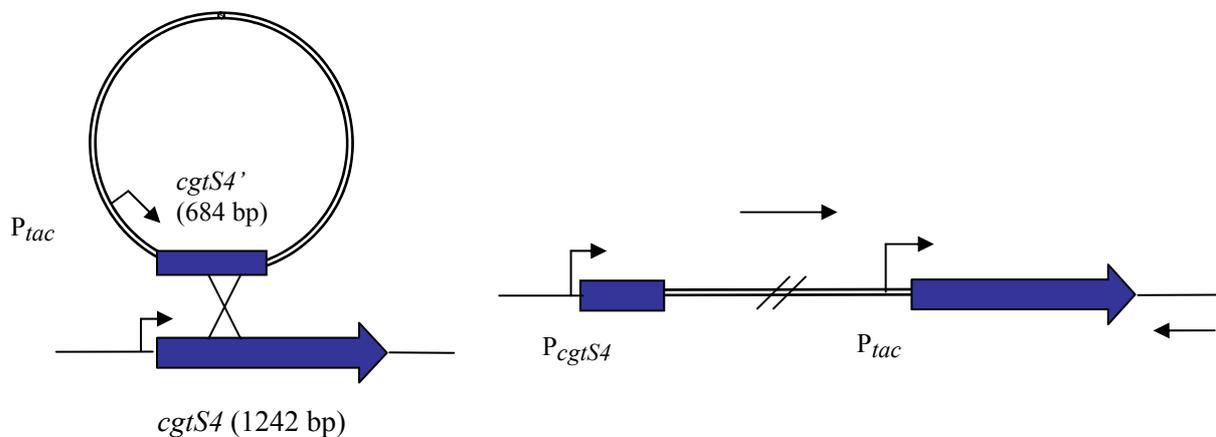


Abb. 27: Konstruktion der konditionalen Mutante *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4 durch Integration des entsprechenden Plasmids in das Genom von *C. glutamicum* über homologe Rekombination. Die Primer pEKEX2-fw und cgtS4-rv, die für eine anschließende Kontroll-PCR eingesetzt wurden, sind durch Pfeile markiert.

6.1 Auswirkungen reduzierter *cgtSR4*-Expression auf das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4

Die Versuche zur Deletion von *cgtSR4* haben gezeigt, dass die Expression von *cgtR4* für *C. glutamicum* essentiell ist, zumindest unter den gegebenen Bedingungen. Eine verringerte Expression von *cgtSR4* sollte daher einen negativen Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum* haben. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4 bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen getestet. Die Zellen wurden in LB-Medium ohne IPTG vorkultiviert und die Hauptkultur wurde in LB-Medium mit 0 μ M, 10 μ M, 100 μ M oder 1 mM IPTG mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp verfolgt. Wie in Abb. 28 gezeigt, konnte *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4 auch ohne Zugabe von IPTG wachsen, allerdings mit einer niedrigeren maximalen Wachstumsrate und zu einer geringeren End-OD₆₀₀. Bereits bei Zugabe von 10 μ M IPTG zum Medium war das Wachstum der Mutante vergleichbar mit dem des Wildtyps. Da aus den vorausgegangenen Versuchen zur Konstruktion einer *cgtSR4*-Deletionsmutante bekannt war, dass der *tac*-Promotor auch in Abwesenheit von IPTG eine signifikante Basalexpression erlaubt, war nicht zu erwarten, dass das Wachstum von 13032::pCGEX5KCgtS4 in Abwesenheit von IPTG völlig gehemmt ist. Zur Überprüfung, ob in dem Stamm *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4, der ohne IPTG kultiviert wurde, keine oder nur eine geringe Expression von *cgtSR4* stattfindet, könnte zusätzlich auf Proteinebene ein Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen CgtS4 bzw. CgtR4 erfolgen.

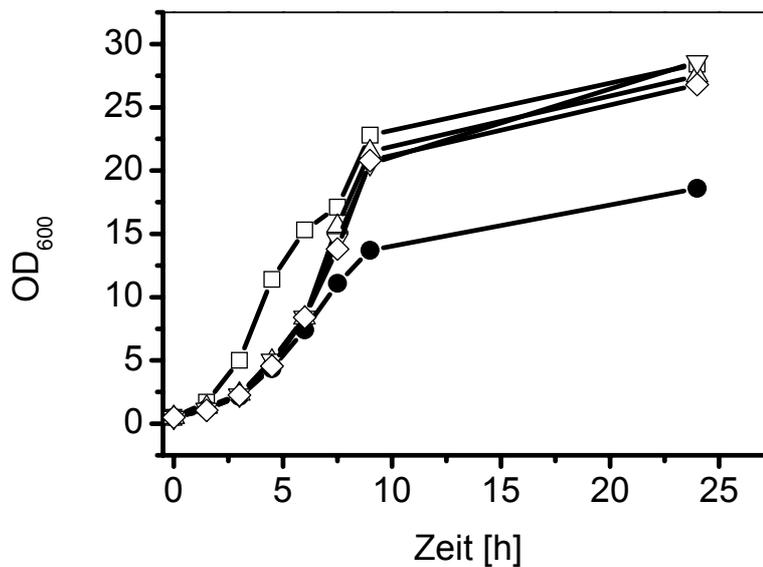


Abb. 28: Wachstum von *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4 und *C. glutamicum* 13032 in LB-Medium mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen. (□) *C. glutamicum* 13032; (◇) *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4, 10 μM IPTG; (▽) *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4, 100 μM IPTG; (△) *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4, 1 mM IPTG; (●) *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4, - IPTG

7 Identifizierung putativer CgtSR4-regulierter Zielgene

7.1 Untersuchungen zur Regulation des *pgm*-Gens durch CgtSR4

Zahlreiche Zweikomponenten-Systeme regulieren Gene, die in direkter Nachbarschaft des jeweiligen Regulationssystems lokalisiert sind wie z. B. CitAB aus *Klebsiella pneumoniae* (Bott *et al.*, 1995). Das postulierte Startcodon von *cgtS4* liegt 10 bp stromabwärts vom Stopcodon des Phosphoglyceratmutase-Gens *pgm*. 311 bp stromabwärts von *cgtR4* befindet sich das Startcodon eines hypothetischen Gens, gefolgt von einem weiteren hypothetischen Gen. Alle Gene werden in gleicher Orientierung transkribiert. Die direkte Nachbarschaft von *pgm*, *cgtS4* und *cgtR4* in *C. glutamicum* machte eine Cotranskription der drei Gene wahrscheinlich und deutete auf eine mögliche Regulation dieses glykolytischen Enzyms durch das CgtS4/CgtR4-System hin. Daher war es von Interesse zu überprüfen, ob eine Plasmid-vermittelte Expression des *pgm*-Gens eine Deletion der chromosomalen *cgtSR4*-Gene ermöglicht. Dazu wurde das Plasmid pXMJ19Pgm konstruiert (siehe III 2.1), in dem das *pgm*-Gen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors steht. Anschließend wurde das Plasmid in den Integrationsstamm *C. glutamicum* 13032::pK19mobsacBΔ*cgtSR4* eingebracht und der zweite homologe Rekombinationsschritt in Abwesenheit von IPTG durchgeführt. Die 33

erhaltenen Kan^S-Sacc^R-Klone zeigten bei der PCR-Analyse ausschließlich die genetische Wildtypsituation (2736 bp Fragment, siehe Tab. 7). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die alleinige Expression des *pgm*-Gens nicht ausreicht, um die *cgtSR4*-Gene zu deletieren. Auch wenn der zweite Rekombinationsschritt in Anwesenheit von IPTG durchgeführt wurde, um eine höhere Phosphoglyceratmutase-Aktivität zu erreichen, zeigten alle 12 untersuchten Kan^S-Sacc^R-Klone die Wildtypsituation. Des Weiteren wurde versucht, die *cgtSR4*-Deletion unter Bedingungen zu erzeugen, unter denen das Wachstum der Zellen unabhängig von der Phosphoglyceratmutase-Aktivität ist. Dazu wurde der zweite Rekombinationsschritt mit der Integrationsmutante *C. glutamicum*::pK19*mobsacBΔcgtSR4* in Gegenwart von 4 % Glucose und 1 % Pyruvat durchgeführt. In Gegenwart dieser beiden C-Quellen kann die Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 Δ *pgm1* in CgXII-Minimalmedium wachsen, wenn auch langsamer als der Wildtyp (Roman Netzer, 2001 unveröffentlicht). Um einen möglichen Wachstumsnachteil der Δ *cgtSR4*-Mutante gegenüber dem Wildtyp auszugleichen, wurden die Zellen diesmal doppelt so lange wie bisher (96 h) auf Platten mit 10 % Saccharose inkubiert. Beim Screenen von Kan^S-Sacc^R-Klonen wurden verstärkt kleinere Kolonien untersucht. Alle 13 durch PCR getesteten Kan^S-Sacc^R-Klone zeigten die genetische Wildtypsituation (2736 bp großes PCR-Fragment, siehe Tab. 7). Dieses Ergebnis bestätigt die vorausgegangenen Ergebnisse und zeigt, dass eine mögliche Regulation des *pgm*-Gens durch CgtSR4 nicht für die wahrscheinliche Essentialität von CgtR4 verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte in den globalen Transkriptomanalysen gezeigt werden, dass trotz Überexpression des *cgtR4*-Gens keine Veränderung der *pgm*-Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Tab. 9). Dies ist ein Indiz dafür, dass die *pgm*-Expression nicht durch CgtSR4 reguliert wird.

7.2 Bindungsassay zur Identifizierung CgtR4-regulierter Gene mittels Dynabeads[®] Streptavidin

Zur Identifizierung von Genen, die durch das Zweikomponenten-System CgtSR4 reguliert werden, wurden Bindungsassays durchgeführt, bei denen CgtR4 mit Hilfe des *Strep*-tags an Dynabeads[®] Streptavidin gebunden wurde. Diese superparamagnetischen „Beads“ sind mit Streptavidin beschichtet und erlauben eine nicht-kovalente Bindung von biotinylierten Proteinen sowie Proteinen, die mit einem *Strep*-tag II fusioniert sind. Das immobilisierte Protein wurde mit *EcoRI/PstI*-verdauter chromosomaler DNA von *C. glutamicum* inkubiert. DNA-Fragmente, die spezifisch durch CgtR4 gebunden werden, sollten auf diese Weise isoliert und anschließend kloniert und sequenziert werden. Durch einen Vergleich der DNA-

Sequenzen mit der Genomsequenz von *C. glutamicum* sollte ermittelt werden, welche Gene benachbart zu den gebundenen putativen Promotor-DNA-Fragmenten lokalisiert sind.

Wenn das unmittelbar aus der StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie erhaltene, gereinigte CgtR4-Strep-Protein mit den Dynabeads® Streptavidin inkubiert wurde, konnte keine Bindung beobachtet werden, vermutlich durch das im Elutionspuffer befindliche Desthiobiotin. Daher wurden die Dynabeads in der Folge durch Inkubation mit Rohextrakt des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)/pET24-CgtR4Strep mit CgtR4-Strep beladen. Dazu wurden die Zellen in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und dann die Expression von CgtR4-Strep durch Zugabe von IPTG induziert. 3 h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet und durch Ultraschall (Pulsstärke 80 %, Cyclefrequenz 70 %, 3 x 20 s Puls) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 17600 g, 4°C) abgetrennt, der Rohextrakt zusammen mit den „Dynabeads® Streptavidin“ inkubiert und unspezifisch gebundene Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Beladung der Dynabeads mit CgtS4-Strep und die Abwesenheit weiterer Proteine wurde durch SDS-PAGE-Analyse kontrolliert.

Die Bindung von chromosomalen DNA-Fragmenten an CgtR4-Strep wurde in drei parallelen Ansätzen untersucht. In Ansatz A enthielt der Bindungspuffer 75 mM NaCl, in Ansatz B 100 mM NaCl und in Ansatz C 100 mM NaCl sowie 100 µM Berylliumfluorid. Berylliumfluorid ist ein Phosphat-Analogon, das bei einer Reihe von „Response“-Regulatoren an die Phosphorylierungsstelle bindet und eine Phosphorylierung vortäuschen kann. Dies wurde am Beispiel des Antwortregulators NtrC nachgewiesen und der gleiche Effekt wird auch für die Antwortregulatoren CheY, OmpR, NarL und Spo0F postuliert (Yan *et al.*, 1999). Im Fall von CgtS4 wurde dieser Effekt allerdings bisher nicht analysiert. Die drei Ansätze mit den CgtR4-beladenen Dynabeads® Streptavidin wurden mit *EcoRI/PstI*-verdauter chromosomaler DNA inkubiert. Beide Restriktionsenzyme besitzen eine 6-bp-Erkennungssequenz. Ein solches Restriktionsenzym schneidet bei vier verschiedenen Basen statistisch jeweils nach 4096 bp (4⁶). Bei Verwendung von zwei Enzymen mit einer 6-bp-Erkennungssequenz sollten daher durchschnittlich 2 kb große DNA-Fragmente erzeugt werden. Die Vollständigkeit des *EcoRI/PstI*-Verdaus der chromosomalen DNA wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Es war eine gleichmäßige Verteilung der DNA in der Gelspur zu erkennen. Nach Inkubation mit CgtR4 wurde unspezifisch gebundene DNA durch Waschen der „Beads“ entfernt und spezifisch gebundene DNA mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert.

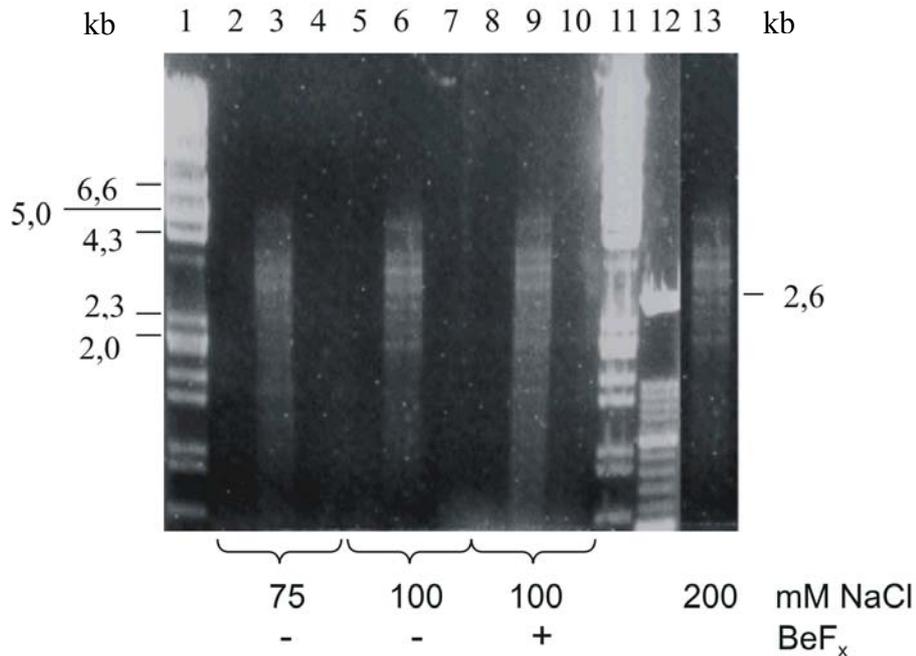


Abb. 29: Agarose-Gelelektrophorese der Ethanol-gefällten DNA aus den DNA-Bindungsassays. Der erste Ansatz (A) enthielt 75 mM NaCl (Spur 2-4), der zweite Ansatz (B) 100 mM NaCl (Spur 5-7), dem dritten Ansatz (C) wurde neben 100 mM NaCl 100 μ M BeF_x zugesetzt (Spur 8-10). Die DNA wurde mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen von den „Beads“ eluiert, anschließend gefällt und in 15 μ l Wasser aufgenommen. Jeweils der gesamte Ansatz wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1 und 11, DNA-Standard II+III (Roche Diagnostics); Spur 2, 5 und 8, mit 200 mM NaCl eluierte DNA; Spur 3, 6, 9 und 13, mit 600 mM NaCl eluierte DNA; Spur 4, 7 und 10, mit 1,2 M NaCl eluierte DNA; Spur 12, DNA-Standard XIV (Roche Diagnostics)

Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt, in Wasser gelöst und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dabei konnten in allen Ansätzen (A, B, C), bei denen die DNA mit 600 mM NaCl eluiert worden war, fünf starke Banden zwischen 2,6 und 4,3 kb sowie eine Reihe schwächerer Banden detektiert werden (siehe insbesondere Spur 6 in Abb. 29). Die fünf DNA-Banden wurden aus dem Gel eluiert und es wurde versucht, sie in den Vektor pUC18 zu klonieren. Der Vektor wurde mit *EcoRI/PstI* und mit beiden Enzymen separat verdaut angeboten. Bei einem Einzelverdau wurde der Vektor zusätzlich dephosphoryliert. Die Insertion von DNA-Fragmenten wurde durch Blau-Weiß-Selektion und zusätzlich durch Restriktionsverdaus überprüft. Obwohl sich das Bandenmuster des DNA-Bindungsassays reproduzieren ließ und die DNA aus mehreren Ansätzen „gepoolt“ wurde, blieb eine Klonierung der DNA-Fragmente jedoch erfolglos. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der eluierten DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, ohne dabei DNA-Banden nachweisen zu können. Dies führt zu der Annahme, dass die DNA-Konzentration im Eluat zu gering war und könnte eine Ursache dafür sein, dass sich die DNA-Fragmente nicht ligieren ließen. In einem weiteren Versuch wurde „low-melting“-Agarose verwendet, um die DNA-Banden direkt in eine Ligation einzusetzen, auch hier konnte jedoch kein Insert detektiert werden.

7.3 Suche nach Zielgenen von CgtR4 mittels globaler Genexpressionsanalysen

Um das *cgtR4*-Regulon zu definieren, das heißt, die Gene zu identifizieren, deren Expression vom Antwortregulator CgtR4 kontrolliert wird, wurden genomweite Transkriptomanalysen mit DNA-Microarrays durchgeführt. Dabei wurde ein DNA-Chip, der ca. 300-500 bp lange PCR-Produkte von 3530 *C. glutamicum*-Orfs enthielt, mit Fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden hybridisiert, die aus Gesamt-RNA der zu vergleichenden Kulturen synthetisiert wurden. Dazu wurde eine Probe mit einem grün-fluoreszierenden Farbstoff markiert (Cy3) und die andere Probe mit rot-fluoreszierenden Farbstoff markiert (Cy5). Für die Untersuchung des *cgtR4*-Regulons wurden zwei Stammpaare miteinander verglichen, nämlich *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 mit *C. glutamicum* 13032/pXMJ19 und *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* mit *C. glutamicum* 13032. Aufgrund der Essentialität von *cgtR4* war ein Vergleich zwischen einer Δ *cgtSR4*-Deletionsmutante und dem Wildtyp leider nicht möglich.

7.3.1 Transkriptom-Vergleich von *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 und *C. glutamicum* 13032/pXMJ19 bei Wachstum in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat als C-Quelle

Der Stamm *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 unterscheidet sich vom Stamm 13032/pXMJ19 in zwei Punkten, nämlich durch die Abwesenheit der Sensorkinase CgtS4 und durch eine erhöhte Konzentration des Antwortregulators CgtR4, da dieser Plasmid-kodiert vorliegt. Der zweite Punkt wurde durch einen Western-Blot mit CgtR4-Antiserum nachgewiesen, bei dem in der Mutante eine ca. 10-fach höhere CgtR4-Konzentration detektiert wurde (siehe Abb. 30). Es kann auch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es pXMJ19-bedingte Expressionsunterschiede in den beiden Stämmen gibt. Untersuchungen von V. Wendisch haben gezeigt, dass die Anwesenheit von pXMJ19 in *C. glutamicum* MH20-22B (Lysin-Produktionsstamm) zu einer starken Reduzierung der Lysinbildung führte.



Abb. 30: Western-Blot-Analyse zum Nachweis von CgtR4 in den Stämmen *C. glutamicum* 13032/pXMJ19 und *C. glutamicum* 13032 Δ cgtSR4/pXMJ19CgtR4. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von ca. 4 (*C. glutamicum* 13032/pXMJ19 und *C. glutamicum* 13032 Δ cgtSR4/pXMJ19CgtR4, - IPTG) bzw. bei einer OD_{600} von 1,5 (*C. glutamicum* 13032 Δ cgtSR4/pXMJ19CgtR4, + 1 mM IPTG) geerntet. 25 μ g Protein des jeweiligen Rohextraktes wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das CgtR4-Antiserum für die anschließende Western-Blot-Analyse wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt. Spur 1, *C. glutamicum* 13032/pXMJ19; Spur 2, *C. glutamicum* 13032 Δ cgtSR4/pXMJ19CgtR4 (- IPTG); Spur 3, *C. glutamicum* 13032 Δ cgtSR4/pXMJ19CgtR4 (+ 1 mM IPTG).

Die Stämme wurden in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat (siehe Abb. 31) und nicht mit Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert, da parallel noch ein weiterer Vergleich durchgeführt wurde, bei dem die Stämme nur bei Wachstum auf Lactat, nicht aber auf Glucose eine annähernd gleiche Wachstumsrate besaßen. Die Kultivierung wurde mindestens über sechs Generationen fortgeführt, wobei mehrmals neu überimpft wurde, um eine vollständige Adaptation an das Medium zu gewährleisten. Die Kulturen zur Isolierung von RNA wurden in der exponentiellen Phase bei einer OD_{600} von 4 geerntet. Die Zellen hatten eine durchschnittliche Wachstumsrate von $0,17 \text{ h}^{-1}$ (*C. glutamicum* 13032/pXMJ19) und $0,16 \text{ h}^{-1}$ (13032 Δ cgtSR4/pXMJ19CgtR4). Die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten DNA-Chip-Analysen führten zur Identifizierung einer begrenzten Anzahl von Genen, deren mRNA-Level reproduzierbar verändert war. In der Mutante besaßen 7 Gene in allen drei Versuchen eine mindestens 2-fach erhöhte mRNA-Menge gegenüber dem Wildtyp und 12 Gene eine mindestens 2-fach reduzierte mRNA-Menge.

Betrachtet man die Gengruppe mit erniedrigtem mRNA-Spiegel in der Mutante, so stehen diese in keinem funktionellen Zusammenhang (siehe Tab. 8). Es wurden die Gene des *gluABCD*-Operons identifiziert, welche für ein hochspezifisches Glutamataufnahmesystem in *C. glutamicum* kodieren. Untersuchungen haben gezeigt, dass alle vier Gene dieses ABC-Transporters deletierbar sind und eine heterologe Expression dieser Gene in *E. coli* diese Spezies zum Wachstum auf Glutamat als einziger Kohlenstoffquelle befähigt (Burkovski und Krämer, 1995; Kronemeyer *et al.*, 1995). Die Gene *mutAB* kodieren für die beiden Untereinheiten der Methylmalonyl-CoA-Mutase. Dieses Enzym katalysiert die reversible Umwandlung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA (Vrijbloed *et al.*, 1999). Das *pcrA*-Gen kodiert für eine Helicase und ist höchstwahrscheinlich Teil eines polycistronischen

Operons, das noch weitere Helicase-Gene enthält. Die Helicase PcrA, ein DNA-entwindendes Enzym, ist essentiell für das Zellwachstum der Gram-positiven Bakterien wie z. B. *B. subtilis* (Petit *et al.*, 1998; Petit und Ehrlich, 2002). Zusätzlich wurden noch sieben weitere Gene mit erniedrigter Expression beobachtet, deren Funktion bislang unbekannt ist. Erwartungsgemäß war der mRNA-Level von *cgtS4* in der Mutante erniedrigt, da dieses Gen weder chromosomal noch Plasmid-kodiert vorlag und somit in diesem Experiment als Kontrolle diente. Zusätzlich sind Gene aufgeführt, deren mRNA-Verhältnis zwar nicht den oben genannten Kriterien entspricht, die aber in Operons liegen, von denen mindestens ein Gen den Kriterien entsprach.

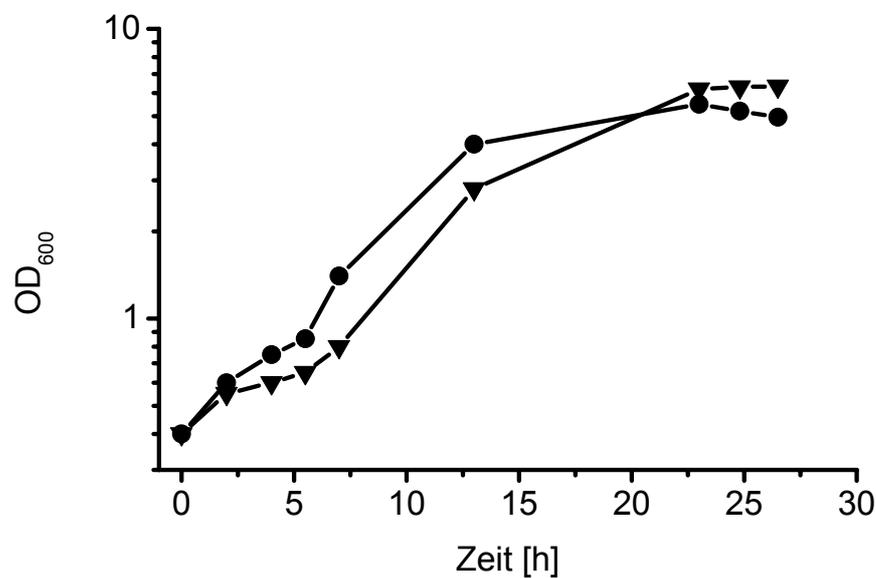


Abb. 31: Wachstum von *C. glutamicum* 13032/pXMJ19 (▼) und *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 (●) in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat als Kohlenstoffquelle.

Tab. 8: Gene, deren mRNA-Level in *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 (M) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032/pXMJ19 (WT) mindestens 2-fach erniedrigt war. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat kultiviert worden waren. Die Daten stellen die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Gene eines Operons, die nicht in allen drei Experimenten auswertbar waren oder nicht allen Kriterien genügten, wurden der Vollständigkeit halber ergänzt und durch einen Stern in Spalte 5 markiert. Spalte n gibt die Anzahl der Experimente an, in denen die Gene auswertbar waren.

NCgl	Orf	Gen	Beschreibung	WT/M	p-Wert	n
1875	2040	<i>gluA</i>	Glutamat ABC Transporter (ATP-Bindung)	2,63±0,10*	0,012	3
1876	2041	<i>gluB</i>	Glutamat ABC Transporter (Bindeprotein)	2,86±0,05	0,002	3
1877	2042	<i>gluC</i>	Glutamat ABC Transporter (Permease)	3,85±0,06	0,004	3
1878	2043	<i>gluD</i>	Glutamat ABC Transporter (Permease)	1,89±0,16*	0,036	3
1472	2411	<i>mutA</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase A Kette	1,92*	n.b.	1
1471	2410	<i>mutB</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase B-Kette	2,56±0,11	0,016	3
0708	1260		möglicher Transkriptionsregulator	n.a.		0
0707	1259		DNA/RNA-Helicase SNF2 Familie	1,41±0,31*	0,042	2
0706	1258		Typ IV Restriktions-Modifizierungssystem	3,57±0,25*	0,018	3
0705	1255	<i>ihr</i>	mögliche ATP-abhängige Helicase Ihr	1,69±0,08*	0,008	2
0704	1254	<i>pcrA</i>	ATP-abhängige Helicase	2,77±0,08	0,009	3
0703	1253		hypothetisches cytosolisches Protein	2,04±0,14*	0,039	3
0702	1252		hypothetisches cytosolisches Protein	1,45±0,39*	0,084	2
0701	1250		Transkriptionsregulator	2,5±0,19*	0,044	3
0700	1249		ATP-abhängige Helicase	2,17±0,23*	0,049	3
0391	870	<i>cgtS4</i>	Sensorkinase <i>cgtS4</i>	4,55±0,12	0,036	3
2584	21		hypothetisches Protein	5,88	n.b.	1
0776	1349		hypothetisches Protein	2,78±0,25	0,077	3
1170	1818		hypothetisches Protein	3,4±0,07	0,005	3
1470	2409		hypothetisches Protein	2,78±0,21	0,046	3
--	2801		hypothetisches Protein	2,04±0,10	0,013	3
1646	3347		hypothetisches Protein	2,27±0,10	0,011	3

Tab. 9: Gene, deren mRNA-Level in *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ (M) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032/pXMJ19 (WT) mindestens 2-fach erhöht war. Details siehe Tab. 8.

NCgl	Orf	Gen	Beschreibung	M/WT	p-Wert	n
2486	2871	<i>pstS</i>	Phosphat ABC Transporter (Bindeprotein)	6,52±1,18	0,001	3
2485	2873	<i>pstC</i>	Phosphat ABC Transporter (Permease)	5,99	n.b.	1
2484	2875	<i>pstA</i>	Phosphat ABC Transporter (Permease)	3,3	n.b.	1
2483	2876	<i>pstB</i>	Phosphat ABC Transporter (ATP-Bindung)	3,63	n.b.	1
1329	2641	<i>ugpA</i>	sn-Glycerin-3-phosphat ABC Transporter (Permease)	2,94	n.b.	1
1330	2640	<i>ugpE</i>	sn-Glycerin-3-phosphat ABC Transporter (Permease)	1,76*	n.b.	1
1331	2639	<i>ugpB</i>	sn-Glycerin-3-phosphat ABC Transporter (Bindeprotein)	2,92*	n.b.	1
1332	2638	<i>ugpC</i>	sn-Glycerin-3-phosphat ABC Transporter (ATP-Bindung)	1,03*	n.b.	1
1333	2637	<i>glpQ</i>	Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase	2,6	n.b.	1
1050	1676	<i>ykvI</i>	unbekanntes Membranprotein aus <i>B. subtilis</i> , putativer Transporter	2,0	n.b.	1
0392	871	<i>cgtR4</i>	Antwortregulator <i>cgtR4</i> (nicht auf dem Chip)	--	n.b.	
0390	869	<i>pgm</i>	Phosphoglyceratmutase	0,82±0,28*	0,297	3

Betrachtet man die Gengruppe mit erhöhtem mRNA-Level in der Mutante so fällt auf, dass bis auf das Gen *ykvI* alle weiteren Gene in einem funktionellen Zusammenhang mit der Bereitstellung von Phosphat stehen (siehe Tab. 9). Die Gene des *pst*-Operons kodieren für einen hochaffinen Phosphattransporter, der unter Phosphat-Mangelbedingungen für die ausreichende Versorgung mit anorganischem Phosphat dient (Wanner, 1995). Die Gene des *ugp*-Operons kodieren für einen spezifischen ABC-Transporter für Glycerin-3-phosphat und Glycerin-3-phosphoryldiester (Brzoska und Boos, 1988). Stromabwärts des *ugp*-Operons liegt in divergenter Orientierung das *glpQ*-Gen für eine Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase, das ebenfalls einen erhöhten mRNA-Level in der Mutante aufwies. In *C. glutamicum* konnte durch genomweite Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass sowohl die *pst*-Gene als auch die *ugp*-Gene unter Phosphatmangelbedingungen induziert werden (Ishige *et al.*, 2003) und zwar höchstwahrscheinlich durch das Zweikomponenten-

System PhoRS (Mickova *et al.*, in Vorbereitung). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das CgtSR4-System an der Regulation von Genen beteiligt ist, die unter Phosphatmangelbedingungen exprimiert werden, aber vermutlich nicht das spezifische Phosphatmangel-Regulationssystem darstellt. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass nicht alle Gene, die bei Phosphatmangel durch das *C. glutamicum* PhoRS-System induziert werden, in dem hier beschriebenen Experiment einen erhöhten mRNA-Level im Stamm $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ zeigten. Weiterhin deutet dieser Befund darauf hin, dass die erhöhte Expression der *pst*- und *ugp*-Gene nicht auf einer Regulation von PhoRS durch CgtSR4 beruht. Der mRNA-Level von *cgtR4* konnte in diesem Experiment nicht als interne Kontrolle benutzt werden, da das entsprechende PCR-Produkt auf dem DNA-Chip fehlte.

7.3.1.1 Unabhängige Überprüfung der DNA-Chip-Analysen mittels Transkriptionsfusionen

Um die Ergebnisse der DNA-Chip-Analysen zu überprüfen, wurden die Promotorregionen des *pst*-Operons sowie des *ugp*-Operons in den Vektor pET2 (Vasicova *et al.*, 1998) kloniert und zwar vor ein promotorloses Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*). Die erhaltenen Konstrukte pET2-*pst* und pET2-*ugp* wurden von Malgorzata Krause (AG Dr. V. Wendisch) zur Verfügung gestellt. Da der Vektor pXMJ19 eine Chloramphenicol-Resistenz trägt, waren die Stämme 13032/pXMJ19 und $\Delta cgtSR4/pXMJ19CgtR4$ für die Bestimmung der CAT-Aktivität von pET2, pET2-*pst* und pET2-*ugp* unbrauchbar. Daher wurde eine neue $\Delta cgtSR4$ -Deletionsmutante konstruiert, bei der das *cgtR4*-Gen statt in pXMJ19 in dem Vektor pVWex2 vorlag, der eine Tetracyclin-Resistenz trägt. Das Plasmid pVWex2CgtR4 wurde in die Integrationsmutante *C. glutamicum* 13032::pK19*mobsacB* $\Delta cgtSR4$ transferiert und die chromosomalen *cgtSR4*-Gene in Gegenwart dieses Plasmids deletiert. Die PCR-Analyse ergab, dass zwei von fünf getesteten Kan^S-Sacc^R-Klonen eine chromosomale Deletion der *cgtSR4*-Gene besaßen. Die Plasmide pET2, pET2-*pst* und pET2-*ugp* wurden anschließend in die Stämme *C. glutamicum* 13032/pVWex2 und *C. glutamicum* 13032 $\Delta cgtSR4/pVWex2CgtR4$ eingebracht. Danach wurden die Stämme in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 4 kultiviert und geerntet. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde die Enzymaktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase im Rohextrakt gemessen (siehe Tab. 10). Die gemessenen CAT-Aktivitäten bestätigten qualitativ die DNA-Chip-Daten, da beide Promotoren im Stamm $\Delta cgtSR4/pVWex2CgtR4$ eine erhöhte Aktivität zeigten.

Tab. 10: Promotorstudien zur Regulation des *pst*- und des *ugp*-Operons durch CgtR4. In Spalte 4 ist das Verhältnis der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivitäten von *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pVWex2CgtR4 und *C. glutamicum* 13032/pVWex2 dargestellt, in Spalte 5 das Verhältnis der *pst*- und der *ugp*-mRNA-Level in dem Stammpaar *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 / *C. glutamicum* 13032/pXMJ19.

Promotor	spez. CAT-Aktivität in 13032/pVWex2 [U/mg Protein]	spez. CAT-Aktivität in 13032 Δ <i>cgtSR4</i> /pVWex2CgtR4 [U/mg Protein]	Ratio (CAT)	Ratio (Chip)
<i>pst</i>	0,03	0,75	24,5	4,35
<i>ugp</i>	4,2	11,1	2,64	2,0

7.3.2 Vergleich der Genexpression von *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium

In einer weiteren Serie von Transkriptomanalysen wurde die Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* mit dem Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* 13032 verglichen. Im Gegensatz zur vorhergehenden Transkriptomanalyse unterscheiden sich die hier verwendeten Stämme nur in einem Merkmal, nämlich der An- bzw. Abwesenheit des *cgtS4*-Gens. Die Stämme wurden diesmal in CgXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose kultiviert und zur RNA-Isolierung in der exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ von ca. 4 geerntet. Im Vergleich zum Wildtyp ($\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$) hatte die Δ *cgtS4*-Mutante zum Zeitpunkt der RNA-Isolation eine geringere Wachstumsrate ($\mu = 0,26 \text{ h}^{-1}$). Die Auswertung von drei unabhängig durchgeführten DNA-Chips ergab, dass 14 Gene eine ≥ 2 -fach erhöhte mRNA-Menge gegenüber dem Wildtyp-Stamm aufwiesen (siehe Tab. 12) und 15 eine ≥ 2 -fach reduzierte mRNA-Menge (siehe Tab. 11).

Betrachtet man die Gengruppe mit erniedrigtem mRNA-Level, so enthält diese wie erwartet *cgtS4*, das als interne Kontrolle diente. Zwei nebeneinander liegende Gene, die für einen Transporter unbekannter Funktion und für eine L-Lactat-Dehydrogenase kodieren, zeigten eine bis zu 17-fach erniedrigte Expression. Das *lldA*-Gen kodiert für eine Membran-assoziierte L-Lactat-Dehydrogenase, welche die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat katalysiert. Anders als bei löslichen Lactat-Dehydrogenasen, die ihre Elektronen bei der Umwandlung von Pyruvat zu Lactat auf NAD⁺ übertragen, werden hier die Elektronen auf Chinone der Atmungskette transferiert (Erwin und Gotschlich, 1996). Des weiteren zeigte eine mögliche Glycosyltransferase eine erniedrigte Expression, die möglicherweise gemeinsam mit zwei weiteren Genen (*murA*, *murB*) in einem Operon transkribiert wird. *murA* und *murB* kodieren für zwei Enzyme, die den ersten Schritt der Mureinsynthese katalysieren

(Brown *et al.*, 1995). Auch die *prp*-Gene zeigten einen erniedrigten mRNA-Level. In *C. glutamicum* existieren zwei Gencluster *prpD1B1C1* und *prpD2B2C2*, die für Enzyme des Propionat-Abbaus über den 2-Methylcitrat-Zyklus kodieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Gencluster *prpD2B2C2* (entspricht NCgl-Nr. 628-630) essentiell für das Wachstum auf Propionat ist (Claes *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden Gene identifiziert, die für einen Trehalose/Maltose-ABC-Transporter kodieren. Die Genprodukte von *argF* und *leuD* kodieren für Enzyme, die an der Aminosäurebiosynthese von Arginin bzw. Leucin beteiligt sind. Außerdem zeigten noch zwei Gene unbekannter Funktion sowie ein Gen, das für ein sekretorisches lytisches Peptidoglycanprotein kodiert, eine erniedrigte Expression. Alle diese Gene stehen in keinem offensichtlichen funktionellen Zusammenhang.

Tab. 11: Gene, deren mRNA-Level in *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* (M) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032 (WT) mindestens 2-fach erniedrigt waren. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in CgXII-Minimalmedium mit 4% Glucose kultiviert wurden. Die Daten stellen die Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar. Gene eines Operons, die nicht in allen drei Experimenten auswertbar waren oder nicht allen Kriterien genügten, wurden der Vollständigkeit halber ergänzt und durch einen Stern in Spalte 5 markiert. Spalte n gibt die Anzahl der Experimente an, in denen die Gene auswertbar waren.

NCgl	Orf	Gen	Beschreibung	WT/M	p-Wert	n
2818	314		hypothetisches Protein	1,37±0,07*	0,005	2
2817	313	<i>lldA</i>	L-Lactat-Dehydrogenase	16,7±0,02	0,002	3
2816	312		Transportprotein	25,0±0,01	0,001	3
0345	802	<i>murA</i>	UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase	2,27*	n.b.	1
0346	803	<i>murB</i>	UDP-N-Acetylenolpyruvoyl-Glucosaminreduktase	2,70*	n.b.	1
0347	804	<i>wbfO</i>	mögliche Glycosyltransferase	4,0±1,42	0,001	3
0628	1160	<i>prpD2</i>	Methylnitritase	3,57±0,06	0,035	2
0629	1161	<i>prpB2</i>	Methylisocitratlyase	n.a.*	n.b.	0
0630	1162	<i>prpC2</i>	Methylcitratsynthase	4,76±0,04	0,130	2
0664	1204	<i>prpD1</i>	Methylnitritase	1,49*	n.b.	1
0665	1205	<i>prpB1</i>	Methylisocitratlyase	0,79±0,47*	0,021	3
0666	1206	<i>prpC1</i>	Methylcitratsynthase	2,04±0,04	0,019	2
0697	1245	<i>malE</i>	Trehalose/Maltose Bindeprotein	2,04±0,07	0,045	2
0695	1243	<i>malF</i>	Trehalose/Maltose Transportprotein	2,04±0,26*	0,074	3

0694	1242	<i>malG</i>	Trehalose/Maltose Transportprotein	4,35±0,11	0,101	2
2108	2329		schwache Ähnlichkeit zu lytischem sekretierten Peptidoglycanprotein	2,44±0,13	0,075	2
1347	2622	<i>argH</i>	Argininsuccinatlyase	n.a.*		0
1346	2623	<i>argG</i>	Argininsuccinatsynthase	n.a.*		0
1345	2624	<i>argR</i>	Arginin-Repressor	3,70*	n.b.	1
1344	2625	<i>argF</i>	Ornithincarbamoyltransferase	10,0±0,03	0,004	3
1343	2626	<i>argD</i>	Acetylornithinaminotransferase	2,44*	n.b.	1
1342	2627	<i>argB</i>	Acetylglutamatkinase	4,55*	n.b.	1
1341	2628	<i>argJ</i>	Glutamat-N-Acetyltransferase	2,78*	n.b.	1
1340	2629	<i>argC</i>	N-Acetyl- γ -glutamylphosphatreduktase	1,85*	n.b.	1
1263	2736	<i>leuD</i>	3-Isopropylmalatdehydrogenase	2,17±0,08	0,008	2
1262	2737	<i>leuC</i>	3-Isopropylmalatdehydrogenase	2,27*	n.b.	1
0785	1362		hypothetisches Protein	2,44±0,12	0,073	2
0391	870	<i>cgtS4</i>	Sensorkinase CgtS4	6,25	n.b.	1

Tab. 12: Gene, deren mRNA-Level in *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* (M) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032 (WT) mindestens 2-fach erhöht waren. Details siehe Tab. 11.

NCgl	Orf	Gen	Beschreibung	M/WT	p-Wert	n
1850	2008	<i>oxyR</i>	Transkriptionsregulator (LysR-Familie)	3,31±1,33	0,078	2
0358	828		möglicher Transkriptionsregulator	3,53±1,42	0,017	3
1504	2456	<i>sufR</i>	möglicher Transkriptionsregulator	2,66±0,07	0,000	2
1503	2455	<i>sufB</i>	Aufbau von Fe-S-Clustern	1,26*	n.b.	1
1502	2453	<i>sufD</i>	Aufbau von Fe-S-Clustern	2,57±0,07	0,064	2
1501	2452	<i>sufC</i>	Aufbau von Fe-S-Clustern	0,95*	n.b.	1
1500	2451	<i>sufS</i>	Aufbau von Fe-S-Clustern	0,84*	n.b.	1
1499	2450	<i>sufU</i>	Aufbau von Fe-S-Clustern	1,11*	n.b.	1
1498	2449	<i>sufX</i>	Aufbau von Fe-S-Clustern	0,84*	n.b.	1
0251	670	<i>kat</i>	Katalase	4,43±0,43	0,000	3
2439	3472	<i>ftn</i>	Nicht-Häm Ferritin	8,21±5,92	0,018	3
0179	236	<i>tnp</i>	Transposase	3,28±1,10	0,065	2
2131	2274	<i>iscg2</i>	iscg2 Transposase	3,32±1,09	0,063	2

2748	2861	<i>iscg2-tnp</i>	iscg2 Transposase	2,24±0,02	0,000	2
	3239	<i>tnp-ISCg2</i>	ISCg2 Transposase	3,30±0,69	0,006	3
2450	2920	<i>prpD</i>	2-Methylisocitrat-Synthase	3,01±0,76	0,052	2
1490	2436		hypothetisches Protein	2,88±0,08	0,000	2
--	2754		hypothetischer Protein	2,63±0,75	0,013	3
1656	3359		hypothetisches Protein	2,31±0,11	0,007	2
0392	871	<i>cgtR4</i>	Antwortregulator CgtR4	1,11±0,34*	0,389	2
0390	869	<i>pgm</i>	Phosphoglyceratmutase	0,70±0,13*	0,028	3

Die Gen-Gruppe mit einem erhöhten mRNA-Level in *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtS4* enthielt mehrere Gene, die möglicherweise unter oxidativem Stress induziert werden, drei Gene, die für mögliche Transkriptionsregulatoren kodieren sowie vier Gene, die für Transposasen kodieren. Das Genprodukt von *oxyR* ist ein Transkriptionsregulator, der Wasserstoffperoxid durch einen Thiol-Disulfid-Wechsel detektieren kann (Zheng und Storz, 2000). Dieser Regulator aktiviert die Expression von Genen, die eine Abwehrfunktion gegen oxidativen Stress besitzen (Lushchak, 2001; Zheng *et al.*, 2001). Ein Gen des OxyR-Regulons in *E. coli* ist das *kat*-Gen, das für eine Katalase kodiert. Interessanterweise zeigt das *kat*-Gen auch in dem hier beschriebenen Versuch einen stark erhöhten mRNA-Level in der Δ *cgtS4*-Deletionsmutante. Die Katalase katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Das *ftn*-Gen kodiert für ein Eisen-Speicherprotein, das zur *dps*-Familie gehört. Diese Sorte von Speicherproteinen ist in der Lage unspezifisch an DNA zu binden und diese dadurch vor oxidativer Zerstörung zu schützen. Neben OxyR zeigten zwei weitere Gene für Transkriptionsregulatoren eine erhöhte Expression. Das Regulorgen *orf828* (entspricht NCgl0358) liegt stromaufwärts der *sdhCAB*-Gene für die Succinatdehydrogenase. Ob es eine Regulation der *sdh*-Gene durch das NCgl0358-Protein gibt, ist bisher unbekannt. Das Regulorgen *sufR* (entspricht NCgl1504) bildet das Promotorproximale Gen des *sufRBDCSUX*-Operons. Die *suf*-Gene sind vermutlich an der Bildung von Fe-S-Clustern in Proteinen beteiligt (Takahashi und Tokumoto, 2002). Eine Regulation der *suf*-Gene durch den Transkriptionsregulator NCgl1504 ist sehr wahrscheinlich.

Erstaunlicherweise zeigten gleich vier Gene, die für Transposasen kodieren, einen erhöhten mRNA-Level in der Δ *cgtS4*-Mutante. Da die vier Transposase-Gene auf DNA-Ebene 100 % identisch sind, ist unklar, ob alle vier Gene in der Mutante verstärkt exprimiert werden oder

nur ein Teil davon. Transposasen gehören zu Insertionselementen und können Genduplikationen oder das „Springen“ von Gensequenzen innerhalb des Chromosoms verursachen. Erstaunlich ist die erhöhte Expression des *prpD3*-Gens, welches für eine Methylisocitrat-Dehydratase kodiert. Bisher waren nur zwei *prp*-Cluster in *C. glutamicum* bekannt (s.o.) zu denen dieses Gen nicht gehört. Die Gene der beiden anderen Cluster zeigten einen erniedrigten mRNA-Level in der Δ *cgtS4*-Mutante. Weiterhin sind noch vier Gene unbekannter Funktion in ihrer Expression erhöht. Der mRNA-Level des *cgtR4*-Gens, dessen PCR-Produkt diesmal auf den DNA-Chips vorhanden war, betrug in diesen Experimenten ca. 1, was darauf hindeutet, dass die Expression des *cgtR4*-Gens durch die Deletion von *cgtS4* nicht beeinflusst wird.

8 DNA-Bindungsstudien

Die genomweiten Transkriptionsanalysen führten zur Identifizierung einer Reihe putativer Zielgene, deren Expression signifikant verändert war und die somit möglicherweise durch das Zweikomponentensystem CgtSR4 reguliert werden. Strukturvorhersagen für den Antwort-Regulator CgtR4 ergaben, dass es in der C-terminalen Hälfte ein mögliches Helix-Turn-Helix-Motiv gibt, was auf eine DNA-bindende Funktion dieses Bereichs hindeutet (siehe Abb. 7). Um zu untersuchen, ob CgtR4 direkt an die Promotorregionen der Gene mit verändertem mRNA-Level bindet, wurden Gelretardationsexperimente mit phosphoryliertem und unphosphoryliertem CgtR4His-Protein durchgeführt. Für die Phosphorylierung wurde das gereinigte MalE-CgtS4kin-Protein eingesetzt (siehe 4.2). Jeweils ca. 300 bp stromaufwärts des Startcodons eines putativen CgtR4-Zielgens bzw. -Zieloperons wurden mittels PCR amplifiziert. Insgesamt wurden 20 verschiedene Promotor-Bereiche getestet, die in Tab. 13 aufgeführt sind. Um zwischen dem Verhalten von CgtR4 in seiner phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form unterscheiden zu können, wurden die gewählten Verdünnungen von CgtR4-His mehrfach angesetzt und entweder für 1 h mit MalE-CgtS4kin plus ATP oder mit MalE-CgtS4kin plus ADP bei 37°C inkubiert. Ein dritter Ansatz enthielt weder MalE-CgtS4kin noch ATP oder ADP. Danach erfolgte die Zugabe des radioaktiv markierten DNA-Fragments. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch aus DNA und Protein in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches anschließend getrocknet und mit einem PhosphoImager analysiert wurde. In Abb. 32 ist exemplarisch ein Experiment dargestellt, das zeigt, dass weder die phosphorylierte noch die unphosphorylierte Form von CgtR4-His in der Lage ist spezifisch an die getestete DNA-Region zu binden. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob CgtR4 in höheren Proteinkonzentrationen

eine spezifische DNA-Bindung aufweist. Dazu wurden die Regionen stromaufwärts des *cgtS4*-, *pgm*- *ykvI*-, *gluA*-, *ugpC*- und *glpQ*-Gens sowie der Bereich vor *orf1818* (entspricht NCgl1170) und *orf2409* (entspricht NCgl1470) getestet. Bei fünf der getesteten putativen Promotorregionen (*ykvI*, *gluA*, *ugpC*, *glpQ* und *orf2409*) zeigte CgtR4 eine unspezifische Bindung (siehe Abb. 32), bei den anderen dagegen nicht. Die DNA-Bindung konnte durch einen Überschuss an poly(dI-dC) wieder aufgehoben werden. Auffällig war, dass die unspezifische Bindung nur in Abwesenheit von MalE-CgtS4kin erfolgte (siehe Abb. 32, Spur 8-10), unabhängig davon, ob die Inkubation mit ADP oder ATP erfolgte (nicht gezeigt). Insgesamt zeigte kein getesteter Promotorbereich eine spezifische Bindung durch CgtR4-His. Daher konnte keine direkte regulatorische Funktion von CgtR4-His hinsichtlich der möglichen Zielgene nachgewiesen werden.

Tab. 13: Auflistung aller Gene bzw. Operons, deren Promotorbereich in den Gelretardationsexperimenten getestet wurde.

NCgl	Orf	putative Promotorregion	Beschreibung des Gens/Operons
0391	870	300 bp stromaufwärts von <i>cgtS4</i>	Zweikomponenten-System CgtSR4
0390	869	301 bp stromaufwärts von <i>pgm</i>	Phosphoglyceratmutase
2486	2871	275 bp stromaufwärts von <i>pstS</i>	Phosphat ABC Transporter
1332	2641	301 bp stromaufwärts von <i>ugpC</i>	Glycerin-3-Phosphat-Transporter
1333	2637	300 bp stromaufwärts von <i>glpQ</i>	Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase
2517	2831	329 bp stromaufwärts von <i>phoR</i>	Zweikomponentensystem PhoRS
1850	2008	300 bp stromaufwärts von <i>oxyR</i>	Transkriptionsregulator OxyR
1504	2456	300 bp stromaufwärts von <i>sufR</i>	möglicher Transkriptionsregulator
0358	828	300 bp stromaufwärts von <i>orf828</i>	möglicher Transkriptionsregulator
0251	670	304 bp stromaufwärts von <i>kat</i>	Katalase
2439	3472	306 bp stromaufwärts von <i>ftn</i>	Nicht-Häm Ferritin
1875	2040	300 bp stromaufwärts von <i>gluA</i>	Glutamat ABC Transporter
2863	378	304 bp stromaufwärts von <i>cgtR9</i>	Zweikomponentensystem CgtRS9
0708	1260	300 bp stromaufwärts von <i>orf1260</i>	möglicher Transkriptionsregulator
0707	1259	300 bp stromaufwärts von <i>orf1259</i>	Helicase
2816	312	321 bp stromaufwärts von <i>orf312</i>	Transportprotein
1344	2629	318 bp stromaufwärts von <i>argC</i>	Argininbiosynthese
1676	1676	300 bp stromaufwärts von <i>ykvI</i>	unbekanntes Membranprotein
1170	1818	300 bp stromaufwärts von <i>orf1818</i>	hypothetisches Protein
1470	2409	302 bp stromaufwärts von <i>orf2409</i>	hypothetisches Protein

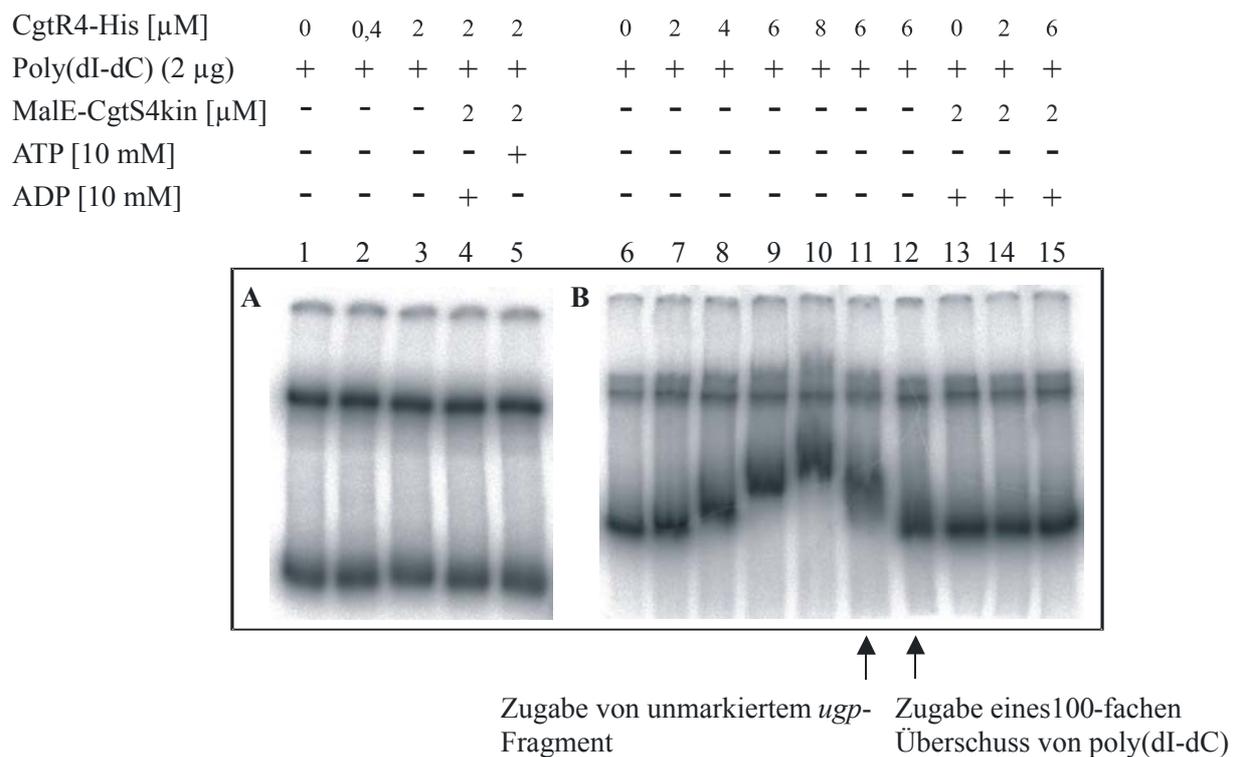


Abb. 32: Beispiele für durchgeführte Gelretardationsexperimente. **A)** Untersuchung einer möglichen Bindung von CgtR4-His an die Promotorregion des *pstSCAB*-Operons. Bevor die 275 bp große radioaktiv markierte *pst*-Sonde zum Ansatz gegeben wurde, wurde CgtR4-His mit Puffer (Spur 2-3), mit MalE-CgtS4kin und ADP (Spur 4) oder mit MalE-CgtS4kin und ATP (Spur 5) inkubiert. **B)** Gelretardationsexperiment, dass die Bindung von unphosphoryliertem CgtR4-His an die Promotorregion des *ugpCBEA*-Operons zeigt. Der Ansatz in Spur 6 enthält zusätzlich einen 100-fachen Überschuss von unmarkierter *ugp*-Sonde, der Ansatz in Spur 7 einen 100-fachen Überschuss an poly(dI-dC) als Kompetitor. Nach der Gelelektrophorese wurden beide Gele getrocknet und mit einem PhosphoImager analysiert.

V DISKUSSION

Das Zweikomponenten-System CgtSR4 wurde im Rahmen der Genomanalyse von *C. glutamicum* identifiziert. Da Sequenzvergleiche keine Hinweise auf die spezifischen Funktionen dieses Systems lieferten, war das Ziel dieser Arbeit, durch biochemische, genetische und physiologische Untersuchungen Hinweise auf die Funktion zu erhalten und zu verifizieren.

1 Biochemische Charakterisierung von CgtS4 und CgtR4

1.1 Lokalisation der Sensorkinase CgtS4

Die Sensorkinase CgtS4 besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen Sensor-Domäne und einer C-terminalen Kinase-Domäne. Aufgrund von Hydrophobizitätsstudien konnte für den postulierten N-Terminus im Bereich der Aminosäuren 4-21 eine Region von sehr hoher Hydrophobizität identifiziert werden, sowie ein weiterer Bereich von mäßig hoher Hydrophobizität, der die Aminosäuren 43-63 umfasst (siehe Abb. 11). Beide Regionen könnten mit putativen Transmembranhelices korrelieren. Liegt eine Transmembranhelix vor, so wäre CgtS4 über diese in der Cytoplasmamembran verankert. Besitzt CgtS4 zwei Transmembranhelices, so spricht dies für die Ausbildung eines periplasmatischen „Loops“. Nach der ersten Hypothese (1 Transmembranhelix) sollte ein intrazelluläres Signal detektiert werden, dagegen würde die Existenz einer zweiten Transmembranhelix auf die Erkennung eines extrazellulären Signals hindeuten. Aufgrund der amphiphilen Struktur der zweiten putativen α -Helix ist es aber durchaus denkbar, dass dieser Teil des Proteins über seine hydrophoben Aminosäure-Reste an die Membran assoziiert ist, während die hydrophilen Aminosäure-Reste dem Cytoplasma zugewandt sind. Mit Hilfe von spezifischen Peptid-Antikörpern gegen CgtS4 konnte die Histidin-Kinase in der Fraktion der Membranproteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 13A), so dass mindestens eine Verankerung von CgtS4 in der Cytoplasmamembran oder aber eine Assoziation an die Membran sichergestellt wurde. Neben der 45 kDa großen Bande des CgtS4-Proteins trat eine 90 kDa große Bande in der Fraktion der löslichen Proteine und im Gesamt-Zellextrakt auf (siehe Abb. 13A). Da alle bisher identifizierten Sensorkinasen als Dimere auftreten, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der 90 kDa großen Proteinbande ebenfalls um ein Dimer von CgtS4 handelt. Allerdings war diese Bande überwiegend in der Fraktion der löslichen Proteine lokalisiert und bei Expression von *cgtS4* in *E. coli* nicht nachweisbar. Um die Frage zu klären, ob das

90 kDa-Antigen CgtS4 darstellt oder nicht, könnten die Zellfraktionen des *C. glutamicum* Δ cgtS4-Stammes in einer Western-Blot-Analyse untersucht werden. Die 90 kDa große Proteinbande würde nur auftreten, wenn es sich um eine unspezifische Reaktion handelt.

1.2 Aufreinigung verschiedener Derivate von CgtS4 und CgtR4

Die Aufreinigung der Sensorkinase und des Antwortregulators wurde mit Hilfe verschiedener Konstrukte durchgeführt. Die vollständige Sensorkinase CgtS4 konnte sowohl als rekombinantes Protein mit einem C-terminalen Histidin-Tag als auch mit einem C-terminalen *Strep*-tag II erfolgreich in *E. coli* überproduziert, solubilisiert und aufgereinigt werden (siehe Abb. 14 und Abb. 15). Ein am N-Terminus um 21 Aminosäure-Reste verkürztes Derivat von CgtS4 konnte ebenso mit C-terminalem Histidin-Tag und C-terminalem *Strep*-tag II aufgereinigt werden. Darüber hinaus war es möglich, die Kinase-Domäne von CgtS4 als lösliches Fusionsprotein Male-CgtS4kin aufzureinigen, welches aus dem Maltosebindeprotein von *E. coli* ohne dessen Signalsequenz und der Kinase-Domäne von CgtS4 zusammengesetzt ist (siehe Abb. 17). Der Antwortregulator CgtR4 wurde mit einem C-terminalen Histidin-Tag und alternativ mit einem C-terminalen *Strep*-tag II in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt (siehe Abb. 18 und Abb. 19). CgtR4-His diente als Antigen zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das CgtR4-Protein. Mit den gereinigten rekombinanten CgtS4- und CgtR4-Proteinen konnte die Autophosphorylierung der solubilisierten Sensorkinase CgtS4-His und der Phosphoryltransfer von Phospho-CgtS4-His auf den Antwortregulator CgtR4-*Strep* *in vitro* nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde auch eine Autophosphorylierung des löslichen Male-CgtS4kin-Proteins sowie eine Übertragung der Phosphorylgruppe auf CgtR4-His *in vitro* gezeigt.

Sowohl bei der Überproduktion von CgtS4 mit C-terminalem His-Tag als auch mit C-terminalem *Strep*-tag II in *E. coli* lag der größte Teil des Proteins in Form von Einschlusskörpern vor. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch viele andere Membran-gebundene Sensorkinasen (Stock *et al.*, 1995). Der restliche Teil von CgtS4 befand sich in der Fraktion der Membranproteine und musste aus den Membranen solubilisiert werden, um eine Aufreinigung des Proteins zu ermöglichen. Für spätere Aktivitätsuntersuchungen *in vitro* musste ein geeignetes, effizientes Solubilisierungs- und Reinigungsprotokoll erstellt werden, dass sich nicht denaturierend auf CgtS4 auswirkt. Während mit dem milden nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 (4 %) keine signifikante Solubilisierung von CgtS4 erreicht wurde, konnte mit dem zwitterionischen Detergenz LDAO bis zu 50 % des CgtS4-Proteins erfolgreich aus den Membranen solubilisiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass es

sich bei CgtS4 um ein integrales Membranprotein und nicht um ein membranassoziertes Protein handelt, da letztere meist schon mit Triton X-100 solubilisiert werden können. Unter der Annahme, dass CgtS4 nur eine einzige N-terminale Transmembranhelix besitzt, sollte ein Derivat, dem dieser Bereich fehlt, als lösliches Protein vorliegen. Tatsächlich war aber auch das verkürzte Derivat von CgtS4 in der Membranfraktion lokalisiert und konnte mit LDAO, nicht aber mit Triton X-100, solubilisiert werden. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der zweite hydrophobe Bereich, der vermutlich eine α -Helix mit stark amphiphilem Charakter darstellt, für eine Membranassoziation von CgtS4 ausreichend ist.

Die Frage, ob dieser Bereich eine Transmembranhelix oder eine peripher assoziierte Helix darstellt, sollte mit Hilfe einer Topologie-Analyse beantwortet werden. Dazu wurden gezielte Fusionen zwischen zwei N-terminalen Fragmenten von CgtS4 (Aminosäuren 1-40 und Aminosäuren 1-80) mit den Reporterproteinen alkalische Phosphatase (PhoA, sollte nur im Periplasma aktiv sein) und β -Galaktosidase (LacZ, sollte nur im Cytoplasma aktiv sein) konstruiert und die Aktivität der Reporterproteine in *E. coli* getestet. Überraschenderweise zeigten sowohl die beiden PhoA-Fusionen als auch die beiden LacZ-Fusionen die entsprechenden Aktivitäten auf Platte und mit solubilierten Zellen. Dieses Ergebnis, das zur Zeit nicht interpretiert werden kann, konnte also die Topologie-Frage nicht beantworten. Erfolgreiche Beispiele für den Einsatz dieser Methode zur Topologie-Aufklärung liefern die Sensorkinase RegB des Zweikomponenten-Regulationssystems RegB/RegA aus dem fakultativen phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus* (Chen *et al.*, 2000) und die Sensorkinase ComP aus *B. subtilis*, welche zusammen mit dem „Response“-Regulator ComA die Ausbildung von Kompetenz reguliert (Piazza *et al.*, 1999).

Bei der Aufreinigung der CgtS4-Derivate lag der größte Anteil der Proteine in Form von Einschlusskörpern vor. Die Bildung solcher unlöslicher Komplexe ist nicht nur für Membran-gebundene Sensorkinasen charakteristisch, sondern auch für viele verkürzte rekombinante Histidin-Kinasen, bei denen der N-terminale Bereich einschließlich der Transmembranhelices entfernt wurde, wie beispielsweise bei VirA (Jin *et al.*, 1990) oder NarX und NarQ (Schröder *et al.*, 1994). Fusioniert man dagegen nur die cytoplasmatische Kinase-Domäne an das C-terminale Ende des Maltose-Bindeproteins von *E. coli* ohne dessen Signalsequenz, so erhält man in vielen Fällen ein lösliches Protein mit konstitutiver Autophosphorylierungsaktivität (Wright *et al.*, 1993). Daher wurde zusätzlich das CgtS4-Derivat Male-CgtS4kin konstruiert. Ein Teil dieses Fusionsproteins lag ebenfalls in Form von Einschlusskörpern vor, aber in erheblich geringerem Maße im Vergleich zu den anderen CgtS4-Derivaten.

Die Aufreinigung von CgtR4-His und CgtR4-Strep war in beiden Fällen erfolgreich und die Proteine konnten mit einer Reinheit von $\geq 90\%$ erhalten werden. Auch in diesen Fällen lag jedoch ein Teil der Proteine in Form von Einschlusskörpern vor. Auffallend war, dass die Überproduktion von CgtR4-His im Laufe der Zeit immer weiter abnahm und dass die verringerte Menge an CgtR4-His nicht mehr im Ultrazentrifugations-Überstand vorlag, sondern größtenteils in Form von Einschlusskörpern. Weder eine neue Transformation noch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen konnten eine Verbesserung erzielen. Eine Ursache für die verminderte Überexpression konnte bisher nicht gefunden werden.

1.3 *In vitro* Phosphorylierung von CgtS4 und CgtR4

Die Phosphorylierungs-Kaskade, bei der nach der Autophosphorylierung der Sensorkinase CgtS4 eine Übertragung der Phosphorylgruppe auf den Antwortregulator CgtR4 stattfindet, konnte *in vitro* mit CgtS4-His und CgtR4-Strep bzw. mit MalE-CgtS4kin und CgtR4-His gezeigt werden (siehe Abb. 20). Sowohl das solubilisierete CgtS4-Protein als auch das gereinigte MalE-CgtS4kin-Protein besaßen also Autokinase-Aktivität, wobei die von CgtS4-His größer war als die von MalE-CgtS4kin. Der Befund, dass die Sensorkinase CgtS4 im solubilisierten Zustand Autophosphorylierungsaktivität zeigte ist eine Eigenschaft, die nicht alle solubilisierten Histidin-Kinasen zeigen. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass die isolierte Histidin-Kinase in solubilisierter Form inaktiv war und erst nach einer Rekonstitution in artifiziellen Liposomen Aktivität zeigte. Beispielsweise wurde die Histidin-Kinase KdpD des Zweikomponentensystems KdpDE aus *E. coli* solubilisiert, mittels eines C-terminalen Histidin-Tags aufgereinigt und analysiert. Dieses Regulationssystem kontrolliert die Expression des *kdpFABC*-Operons, welches für ein K^+ -Aufnahmesystem kodiert. Die Regulation erfolgt in Abhängigkeit von der Osmolarität des Mediums. Nach einer Rekonstitution in Proteoliposomen zeigte KdpD in Anwesenheit von $\gamma[^{32}P]$ -ATP Autokinase-Aktivität, während in Detergenz (Dodecylmaltosid) solubilisiertes KdpD keine Kinase-Aktivität zeigte (Jung *et al.*, 1997). Ein weiteres Beispiel dieser Art ist die Histidin-Kinase DcuS aus *E. coli*, die als Sensor für periplasmatische C_4 -Dicarboxylate wie Fumarat oder Succinat fungiert. Auch hier zeigte nur das in Liposomen rekonstituierte DcuS-Protein Autokinase-Aktivität, nicht aber das gereinigte, mit Dodecylmaltosid solubilisierte DcuS (Janausch *et al.*, 2002). Eine mögliche Ursache für die fehlende Autokinaseaktivität der beiden Histidin-Kinasen im solubilisierten Zustand könnte sein, dass das Detergenz denaturierende Wirkung zeigt und eine Dimerisierung oder Oligomerisierung der Proteine

verhindert. Versuche mit der Histidin-Kinase NarX aus *E. coli* zeigten, dass auch das solubilisierete Protein Autokinase-Aktivität besaß (Walker und DeMoss, 1993).

Die Annahme, dass der Histidin-Rest 166 von CgtS4 autophosphoryliert wird und die Phosphorylgruppe dann auf den Aspartat-Rest 52 von CgtR4 transferiert wird, könnte in weiteren Experimenten bestätigt werden. Ein CgtS4-Derivat mit einer H166A Mutation sollte keine Autokinase-Aktivität mehr aufweisen, ebenso sollte ein CgtR4-Derivat mit einer D52N-Mutation nicht mehr durch CgtS4-His phosphoryliert werden.

2 Die Essentialität des Zweikomponenten-Regulationssystems CgtSR4 aus *C. glutamicum*

Zur Charakterisierung der Sensor kinase CgtS4 und des Antwortregulators CgtR4 aus *C. glutamicum* sollten die zugehörigen Gene *cgtSR4* deletiert werden. Bei dem verwendeten Protokoll wird zunächst über eine erste homologe Rekombination ein nicht replizierbares Plasmid in den zu deletierenden Genort integriert. Nach Selektion auf eine zweite homologe Rekombination kann entweder die gewünschte Gendeletion eingeführt werden oder aber die genetische Wildtyp-Situation wird wiederhergestellt. Bei nicht-essentiellen Genen sollten die beiden Rekombinationsereignisse in einem Verhältnis von 1:1 auftreten. Im Fall von *cgtSR4* zeigten von den über 80 nach dem zweiten Rekombinationsschritt getesteten Klone ausnahmslos alle die genetische Wildtypsituation. Wenn der zweite Rekombinationsschritt in Gegenwart einer Plasmid-kodierten Kopie der *cgtSR4*-Gene durchgeführt wurde, zeigten annähernd 50 % der analysierten Klone die gewünschte Deletion der chromosomalen *cgtSR4*-Gene. Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine essentielle Funktion der *cgtSR4*-Gene hin.

Interessanterweise konnte eine Deletion der chromosomalen *cgtSR4*-Gene auch dann erreicht werden, wenn nur das *cgtR4*-Gen Plasmid-kodiert vorlag. Die daraus resultierende Schlussfolgerung, dass nur *cgtR4*, nicht aber *cgtS4* für *C. glutamicum* essentiell ist, konnte durch die erfolgreiche Deletion des chromosomalen *cgtS4*-Gens in Abwesenheit Plasmid-kodierter Kopien von *cgtSR4* bestätigt werden.

Unter den bisher untersuchten essentiellen Zweikomponenten-Regulationssystemen gibt es sowohl Fälle, bei denen nur der Antwortregulator essentiell ist, z. B. beim MtrA-MtrB-System von *M. tuberculosis* (Zahrt und Deretic, 2000), als auch solche, in denen beide Komponenten notwendig sind, z. B. beim YycF-YycG-System aus *B. subtilis*. Eine Inaktivierung der Sensor kinase YycG war nur in Gegenwart eines mutagenisierten, konstitutiv aktiven Antwortregulators YycFD54H möglich (Fukuchi *et al.*, 2000). Die Funktion und die Zielgene des MtrA-MtrB-Systems sind bisher nicht bekannt, es gibt jedoch

Hinweise darauf, dass die Transkription der *mtrAB*-Gene während der Infektion von Makrophagen induziert wird. Für das Zweikomponenten-Regulationssystem YycFG wird eine Beteiligung an der globalen Regulation der Zellwandsynthese und Membranzusammensetzung postuliert. Bisher konnten die *ftsAZ*-Gene in *B. subtilis* als direkte Zielgene von YycF identifiziert werden, die für Zellteilungsproteine kodieren (Fabret und Hoch, 1998; Fukuchi *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1999). HP166/HP165 und VicR/VicK sind weitere Beispiele für Zweikomponenten-Regulationssysteme in denen nur der Antwortregulator essentiell ist. Während für das HP166/HP165-System aus *Helicobacter pylori* immerhin Zielgene bekannt sind, aber nicht deren Funktion, ist die Aufgabe des VicR/VicK-Systems aus *Streptococcus pneumoniae* unbekannt (Dietz *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2002). Neben essentiellen Zweikomponenten-Regulationssystemem wurde auch ein essentielles „Phosphorelay“-System identifiziert, welches an der Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung in *Caulobacter crescentus* beteiligt ist (Hecht *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1999; Quon *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998). Es besteht aus zwei essentiellen Antwortregulatoren, DivK und CtrA, und drei Histidin-Kinasen, PleC, DivJ und Cck, von denen letztere ebenfalls essentiell ist. Während des fortlaufenden Zellzyklus’ transferiert der „Response“-Regulator DivK, der nur aus einer regulatorischen Domäne besteht, die Phosphorylgruppen von den Histidin-Kinasen PleC und DivJ auf die Hybrid-Histidin-Kinase CckA, die ihrerseits den als Transkriptionsregulator aktiven Antwortregulator CtrA phosphoryliert. Es konnte gezeigt werden, dass CtrA in die Regulation von mindestens fünf verschiedenen Prozessen des Zellzyklus’ involviert ist, z. B. Flagellen-Biogenese, DNA-Methylierung und DNA-Replikation. Das „Phosphorelay“-System aus *Caulobacter* und YycFG sind also die einzigen Beispiele, in denen sowohl der Antwortregulator als auch die zugehörige Sensorkinase essentiell sind.

Eine mögliche Erklärung für die Essentialität beider Komponenten wäre, dass der Antwortregulator ausschließlich durch seine zugehörige Sensorkinase phosphoryliert werden kann und nur im phosphorylierten Zustand die Regulation seiner Zielgene ausführen kann. Liegt wie im Fall von CgtS4-CgtR4 „nur“ eine Essentialität des Antwortregulators vor, so besteht die Vermutung, dass andere Sensorkinasen in der Zelle die Phosphorylierung und eine damit verbundene Aktivierung des Antwortregulators übernehmen können. Ein solcher „cross-talk“ konnte bisher *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden, mit Ausnahme von Stämmen, in denen die zugehörige Sensorkinase eines bestimmten Antwortregulators deletiert wurde (Kim *et al.*, 1996; Matsubara und Mizuno, 1999; McCleary *et al.*, 1993; Ninfa *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 1998; Verhamme *et al.*, 2001; Wanner, 1992). Eine *in vitro*

Phosphorylierung von Antwortregulatoren durch „fremde“ Sensorkinasen wurde hingegen bereits in mehreren Fällen gezeigt (Fisher *et al.*, 1995; Igo *et al.*, 1989; Yaku *et al.*, 1997). Neben einer Phosphorylierung durch „fremde“ Sensorkinasen besteht auch die Möglichkeit zur Phosphorylierung eines Antwortregulators durch niedermolekulare Phosphodonoren wie Acetylphosphat oder Carbamylphosphat (Bouche *et al.*, 1998; Danese *et al.*, 1995; Dorel *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 1992; Heyde *et al.*, 2000; Matsubara und Mizuno, 1999; McCleary und Stock, 1994; Pruss und Wolfe, 1994; Wanner, 1992).

Eine völlig andere Erklärung für den Befund, dass nur der Antwortregulator nicht aber die Sensorkinase eines Zweikomponenten-Systems essentiell ist, würde sich dann ergeben, wenn die Phosphorylierung CgtR4 nicht aktivieren sondern inaktivieren würde. Unter dieser Voraussetzung würde die Abwesenheit der Sensorkinase zu einem konstitutiv aktiven Antwortregulator führen. Ein Indiz für die Hypothese, dass CgtR4 im unphosphorylierten Zustand aktiv ist, lieferte das Ergebnis, dass die chromosomalen *cgtSR4*-Gene auch in Gegenwart eines CgtR4-Derivats mit einer D52N-Mutation deletiert werden konnten. In diesem Experiment kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass eine spontane sekundäre Mutation zu einem aktiven CgtR4-Protein geführt hat. Dies könnte durch Sequenzierung des Plasmid-kodierten *cgtR4*-Gens untersucht werden.

Die Inaktivierung eines Antwortregulators durch Phosphorylierung ist bisher nur für den Antwortregulator HoxA des Zweikomponenten-Regulationssystems HoxJ/HoxA aus *Ralstonia eutropha* und für den Antwortregulator HupR des HupT/HupR-Regulationssystems aus *Rhodobacter capsulatus* bekannt. Beide Systeme regulieren die Expression von Genen, die für [NiFe]-Hydrogenasen kodieren und bei der Energiegewinnung aus molekularem Wasserstoff benötigt werden. In Abwesenheit von H₂ führt eine Phosphorylierung von HoxA bzw. HupR durch die entsprechende Histidin-Kinase zu einer Inaktivierung des Antwortregulators (Dischert *et al.*, 1999; Lenz *et al.*, 2002).

Ein weiteres Indiz für die Essentialität des CgtS4/CgtR4-Systems lieferte die Konstruktion einer konditionalen Mutante. Wurde der Stamm *C. glutamicum* 13032::pCGEX5KCgtS4 ohne IPTG kultiviert, so zeigte er eine verringerte Wachstumsrate und erreichte eine deutlich geringere End-OD₆₀₀ im Vergleich zu Stämmen, die in Anwesenheit verschiedener IPTG-Konzentrationen kultiviert wurden, und ebenso im Vergleich zu einem Kontrollstamm (siehe Abb. 28). Da der verwendete *tac*-Promotor jedoch schon ohne IPTG-Induktion eine Expression der *cgtSR4*-Gene zuließ, konnten keine stärkeren Wachstumsdefekte nachgewiesen werden. Untersuchungen an dem essentiellen Zweikomponenten-System YycF/YycG aus *B. subtilis* haben gezeigt, dass sich eine konditionale Mutante nur in

Gegenwart des Induktors IPTG konstruieren ließ und einen deutlichen Wachstumsdefekt aufwies. Die *yycFG*-Gene standen dabei unter der Kontrolle des *spac*-Promotors (Fukuchi *et al.*, 2000). Um einen stärkeren Wachstumsdefekt nachweisen zu können, müsste ein anderes Promotorsystem zur Konstruktion einer konditionalen Mutante verwendet werden, das vollständig durch seinen Repressor reprimiert wird. Dabei würde sich das TetR/O_{tetR}-Regulationssystem aus dem Transposon *Tn10* anbieten, welches erfolgreich bei Untersuchungen zur *clp*-Regulation in *C. glutamicum* eingesetzt wurde. Die Repression durch TetR ist ungewöhnlich stark. Zur weiteren Bestätigung der Essentialität von CgtR4 könnte überprüft werden, ob das Plasmid pXMJ19CgtR4 in dem Stamm *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 auch ohne Antibiotika-Selektion über viele Generationen hinweg stabil erhalten bleibt.

3 Mögliche Regulation des *pgm*-Gens durch das CgtSR4-System

Die Gene *cgtS4* und *cgtR4* liegen in der genannten Reihenfolge nebeneinander im Genom und die kodierenden Bereiche überlappen um vier Basenpaare. Das postulierte *cgtS4*-Startcodon liegt 10 bp stromabwärts des Stopcodons des Phosphoglyceratmutase-Gens (*pgm*). 311 bp stromabwärts des *cgtR4*-Stopcodons liegt das Startcodon eines hypothetischen Orfs. Die Tatsache, dass die Gene *pgm*, *cgtS4* und *cgtR4* in gleicher Orientierung transkribiert werden, und dass es eine nur 10 bp große intergene Region zwischen *pgm* und *cgtS4* gibt, deutete auf eine Cotranskription dieser drei Gene hin. Dies wurde bisher jedoch noch nicht durch Northern-Blots oder RT-PCR nachgewiesen. Zahlreiche Zweikomponenten-Systeme regulieren Gene, die in direkter Nachbarschaft des Regulationssystems lokalisiert sind (Kaspar *et al.*, 1999). Daher wurde überprüft, ob die Expression des *pgm*-Gens durch das Zweikomponenten-Regulationssystem CgtS4/CgtR4 reguliert wird. Unter der Voraussetzung, dass *pgm* das einzige essentielle Gen ist, das einer Regulation durch CgtS4/CgtR4 unterliegt, wurde versucht die chromosomalen *cgtSR4*-Gene in Gegenwart einer Plasmid-vermittelten Expression des *pgm*-Gens zu deletieren, jedoch ohne Erfolg. Entsprechende Versuche wurden auch unter Wachstumsbedingungen durchgeführt, bei denen die Phosphoglyceratmutase nicht benötigt wird. Eine Deletion der *cgtSR4*-Gene war jedoch auch dann nicht möglich, was dafür spricht, dass die Expression des *pgm*-Gens nicht durch CgtS4/CgtR4 reguliert wird oder aber dass zusätzlich weitere essentielle Gene durch CgtS4/CgtR4 reguliert werden. Die durchgeführten globalen Transkriptomanalysen unterstützen diese Vermutung, da bei Überexpression des *cgtR4*-Gens keine Veränderung der *pgm*-Expression nachgewiesen werden konnte. Weitere Datenbank-Analysen (Jülich-Microarray-Database, JMD) zeigten,

dass nur in 29 % der Fälle, in denen der *cgtS4*-mRNA-Level verändert war, auch ein veränderter *pgm*-mRNA-Level zu beobachten war. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die *pgm*-Expression nicht durch das Zweikomponenten-Regulationssystem reguliert wird und das *pgm*-Gen kein gemeinsames Operon mit den *cgtSR4*-Genen bildet. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der Promotor von *cgtSR4* mit dem kodierenden Bereich des *pgm*-Gens überlappt.

4 Homologe Zweikomponenten-Regulationssysteme zu CgtSR4 aus *C. glutamicum*

Durch Datenbank-Recherchen wurde nach Proteinen gesucht, die eine große Ähnlichkeit zu CgtS4 bzw. CgtR4 zeigten, mit dem Ziel, anhand von Alignments und der chromosomalen Organisation weitere Informationen zu den Eigenschaften und Funktionen dieses Systems zu erhalten. Bei Sequenzvergleichen mit der vollständigen Aminosäuresequenz von CgtS4 sind ausschließlich die Proteine von Interesse, die signifikante Ähnlichkeiten im Bereich der Sensor-Domäne (etwa Aminosäuren 1-151) zeigen, da nur dieser Bereich spezifisch für CgtS4 ist.

Die Datenbank-Recherchen ergaben, dass CgtS4/CgtR4 die größte Ähnlichkeit zu dem Zweikomponenten-Regulationssystem SenX3/RegX3 aus *C. efficiens* und *C. diphtheriae* sowie verschiedenen *Mycobacterium*-Spezies zeigt (siehe auch Abb. 8 und Abb. 9). Die Gene *senX3* und *regX3* von *M. tuberculosis* bilden ein Operon, dessen Promotor in der 273 bp großen intergenen Region zwischen *gpm* und *senX3* lokalisiert ist (Supply *et al.*, 1997). Ob es auch Transkription von *senX3-regX3* vom *gpm*-Promotor aus gibt, wurde nicht untersucht. Das *senX3-regX3*-Operon wird vermutlich positiv autoreguliert, da eine Überexpression der beiden Gene in *M. smegmatis* zu einer 2-fach erhöhten Aktivität einer *senX3-lacZ*-Transkriptionsfusion führte (Himpens *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass über einen N-terminalen Histidin-Tag gereinigtes RegX3-Protein an die *senX3*-Promotor-Region bindet. Die RegX3-Bindungsstelle konnte auf eine 42-bp umfassende Region mit der Sequenz 5'-ATGTGAACGGTAACCGAACAGCTGTGGCGTAGTGTGTGACTT-3' eingegrenzt werden. Die Bindung war unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des Proteins. Die Phosphorylierung von RegX3 wurde mit dem cytoplasmatischen Teil von SenX3 (Aminosäuren 131-410) durchgeführt, der ebenfalls mittels eines N-terminalen Histidin-Tags gereinigt wurde. Eine H167Q-Mutation in (His)₆SenX3(131-410) führte zum Verlust der Phosphorylierbarkeit der Sensorkinase und eine D52N-Mutation von (His)₆RegX3 zum Verlust der Phosphorylierbarkeit des Antwortregulators. Um Signale zu identifizieren, die vom SenX3-RegX3-System erkannt werden, wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf

die Expression einer Plasmid-kodierten *senX3-lacZ*-Transkriptionsfusion getestet. Veränderungen der Phosphat-Konzentration, der Mg^{2+} -Konzentration, der Osmolarität und der Temperatur hatten keinen Einfluss auf die Expression (Supply *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu den *cgtSR4*-Genen aus *C. glutamicum*, die vermutlich essentiell sind, scheinen die *senX3-regX3*-Gene für *M. tuberculosis* nicht essentiell zu sein (Sasseti *et al.*, 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, dass die Gene für das Zweikomponenten-System MtrAB für *M. tuberculosis* essentiell sind (Zahrt und Deretic, 2000), während die homologen Gene aus *C. glutamicum* deletiert werden konnten (Schaffer, Brocker und Bott, unveröffentlicht). Das heisst, dass die Essentialität von eindeutig homologen Zweikomponenten-Systemen in nahe verwandten Species variieren kann.

5 Suche nach putativen Targetgenen von CgtSR4

5.1 Versuch zur Identifizierung putativer Targetgene mit Hilfe eines DNA-Bindungsassays

Zur Identifizierung putativer Targetgene wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt, globale Transkriptionsanalysen und ein DNA-Bindungsassay mit Dynabeads[®] Streptavidin. Mit Hilfe von Dynabeads[®] Streptavidin wurde der Antwortregulator CgtR4 immobilisiert und mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* inkubiert. DNA-Fragmente, die spezifisch durch CgtR4 gebunden werden, sollten auf diese Weise isoliert werden und Rückschlüsse auf putative Targetgene geben können. Nach der Durchführung des Assays konnten in drei Ansätzen, die sich durch unterschiedliche NaCl-Konzentrationen im Bindungspuffer und durch Zusatz von Berylliumfluorid unterschieden, jeweils fünf dominante und weitere diffuse DNA-Banden beobachtet werden (siehe Abb. 29). Leider gelang es nicht diese Fragmente zu klonieren, so dass sie nicht identifiziert werden konnten. Eine Ursache für diesen Befund wurde bisher nicht gefunden.

Als Alternative zu dem beschriebenen Ansatz könnte man zur Identifizierung von CgtR4-Targetsequenzen mit Hilfe der Genomsequenz von *C. glutamicum* die Promotoren aller Gene bzw. Operons mittels PCR amplifizieren. Die eingesetzten Primer enthalten jeweils Restriktionsschnittstellen und einen konstanten 5'-Bereich, der in einer zweiten PCR mit „universal-Primern“ die Amplifizierung aller PCR-Produkte und eine gerichtete Klonierung ermöglicht. Dieser Pool mit Promotorsequenzen wird mit immobilisiertem CgtR4 inkubiert und die spezifisch gebundene DNA eluiert. Bevor man die erhaltenen DNA-Fragmente kloniert, wird die DNA in einer PCR amplifiziert und erneut mit CgtR4 inkubiert. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, bis genügend DNA für die weitere Analyse

angereichert worden ist. Nach Klonierung und Sequenzierung der isolierten Promotorsequenzen sollten benachbarte putative Zielgene durch einen Sequenzvergleich mit der Genomsequenz von *C. glutamicum* identifiziert werden können. Gegebenenfalls könnten aus den identifizierten Promotorsequenzen Konsensussequenzen für ein putatives Bindemotiv ermittelt werden. Der Vergleich mit der Genomsequenz könnte zur weiteren Identifizierung von putativen Targetgenen führen.

Ein Ansatz des DNA-Bindungsassays enthielt Berylliumfluorid, ein Phosphatanalogon, welches eingesetzt wurde, um die phosphorylierte Form von CgtR4 zu imitieren. Untersuchungen zur Funktion und Strukturanalysen an dem Antwortregulator NtrC aus *E. coli* haben gezeigt, dass Berylliumfluorid die phosphorylierte aktive Form des Antwortregulators nachahmt. Strukturanalysen an CheY, einem an der Chemotaxis beteiligten Antwortregulator, und Spo0F, einem Antwortregulator-Protein aus *B. subtilis*, das an der Regulation der Sporenbildung beteiligt ist, lassen ähnliche Ergebnisse vermuten. Funktionelle Untersuchungen an BeF_xOmpR und BeF_xNarL unterstützen die Annahme, dass Berylliumfluorid zu einer konstitutiv aktiven Form dieser Antwortregulatoren führt (Yan *et al.*, 1999). Der Antwortregulator OmpR ist an der Osmoregulation und NarL ist an der Nitratregulation beteiligt. Bei den Versuchen mit CgtR4 führte die Anwesenheit von Berylliumfluorid nicht zu einer signifikanten Änderung des Musters der gebundenen DNA-Fragmente, die Banden wurden eher etwas diffuser (siehe Abb. 29). Dies kann bedeuten, dass Berylliumfluorid im Fall von CgtR4 nicht die phosphorylierte Form nachahmen kann oder dass der durch Berylliumfluorid induzierte Zustand von CgtR4 *in vitro* keine wesentlich anderen DNA-Bindungseigenschaften besitzt als das unphosphorylierte Protein.

5.2 Versuch zur Identifizierung putativer Targetgene mittels globaler Genexpressionsanalysen

Bei einer Vielzahl von Zweikomponenten-Systemen wurde in den letzten Jahren eine Suche nach den Zielgenen mit Hilfe von Transkriptomanalysen durchgeführt. Dabei wurde z. B. der Wildtyp mit einer entsprechenden Deletionsmutante verglichen (z. B. Oshima *et al.*, 2002) oder ein Sensorkinase-Deletionsstamm mit überproduziertem Antwortregulator gegen einen Sensorkinase-Deletionsstamm mit einer geringen Antwortregulator-Konzentration (Kobayashi *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Auch in dieser Arbeit wurden Transkriptomanalysen zur Suche der Zielgene von CgtR4 eingesetzt. Dabei wurde in einem ersten Ansatz der mit dem Vektor pXMJ19 transformierte Wildtyp-Stamm mit einer Δ cgtSR4-Mutante verglichen, die das Expressionsplasmid pXMJ19CgtR4 trug. Die beiden Stämme

unterschieden sich somit in zwei Merkmalen, nämlich der Abwesenheit der Sensorkinase CgtS4 und einer erhöhten CgtR4-Konzentration in der Mutante. Die Kultivierung der Stämme erfolgte in CgXII-Minimalmedium mit 1 % Lactat als Kohlenstoffquelle, Bedingungen unter denen sie annähernd gleiche Wachstumsraten aufwiesen. Insgesamt zeigten 19 Gene, die den angelegten Kriterien entsprachen, einen mindestens 2-fach veränderten mRNA-Level, sieben einen in der Mutante erhöhten und 12 einen in der Mutante verringerten. Die Gene mit erniedrigter Genexpression (siehe Tab. 8) standen in keinem offensichtlichen funktionellen Zusammenhang zueinander. Darüber hinaus gibt es in *C. glutamicum* bisher keine Untersuchungen zu einer möglichen Regulation der *gluABCD*-, der *mutAB*-Gene oder des *pcrA*-Gens.

Betrachtet man die Gene mit einem erhöhten mRNA-Spiegel, so fällt auf, dass bis auf das Gen *ykvI* alle für die Bereitstellung von Phosphat benötigt werden (siehe Tab. 9). Die *pstSCAB*-Gene kodieren für einen hochaffinen Phosphattransporter, der unter Phosphatmangelbedingungen für eine ausreichende Versorgung mit anorganischem Phosphat verantwortlich ist (Wanner, 1995). Die Gene des *ugp*-Operons kodieren für einen spezifischen Transporter für Glycerin-3-Phosphat und Glycerin-3-Phosphoryldiester und versorgen die Zelle mit organischem Phosphat. *glpQ* kodiert für eine Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase, welche für die Hydrolyse von Glycerin-3-Phosphoryldiestern benötigt wird. Globale Transkriptionsanalysen durch Ishige *et al.* (2003) haben gezeigt, dass die genannten Gene in *C. glutamicum* bei Phosphatmangel induziert werden, darüber hinaus aber auch noch eine Reihe weiterer Phosphatmangel-spezifischer Gene (z. B. *nucH* und *phoH*), deren mRNA-Level bei dem Chipvergleich mit der Δ *cgtSR4*-Mutante nicht verändert war. Interessanterweise wurden unter Phosphatmangel auch zwei Zweikomponenten-Regulationssysteme identifiziert, deren mRNA-Level erhöht war. CgtR9/CgtS9 liegt benachbart zu Genen des Kupferstoffwechsels und ist wahrscheinlich an deren Regulation beteiligt. PhoR/PhoS ist das einzige Zweikomponenten-System in *C. glutamicum*, welches für das Wachstum von *C. glutamicum* unter Phosphat-limitierenden Bedingungen essentiell ist. DNA-Chip-Analysen zeigten, dass das PhoR-PhoS-System zur Induktion der Gene benötigt wird, die spezifisch bei Phosphat-Mangel induziert werden, wie die *pst*- und *ugp*-Gene (Martina Mickova, unveröffentlicht). Im Falle der *pst*-Gene wurde unter Phosphat-Mangel auch eine PhoRS-unabhängige Induktion beobachtet. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass das PhoS/PhoR-System das zentrale Regulationssystem für Phosphat-Mangel in *C. glutamicum* darstellt. Damit wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch noch andere Regulationssysteme wie z. B. CgtSR4 involviert sind. Die in den DNA-Chip-Analysen

beobachtete Induktion der *pst*- und *ugp*-Gene in dem *cgtSR4*-Mutantenstamm konnte durch Analyse von Plasmid-kodierten *Ppst-cat*- und *Pugp-cat*-Transkriptionsfusionen bestätigt werden.

Der Phosphatstoffwechsel und die Regulationsmechanismen, die für die Adaptation an Phosphat-Mangel nötig sind, wurden besonders in *E. coli* und *B. subtilis* sehr gut charakterisiert (Hulett, 2002; Wanner, 1995, 1996). Die Regulation des Pho-Regulons in *E. coli* unterliegt der Kontrolle durch das Zweikomponenten-System PhoR (Sensor kinase) und PhoB (Antwortregulator). Proteine bzw. Gene, die unter Phosphatmangel induziert werden, wurden durch Proteom-Analyse (Metcalf *et al.*, 1990) und transkriptionelle *lacZ*-Fusionen (VanBogelen *et al.*, 1996) identifiziert. Die Expression von insgesamt 31 Genen wird unter Phosphatmangel-Bedingungen durch PhoB/PhoR aktiviert. Neben PhoB/PhoR kontrollieren möglicherweise zwei weitere Regulationssysteme das PhoB-Regulon, die unabhängig von der Phosphat-Konzentration und offenbar nur in Abwesenheit von PhoR aktiv sind. Das erste Kontrollsystem benötigt die Sensor kinase CreC, die durch bisher unbekannte Katabolite aktiviert wird, und PhoB durch Phosphorylierung aktiviert. Für Acetylphosphat wird ebenfalls eine PhoB-aktivierende Funktion postuliert. Es ist möglich, dass Acetylphosphat PhoB direkt phosphoryliert oder aber indirekt durch eine bisher unbekannte Sensor kinase. Möglicherweise führen erhöhte Mengen von Acetylphosphat, welches als Intermediat der Substratkettenphosphorylierung entsteht, zu einer Aktivierung von PhoB. Das Zusammenspiel dieser drei Kontrollsysteme *in vivo* ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Wanner, 1995).

In *B. subtilis* sind insgesamt drei Zweikomponenten-Systeme an der Regulation des Pho-Regulons beteiligt (PhoP/PhoR, ResD/ResE, Spo0A). Außerdem ist eine generelle Stressantwort zu erkennen (Birkey *et al.*, 1998; Hulett, 2002; Sun *et al.*, 1996). Unter Phosphatmangel aktiviert PhoP die Expression von *phoPR* und *resABCDE* und aktiviert oder reprimiert gleichzeitig die Transkription weiterer Gene des PhoP-Regulons. Das Zweikomponenten-Regulationssystem ResD/ResE, das primär an der Regulation der aeroben und anaeroben Atmung beteiligt ist, wird für eine vollständige Induktion des Pho-Regulons benötigt und Spo0A zur Beendigung der Phosphatantwort sowie zur Einleitung der Sporulation. Eine generelle Stressantwort wird durch σ^B und Gene des σ^B -Regulons vermittelt. Letztere kodieren für Proteine, die zum Schutz von DNA, Membranen und Proteinen gegen oxidativen Stress dienen und zum Überleben unter extremen äußeren Bedingungen erforderlich sind, wie z. B. bei Hitze oder osmotischem Stress (Hecker und Volker, 1998; Price *et al.*, 2001).

Bei der Wertung der Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom-Vergleichs von *C. glutamicum* 13032 Δ *cgtSR4*/pXMJ19CgtR4 mit 13032/pXMJ19 muss berücksichtigt werden, dass die putativen Zielgene durch einen überproduzierten, nicht durch seine Sensorkinase regulierten Antwortregulator CgtR4 erhalten wurden. Es ist denkbar, dass eine erhöhte bzw. erniedrigte Genexpression in einigen Fällen auch unphysiologisch sein kann.

In einem weiteren DNA-Chip-Versuch wurden die mRNA-Level der Δ *cgtS4*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Beide Stämme wurden in CgXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose kultiviert, in dem die Deletionsmutante eine verringerte Wachstumsrate aufwies (siehe Abb. 26). Daher ist nicht völlig auszuschließen, dass bei diesem Versuch Unterschiede in mRNA-Leveln auftreten, die auf unterschiedlichen Wachstumsraten beruhen.

Unter Berücksichtigung der angelegten Kriterien zeigten 15 Gene einen >2-fach erhöhten mRNA-Spiegel und 13 einen >2-fach erniedrigten mRNA-Spiegel (siehe Tab. 11 und Tab. 12). Betrachtet man die Gene mit erniedrigter Genexpression so fällt auf, dass insbesondere die benachbarten Gene *lldA* (L-Lactat-Dehydrogenase) und *orf312* (entspricht NCgl2816, Transportprotein) einen ungewöhnlich stark reduzierten mRNA-Level aufweisen. Möglicherweise wird die Expression des *lldA*-Gens durch den Transkriptionsregulator Orf828 (entspricht NCgl0358) reprimiert, der in diesem Chip-Experiment einen erhöhten mRNA-Level zeigte (siehe Tab. 12). Anhand von weiteren Datenbank-Analysen (Jülich-Microarray-Database) konnte gezeigt werden, dass die *lldA*-Expression in einem Δ *orf828*-Stamm stark erhöht ist. Das heißt, der reduzierte mRNA-Level von *lldA* und *orf312* könnte eine Folge des erhöhten Levels von *orf828* sein. Außerdem zeigten Gene des Propionat-Stoffwechsels (*prpD2B2C2*), des Zuckertransports (*malEFG*), der Aminosäurebiosynthese (*argCJBDFRGH*, *leuDC*) und zwei Gene unbekannter Funktion eine erniedrigte Genexpression. Wie im vorhergehenden Experiment zeigt auch diese Gruppe von Genen keinen offensichtlichen funktionellen Zusammenhang.

Unter den Genen mit erhöhter Genexpression konnten drei Transkriptionsregulatoren identifiziert werden. Orf828 (entspricht NCgl0358) liegt divergent zum *sdhCAB*-Operon für die Succinatdehydrogenase. Durch eine vergleichende Transkriptomanalyse zwischen einem Δ *orf828*-Stamm und dem Wildtyp konnte gezeigt werden, dass bei Wachstum auf Glucose die Expression der *sdhCAB*-Gene in der Mutante erhöht vorlag, was auf eine Regulation durch Orf828 hindeutet (Annette Arndt, unveröffentlicht). Der Transkriptionsregulator Orf2456 bildet vermutlich das promotorproximale Gen des *suf*-Operons, dessen Genprodukte an der Bildung von Fe-S-Clustern beteiligt sind und wird daher im folgenden SufR genannt.

Vermutlich reguliert SufR dieses Operon. Das *oxyR*-Gen kodiert für einen Transkriptionsregulator, der die Expression von Genen aktiviert, die unter oxidativem Stress benötigt werden. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass OxyR zusammen mit einem weiteren Transkriptionsregulator SoxR Sauerstoffradikale detektieren kann und die Expression von Genen reguliert, deren Genprodukte eine antioxidierende Funktion ausüben. Dazu gehören *katG* (Katalase), *ahpCF* (Alkyl-Hydroperoxidreduktase), *oxyS* (regulatorische RNA), *dps* (nicht-spezifisches DNA-Bindeprotein), *fur* (Regulation der Eisenaufnahme), *gorA* (Glutathionreduktase) und *grxA* (Glutaredoxin) (Zheng und Storz, 2000). Durch globale Transkriptionsanalysen konnte das OxyR-Regulon weiter charakterisiert werden (Zheng *et al.*, 2001). Dabei wurden neben einer Reihe von Genen unbekannter Funktion auch die *suf*-Gene identifiziert (siehe oben). Die erhöhten mRNA-Level von *kat* und *sufR* in der Δ *cgtS4*-Mutante von *C. glutamicum* könnten also die Folge des erhöhten mRNA-Spiegels von *oxyR* sein. Auch der erhöhte mRNA-Spiegel des *ftn*-Gens (Eisen-Speicherprotein) könnte durch die erhöhte *oxyR*-Expression bedingt sein. Untersuchungen an PerR, einem Regulatorprotein aus *Staphylococcus aureus*, das ebenso wie OxyR, SoxR und PerR in *E. coli* und *B. subtilis* an der Genantwort auf oxidativen Stress beteiligt ist, zeigten, dass dieser Regulator zusätzlich an der Kontrolle der Eisenaufnahme und -Speicherung beteiligt ist (Horsburgh *et al.*, 2001). Gleichzeitig ist für Eisen-Speicherproteine der *dps*-Familie bekannt, dass sie DNA vor oxidativer Zerstörung schützen können (Zhao *et al.*, 2002). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse des Transkriptom-Vergleichs von Δ *cgtS4*-Mutante und Wildtyp darauf hin, dass das CgtS4/CgtR4-Zweikomponenten-System an der Regulation von Genen beteiligt ist, die unter oxidativem Stress exprimiert werden.

Auffällig ist, dass es zwischen dieser und der zuvor beschriebenen DNA-Chip-Analyse keine Übereinstimmung gibt. Eine mögliche Ursache könnten die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen sein.

Durch globale Transkriptionsanalysen wurden eine Reihe von putativen Targetgenen identifiziert, die möglicherweise durch CgtR4 reguliert werden. Sequenzanalysen des Antwortregulators ergaben, dass sich in der Effektor-Domäne ein Helix-Turn-Helix-Motiv befindet, was auf eine DNA-bindende Funktion des Proteins hindeutet. Um zu untersuchen, ob CgtR4 direkt an die Promotorregionen der identifizierten Targetgene binden kann, wurden mit ausgewählten Promotoren Gelretardationsexperimente durchgeführt (siehe Tab. 13). Dabei wurde sowohl das phosphorylierte als auch das nicht-phosphorylierte CgtR4-Protein getestet. In keinem Experiment konnte eine spezifische Bindung von CgtR4 an eine der Promotorregionen nachgewiesen werden. Hohe Konzentrationen von CgtR4 (bis zu 8 μ M)

fürten zu einer unspezifischen DNA-Bindung. Auffallend war, dass diese unspezifische Bindung in Gegenwart des MalE-CgtS4kin-Proteins nicht auftrat. Dies legt die Vermutung nahe, dass MalE-CgtS4kin, unabhängig davon, ob es phosphoryliert oder dephosphoryliert vorliegt, die DNA-bindende Funktion von CgtR4-His inhibiert. Eine Erklärung für diesen Befund bleibt offen. Die Ergebnisse sind jedoch ein weiteres Indiz dafür, dass CgtR4 in seiner unphosphorylierten Form aktiv ist. Da keine spezifische Bindung von CgtR4 zu beobachten war, ist es denkbar, dass es sich bei den identifizierten putativen Targetgenen um indirekte, sekundäre Zielgene handelt, deren Expression eine Folge der veränderten Genexpression eines direkten, bisher nicht identifizierten Zielgens ist. Um die Ergebnisse der DNA-Chip-Analyse weiter zu festigen, könnten zum Nachweis einer indirekten Regulation weitere Promotorstudien sowie „real-time“-PCR-Analysen durchgeführt werden. Zum Nachweis einer direkten Regulation durch CgtR4 könnten anstelle von Gelretardationsexperimenten Footprint-Experimente sowie Promotorstudien in einem heterologen Wirt wie z. B. *E. coli* durchgeführt werden.

6 Schlussfolgerung

Die bisherigen Untersuchungen am Zweikomponenten-Regulationssystem CgtS4/CgtR4 deuten darauf hin, dass der Antwortregulator CgtR4 in seiner unphosphorylierten Form aktiv ist. Damit stellt CgtS4/CgtR4 neben HoxJ/HoxA aus *Ralstonia eutropha*, HupT/HupR aus *Rhodobacter capsulatus* und AlgB aus *Pseudomonas aeruginosa* eine Ausnahme unter den bisher charakterisierten Zweikomponenten-Regulationssystemen dar. Abb. 33 zeigt ein vorläufiges Modell, das beschreibt, wie eine mögliche Regulation durch das CgtS4/CgtR4-System funktionieren könnte.

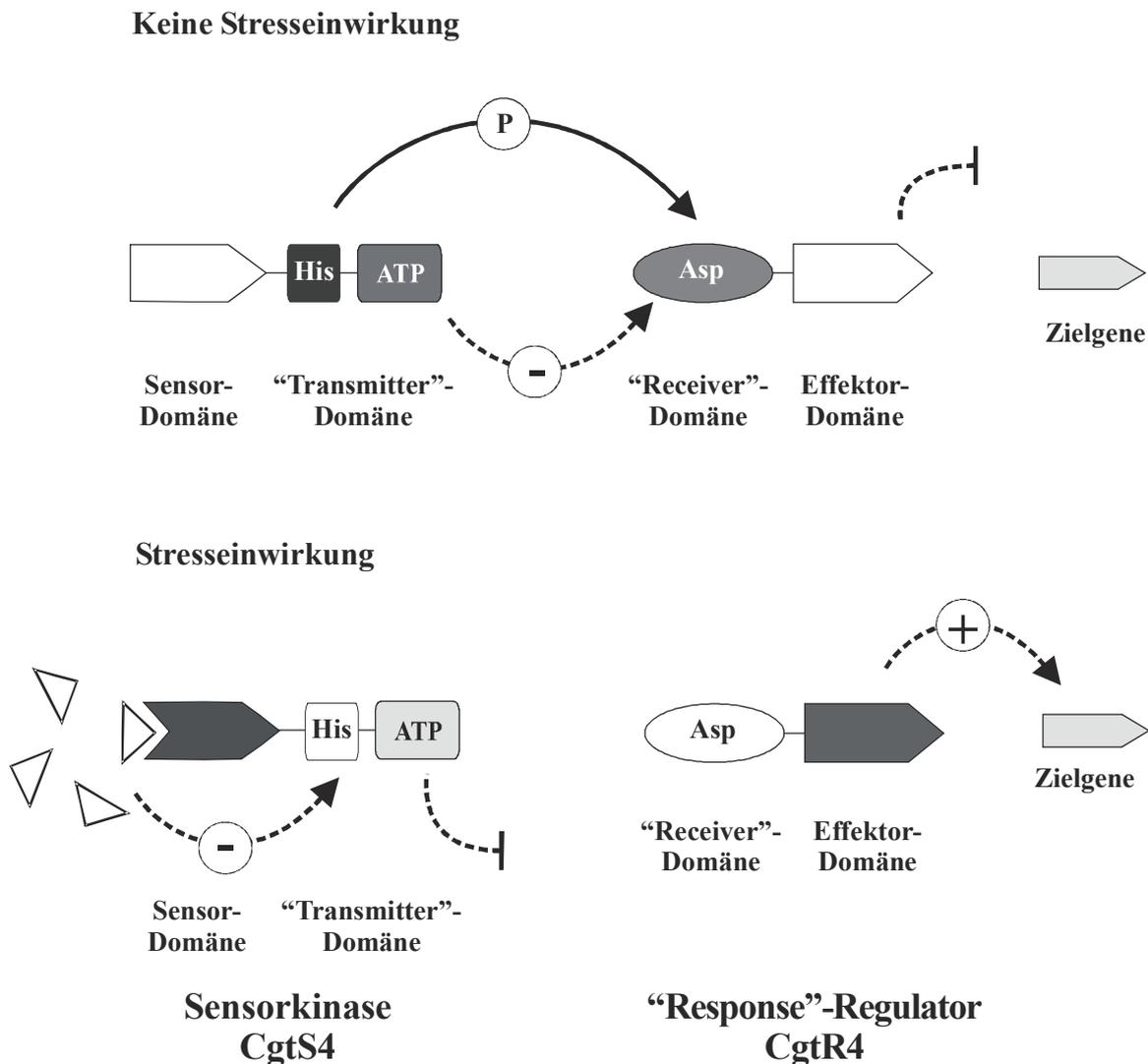


Abb. 33: Modell eines möglichen stressabhängigen Signaltransduktionsweges durch das Zweikomponenten-Regulationssystem CgtS4/CgtR4, der die Expression einer oder mehrerer Zielgene kontrolliert. Domänen, die in Abwesenheit des Stimulus (oben) oder in Gegenwart des Stimulus (unten) aktiv sind, wurden in dunkelgrau dargestellt.

In Abwesenheit eines Stimulus wird die Histidin-Kinase autophosphoryliert und überträgt die Phosphorylgruppe auf den Antwortregulator CgtR4. Dies führt zu einer Inaktivierung von CgtR4. Detektiert die Sensorkinase einen Stimulus, wird die Autokinase-Aktivität inhibiert und folglich auch keine Phosphorylgruppe auf D52 von CgtR4 übertragen. Möglicherweise trägt eine zusätzliche Phosphatase-Aktivität von CgtS4 zu einer schnelleren Dephosphorylierung von CgtR4 bei. Unphosphoryliert ist CgtR4 aktiv und kann die Expression seiner Zielgene aktivieren oder reprimieren.

Ein charakteristisches Merkmal von CgtS4/CgtR4 ist seine Essentialität. Eine chromosomale Deletion der *cgtSR4*-Gene ist nur möglich, wenn *cgtR4* durch eine Plasmid-kodierte Kopie komplementiert wird. Dies führt zu der Annahme, dass CgtS4/CgtR4 die Expression von

Genen reguliert, die lebenswichtige Funktionen in der Zelle übernehmen. Neben schon bekannten Funktionen anderer essentieller Zweikomponenten-Regulationssysteme wie Regulation des Zellzyklus' und Regulation der Zellwandsynthese bzw. Synthese der Zellmembran, existieren noch weitere essentielle Prozesse in der Zelle, die möglicherweise durch ein Zweikomponenten-Regulationssystem reguliert werden könnten. In *M. tuberculosis* wurde eine modifizierte Transposon-Mutagenese („transposon site hybridization“, TraSH) in Kombination mit einer DNA-Chip-Analyse dazu benutzt, essentielle Gene und Stoffwechselwege zu identifizieren (Sasseti *et al.*, 2003). Zur Identifizierung essentieller Gene in *B. subtilis* wurde systematisch versucht jedes einzelne Gen zu inaktivieren, bis nur noch ein Satz von Genen übrig blieb, der das Überleben der Bakterienzelle sicherstellt (Kobayashi, *et al.*, 2003). Beide Ansätze erbrachten ähnliche Ergebnisse. Essentielle Gene sind in neun Gruppen unterteilbar, DNA- und RNA-Stoffwechsel, Proteinsynthese, Zellhülle, Zellteilung, Zentralstoffwechsel, Atmungskette, Nukleotidsynthese und Synthese von Cofaktoren. Dies lässt vermuten, dass Gene wie z. B. *pcrA* (ATP-abhängige Helicase) oder *argF* (Argininbiosynthese), die in der DNA-Chip-Analyse identifiziert wurden, mögliche Kandidaten für essentielle Gene wären, die einer CgtSR4-Regulation unterliegen. Leider konnte bisher keine direkte Regulation durch CgtSR4 nachgewiesen werden. Alternativ zu den DNA-Chip-Analysen könnten „Chromatin immunoprecipitation-microarray“ (ChIP-to-chip)-Experimente zur Suche nach CgtR4-Targetgenen durchgeführt werden. Die Methode beruht auf der kovalenten Verknüpfung von Proteinen, die in der Zelle an DNA gebunden sind (*in vivo* cross-linking). Die DNA dieser Protein-DNA-Komplexe wird in kleinere Fragmente zerlegt und der zu untersuchende Protein-Komplex wird mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das Protein immunopräzipitiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend mit einem DNA-Chip hybridisiert. Diese Methode wurde erfolgreich zur Identifizierung von Zielgenen des globalen Regulators CodY eingesetzt (Molle *et al.*, 2003).

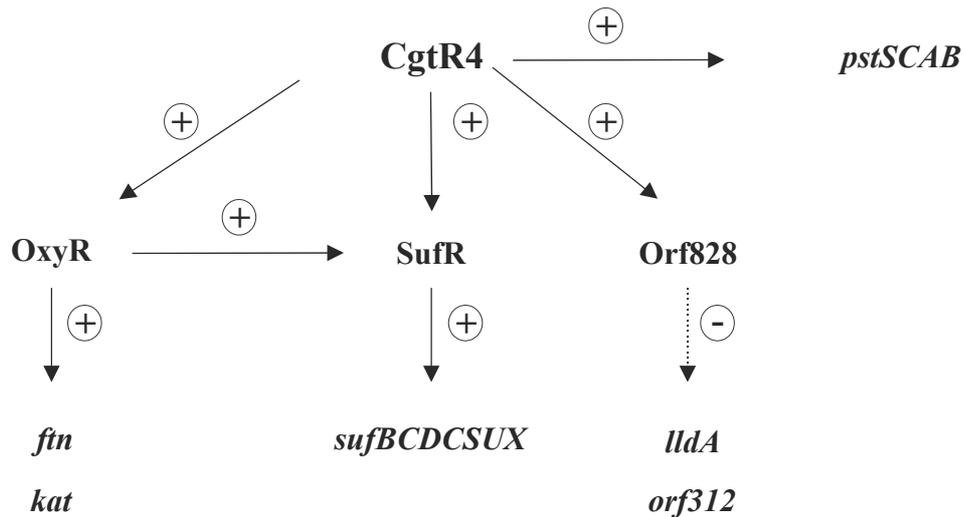


Abb. 34: Spekulatives Modell einer möglichen Regulation durch CgtR4. (-) Reprimierung, (+) Aktivierung.

Die bisher durchgeführten Transkriptionsanalysen lassen nur Spekulationen über eine mögliche Funktion von CgtS4/CgtR4 zu. Allem Anschein nach ist CgtSR4 an der Reaktion auf zwei verschiedene Stresstypen beteiligt, nämlich Phosphatmangel und oxidativem Stress (siehe Abb. 34). Möglicherweise agiert CgtS4/CgtR4 als globales Regulationssystem bei verschiedenen Stress-Situationen oder löst sogar eine generelle Stressantwort aus. Es ist denkbar, dass CgtS4/CgtR4 an der Regulation eines globalen Netzwerks beteiligt ist, in dem weitere Zweikomponenten-Regulationssysteme, Transkriptionsfaktoren oder aber vielleicht auch Sigma-Faktoren eine Rolle spielen. Ähnlich wie Zweikomponenten-Regulationssysteme können Sigma-Faktoren auf Veränderungen der Umgebung reagieren und der RNA-Polymerase Promotor-Spezifität verleihen, wodurch bestimmte Zielgene exprimiert werden. Neben den sogenannten „house-keeping“-Sigma-Faktoren, besitzen Bakterien häufig alternative Sigma-Faktoren, die unter verschiedenen Stress-Situationen aktiviert werden und sogenannte Stressgene aktivieren. Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise der Sigma-Faktor B von *B. subtilis*, der eine generelle Stressantwort auslöst. Das σ^B -abhängige Stressregulon besteht aus Genen, die bei Hitze-, Ethanol-, Salzstress, oxidativem Stress oder durch Limitierung von Glucose, Sauerstoff oder Phosphat induziert werden (Hecker und Volker, 1998; Price *et al.*, 2001). In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen dem Pho-Regulon (Regulation durch PhoP/PhoR) und dem σ^B -abhängigen Stressregulon besteht (Pragai und Harwood, 2002). In *C. glutamicum* wurden sieben Sigma-Faktoren identifiziert, über deren Regulation jedoch bisher wenig bekannt ist. Für SigB aus *Brevibacterium lactofermentum* (mittlerweile als *C. glutamicum* eingeordnet) konnte gezeigt werden, dass dieser Sigma-Faktor eine Rolle während des vegetativen Wachstums und unter

verschiedenen Stresseinwirkungen (Hitze-, Kälte-, Ethanol- und Salzstress) spielt (Halgasova *et al.*, 2002). Eine weitere Rolle in einer möglichen Regulation von Stressgenen könnten „small RNAs“ spielen. Diese nicht-translatierten RNA-Moleküle agieren als wichtige zentrale Regulatoren, die auf verschiedene Umweltveränderungen reagieren können und in der Lage sind, die Translation verschiedener Zielgene durch Bindung an die mRNA zu aktivieren oder zu inhibieren (Wassarman, 2002). Häufig regulieren diese sRNAs globale Stressfaktoren wie z. B. Sigma-Faktoren. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Synthese der „small RNA“ RprA durch das Zweikomponenten-System RcsC/RcsB reguliert wird. RprA stimuliert zusammen mit einer weiteren „small RNA“ DsrA die Translation des Sigma-Faktors RpoS (Majdalani *et al.*, 2002).

CgtS4/CgtR4 stellt aufgrund seiner Essentialität und durch den Befund, dass es möglicherweise durch Phosphorylierung inhibiert und nicht aktiviert wird, ein außergewöhnliches Zweikomponenten-System in *C. glutamicum* dar. Genomweite Transkriptomanalysen weisen auf eine wichtige Funktion in verschiedenen Stress-Situationen hin. Welche zentrale Rolle CgtS4/CgtR4 in dem globalen Regulationsnetzwerk von *C. glutamicum* spielt, bleibt zu untersuchen.

VI LITERATUR

- Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**: 279-301.
- Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R. P. und Dickerson, R. E. (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**: 11053-11061.
- Bantscheff, M., Weiss, V. und Glocker, M. O. (1999) Identification of linker regions and domain borders of the transcription activator protein NtrC from *Escherichia coli* by limited proteolysis, in-gel digestion, and mass spectrometry. *Biochemistry* **38**: 11012-11020.
- Barnes, W. M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2216-2220.
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. und Simon, M. I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-141.
- Birkey, S. M., Liu, W., Zhang, X., Duggan, M. F. und Hulett, F. M. (1998) Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. *Mol Microbiol* **30**: 943-953.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blat, Y. und Eisenbach, M. (1994) Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ. *Biochemistry* **33**: 902-906.
- Bott, M., Meyer, M. und Dimroth, P. (1995) Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* **18**: 533-546.
- Bouche, S., Klauck, E., Fischer, D., Lucassen, M., Jung, K. und Hengge-Aronis, R. (1998) Regulation of RssB-dependent proteolysis in *Escherichia coli*: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. *Mol Microbiol* **27**: 787-795.
- Bourret, R. B., Borkovich, K. A. und Simon, M. I. (1991) Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **60**: 401-441.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bramucci, M. G. und Nagarajan, V. (1996) Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose- induced lethality. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3948-3953.
- Brown, E. D., Vivas, E. I., Walsh, C. T. und Kolter, R. (1995) MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 4194-4197.
- Brzoska, P. und Boos, W. (1988) Characteristics of a *ugp*-encoded and *phoB*-dependent glycerophosphoryl diester phosphodiesterase which is physically dependent on the *ugp* transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 4125-4135.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987) XLIBblue, a high efficient plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Focus* **5**: 376-378.

- Burbulys, D., Trach, K. A. und Hoch, J. A. (1991) Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Burkovski, A. und Krämer, R. (1995) Functional expression of the glutamate uptake system from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **127**: 263-266.
- Burkovski, A. (2003) I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **179**: 83-88.
- Chen, W., Jager, A. und Klug, G. (2000) Correction of the DNA sequence of the *regB* gene of *Rhodobacter capsulatus* with implications for the membrane topology of the sensor kinase *regB*. *J Bacteriol* **182**: 818-820.
- Claes, W. A., Pühler, A. und Kalinowski, J. (2002) Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J Bacteriol* **184**: 2728-2739.
- Claros, M. G. und von Heijne, G. (1994) TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS* **10**: 685-686.
- Clauser, K. R., Baker, P. und Burlingame, A. L. (1999) Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* **71**: 2871-2882.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. und Silhavy, T. J. (1995) The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev* **9**: 387-398.
- Dietz, P., Gerlach, G. und Beier, D. (2002) Identification of target genes regulated by the two-component system HP166-HP165 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **184**: 350-362.
- Dischert, W., Vignais, P. M. und Colbeau, A. (1999) The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. *Mol Microbiol* **34**: 995-1006.
- Djordjevic, S., Goudreau, P. N., Xu, Q., Stock, A. M. und West, A. H. (1998) Structural basis for methyltransferase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1381-1386.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I. und Lejeune, P. (1999) Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 169-175.
- Dutta, R., Qin, L. und Inouye, M. (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol* **34**: 633-640.
- Eggeling, L. und Sahm, H. (1999) L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 146-153.
- Eggeling, L., Krumbach, K. und Sahm, H. (2001) L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or Tween addition doing the same? *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 67-68.

- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. und Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-14868.
- Erwin, A. L. und Gotschlich, E. C. (1996) Cloning of a *Neisseria meningitidis* gene for L-lactate dehydrogenase (L-LDH): evidence for a second meningococcal L-LDH with different regulation. *J Bacteriol* **178**: 4807-4813.
- Fabret, C. und Hoch, J. A. (1998) A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol* **180**: 6375-6383.
- Fabret, C., Feher, V. A. und Hoch, J. A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**: 1975-1983.
- Feng, J., Atkinson, M. R., McCleary, W., Stock, J. B., Wanner, B. L. und Ninfa, A. J. (1992) Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 6061-6070.
- Fiedler, U. und Weiss, V. (1995) A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *Embo J* **14**: 3696-3705.
- Fisher, S. L., Jiang, W., Wanner, B. L. und Walsh, C. T. (1995) Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB. Characterization and identification of a VanS domain that inhibits activation of PhoB. *J Biol Chem* **270**: 23143-23149.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., *et al.* (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Fountoulakis, M. und Langen, H. (1997) Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250**: 153-156.
- Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., *et al.* (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Fukuchi, K., Kasahara, Y., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S. und Ogasawara, N. (2000) The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 1573-1583.
- Goudreau, P. N. und Stock, A. M. (1998) Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. *Curr Opin Microbiol* **1**: 160-169.
- Grebe, T. W. und Stock, J. (1998) Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium. *Curr Biol* **8**: R154-157.
- Halgasova, N., Bukovska, G., Ugorcakova, J., Timko, J. und Kormanec, J. (2002) The *Brevibacterium flavum* sigma factor SigB has a role in the environmental stress response. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 77-84.
- Hazelbauer, G. L., Berg, H. C. und Matsumura, P. (1993) Bacterial motility and signal transduction. *Cell* **73**: 15-22.
- Hecht, G. B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J. M. und Newton, A. (1995) An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Embo J* **14**: 3915-3924.

- Hecker, M. und Volker, U. (1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* **29**: 1129-1136.
- Heermann, R., Fohrmann, A., Altendorf, K. und Jung, K. (2003) The transmembrane domains of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* are not essential for sensing K⁺ limitation. *Mol Microbiol* **47**: 839-848.
- Hess, J. F., Oosawa, K., Kaplan, N. und Simon, M. I. (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**: 79-87.
- Heyde, M., Laloi, P. und Portalier, R. (2000) Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 198-202.
- Himpens, S., Locht, C. und Supply, P. (2000) Molecular characterization of the mycobacterial SenX3-RegX3 two-component system: evidence for autoregulation. *Microbiology* **146 Pt 12**: 3091-3098.
- Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. und Foster, S. J. (2001) PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**: 3744-3754.
- Huala, E., Stigter, J. und Ausubel, F. M. (1992) The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. *J Bacteriol* **174**: 1428-1431.
- Hulett, F. M. (2002) The pho regulon. In: *Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. Ed. by A. L. Sonenshein et. al. ASM press, Washington, D.C.: 193-201.
- Hwang, I., Chen, H. C. und Sheen, J. (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 500-515.
- Igo, M. M., Ninfa, A. J. und Silhavy, T. J. (1989) A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. *Genes Dev* **3**: 598-605.
- Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. und Shapiro, L. (1999) Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**: 111-120.
- Jacoby, M., Ngouoto-Nkili, C. E. und Burkovski, A. (1999) Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnology Techniques* **13**: 437-441.
- Janausch, I. G., Garcia-Moreno, I. und Uden, G. (2002) Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate-stimulated histidine protein kinase *in vitro*. *J Biol Chem* **277**: 39809-39814.
- Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R. G., Gordon, M. P. und Nester, E. W. (1990) The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for *vir* gene regulation. *J Bacteriol* **172**: 525-530.
- Jung, K., Tjaden, B. und Altendorf, K. (1997) Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 10847-10852.
- Kahn, D. und Ditta, G. (1991) Modular structure of FixJ: homology of the transcriptional activator domain with the -35 binding domain of sigma factors. *Mol Microbiol* **5**: 987-997.

- Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Feng, J., Chandran, P. und Ninfa, A. J. (1994) Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. *Cell Mol Biol Res* **40**: 175-191.
- Kase, H. und Nakayama, K. (1972) Production of L-Threonin by analog-resistant mutants. *Agric Biol Chem* **36**: 1611-1621
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L. und Bott, M. (1999) The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol* **33**: 858-872.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. und Sahm, H. (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**: 5595-5603.
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Cozzarelli, N. R., Botstein, D., Brown, P. O. und Yanofsky, C. (2000) DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12170-12175.
- Kim, S. K., Wilmes-Riesenberg, M. R. und Wanner, B. L. (1996) Involvement of the sensor kinase EnvZ in the *in vivo* activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol* **22**: 135-147.
- Kinoshita, S., Udaka, S. und Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**: 193-205.
- Klose, K. E., Weiss, D. S. und Kustu, S. (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J Mol Biol* **232**: 67-78.
- Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T. und Fujita, Y. (2001) Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J Bacteriol* **183**: 7365-7370.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., *et.al.* (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4678-4683.
- Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H. und Eggeling, L. (1995) Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**: 1152-1158.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V. F. und Udden, G. (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 521-532.
- Lenz, O. und Friedrich, B. (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12474-12479.
- Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E. und Friedrich, B. (2002) The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 255-262.
- Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids-technical production and use. In: Rehm, H. J. und Reed, G. (Eds.), *Products of primary metabolism, Biotechnology* **6**: 455-502.

- Link, A. J., Phillips, D. und Church, G. M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-6237.
- Loomis, W. F., Shaulsky, G. und Wang, N. (1997) Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci* **110**: 1141-1145.
- Loomis, W. F., Kuspa, A. und Shaulsky, G. (1998) Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol* **1**: 643-648.
- Lukat, G. S., Stock, A. M. und Stock, J. B. (1990) Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**: 5436-5442.
- Lukat, G. S., Lee, B. H., Mottonen, J. M., Stock, A. M. und Stock, J. B. (1991) Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **266**: 8348-8354.
- Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. und Stock, J. B. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 718-722.
- Lushchak, V. I. (2001) Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry (Mosc)* **66**: 476-489.
- Ma, S., Selvaraj, U., Ohman, D. E., Quarless, R., Hassett, D. J. und Wozniak, D. J. (1998) Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 956-968.
- Majdalani, N., Hernandez, D. und Gottesman, S. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* **46**: 813-826.
- Martin, P. K., Li, T., Sun, D., Biek, D. P. und Schmid, M. B. (1999) Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**: 3666-3673.
- Matsubara, M. und Mizuno, T. (1999) EnvZ-independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR-mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 408-414.
- Matsubara, M. und Mizuno, T. (2000) The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **470**: 118-124.
- McCleary, W. R., Stock, J. B. und Ninfa, A. J. (1993) Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **175**: 2793-2798.
- McCleary, W. R. und Stock, J. B. (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**: 31567-31572.
- McCleary, W. R. (1996) The activation of PhoB by acetylphosphate. *Mol Microbiol* **20**: 1155-1163.
- McEvoy, M. M. und Dahlquist, F. W. (1997) Phosphohistidines in bacterial signaling. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 793-797.
- Melen, K., Krogh, A. und von Heijne, G. (2003) Reliability measures for membrane protein topology prediction algorithms. *J Mol Biol* **327**: 735-744.

- Metcalf, W. W., Steed, P. M. und Wanner, B. L. (1990) Identification of phosphate starvation-inducible genes in *Escherichia coli* K-12 by DNA sequence analysis of *psi::lacZ*(Mu d1) transcriptional fusions. *J Bacteriol* **172**: 3191-3200.
- Meyer, M., Dimroth, P. und Bott, M. (1997) *In vitro* binding of the response regulator CitB and of its carboxy-terminal domain to A + T-rich DNA target sequences in the control region of the divergent *citC* and *citS* operons of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* **269**: 719-731.
- Miroux, B. und Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289-298.
- Mizuno, T., Kaneko, T. und Tabata, S. (1996) Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis sp.* strain PCC 6803. *DNA Res* **3**: 407-414.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**: 161-168.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y. und Sonenshein, A.L. (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol* **185**: 1911-1922.
- Mourey, L., Da Re, S., Pedelacq, J. D., Tolstykh, T., Faurie, C., Guillet, V., Stock, J. B. und Samama, J. P. (2001) Crystal structure of the CheA histidine phosphotransfer domain that mediates response regulator phosphorylation in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **276**: 31074-31082.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Nakashima, K., Sugiura, A. und Mizuno, T. (1993) Functional reconstitution of the putative *Escherichia coli* osmosensor, KdpD, into liposomes. *J Biochem (Tokyo)* **114**: 615-621.
- Needham, J. V., Chen, T. Y. und Falke, J. J. (1993) Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. *Biochemistry* **32**: 3363-3367.
- Niebisch, A. und Bott, M. (2001) Molecular analysis of the cytochrome *bc*₁-*aa*₃ branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c*₁. *Arch Microbiol* **175**: 282-294.
- Niebisch, A. und Bott, M. (2003) Purification of a cytochrome *bc*₁-*aa*₃ supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome *aa*₃ oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome *c*₁. *J Biol Chem* **278**: 4339-4346.
- Ninfa, A. J., Ninfa, E. G., Lupas, A. N., Stock, A., Magasanik, B. und Stock, J. (1988) Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5492-5496.
- Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Fujita, Y. und Tanaka, T. (2001) DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two- component regulatory systems. *Nucleic Acids Res* **29**: 3804-3813.

- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., Mori, H. und Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **46**: 281-291.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G. A., Weil, B., Krämer, R. und Titgemeyer, F. (2001) *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 423-428.
- Park, H., Saha, S. K. und Inouye, M. (1998) Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6728-6732.
- Parkinson, J. S. und Kofoid, E. C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**: 71-112.
- Petit, M. A., Dervyn, E., Rose, M., Entian, K. D., McGovern, S., Ehrlich, S. D. und Bruand, C. (1998) PcrA is an essential DNA helicase of *Bacillus subtilis* fulfilling functions both in repair and rolling-circle replication. *Mol Microbiol* **29**: 261-273.
- Petit, M. A. und Ehrlich, D. (2002) Essential bacterial helicases that counteract the toxicity of recombination proteins. *Embo J* **21**: 3137-3147.
- Piazza, F., Tortosa, P. und Dubnau, D. (1999) Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. *J Bacteriol* **181**: 4540-4548.
- Polen, T. (2002) Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599.
- Posas, F., Takekawa, M. und Saito, H. (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**: 175-182.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. und Jacobson, G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate :carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.
- Pragai, Z. und Harwood, C. R. (2002) Regulatory interactions between the Pho and sigma(B)-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 1593-1602.
- Price, C. W., Fawcett, P., Ceremonie, H., Su, N., Murphy, C. K. und Youngman, P. (2001) Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **41**: 757-774.
- Pruss, B. M. und Wolfe, A. J. (1994) Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **12**: 973-984.
- Quon, K. C., Marczynski, G. T. und Shapiro, L. (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83-93.
- Robinson, V. L., Buckler, D. R. und Stock, A. M. (2000) A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* **7**: 626-633.
- Rodgers, K. R., Lukat-Rodgers, G. S. und Barron, J. A. (1996) Structural basis for ligand discrimination and response initiation in the heme-based oxygen sensor FixL. *Biochemistry* **35**: 9539-9548.

- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Mejean, V. und Foglino, M. (2000) Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol* **8**: 498-504.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. und Krämer, R. (1995) Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Rev* **16**: 243-252.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santos, J. L. und Shiozaki, K. (2001) Fungal histidine kinases. *Sci STKE* **2001**: RE1.
- Sasseti, C. M., Boyd, D. H. und Rubin, E. J. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**: 77-84.
- Schäfer, A., Kalinowski, J. und Pühler, A. (1994) Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl Environ Microbiol* **60**: 756-759.
- Schröder, I., Wolin, C. D., Cavicchioli, R. und Gunsalus, R. P. (1994) Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 4985-4992.
- Shalon, D., Smith, S. J. und Brown, P. O. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**: 639-645.
- Shaulsky, G., Fuller, D. und Loomis, W. F. (1998) A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development* **125**: 691-699.
- Silva, J. C., Haldimann, A., Prahalad, M. K., Walsh, C. T. und Wanner, B. L. (1998) *In vivo* characterization of the type A and B vancomycin-resistant enterococci (VRE) VanRS two-component systems in *Escherichia coli*: a nonpathogenic model for studying the VRE signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11951-11956.
- Silversmith, R. E., Guanga, G. P., Betts, L., Chu, C., Zhao, R. und Bourret, R. B. (2003) CheZ-mediated dephosphorylation of the *Escherichia coli* chemotaxis response regulator CheY: role for CheY glutamate 89. *J Bacteriol* **185**: 1495-1502.
- Skerra, A. und Schmidt, T. G. M. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. In *Methods in Enzymology*. Vol. 326. Thorner, J., Emr, S.D. and Abelson, J.N. (eds). San Diego: Academic Press, pp. 271-304.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., *et al.* (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* **179**: 7135-7155.
- Sola, M., Gomis-Ruth, F. X., Serrano, L., Gonzalez, A. und Coll, M. (1999) Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J Mol Biol* **285**: 675-687.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

- Stock, A., Chen, T., Welsh, D. und Stock, J. (1988) CheA protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1403-1407.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. und Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Stock, J., Surette, G., Levit, M. und Park, P. (1995) Two-component signal transduction systems: structure-function relationships and mechanisms of catalysis. In: *Two component signal transduction (Hoch J. A. und Silhavy T. J., Ed) ASM Press, Washington, D. C., USA*: 25-51.
- Stock, J. und Levit, M. (2000) Signal transduction: hair brains in bacterial chemotaxis. *Curr Biol* **10**: R11-14.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Sun, G., Birkey, S. M. und Hulett, F. M. (1996) Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 941-948.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S. und Locht, C. (1997) Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* **26**: 991-1003.
- Takahashi, Y. und Tokumoto, U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**: 28380-28383.
- Tanaka, T., Saha, S. K., Tomomori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M. B., *et al.* (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* **396**: 88-92.
- Taylor, B. L. und Zhulin, I. B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506.
- Thomason, P. A., Traynor, D., Cavet, G., Chang, W. T., Harwood, A. J. und Kay, R. R. (1998) An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. *Embo J* **17**: 2838-2845.
- Tindall, K. R. und Kunkel, T. A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Tomomori, C., Tanaka, T., Dutta, R., Park, H., Saha, S. K., Zhu, Y., Ishima, R., Liu, D., Tong, K. I., Kurokawa, H., Qian, H., Inouye, M. und Ikura, M. (1999) Solution structure of the homodimeric core domain of *Escherichia coli* histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* **6**: 729-734.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Toyoda-Yamamoto, A., Shimoda, N. und Machida, Y. (2000) Genetic analysis of the signal-sensing region of the histidine protein kinase VirA of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **263**: 939-947.

- Turchin, A. und Lawler, J. F., Jr. (1999) The primer generator: a program that facilitates the selection of oligonucleotides for site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **26**: 672-676.
- van der Rest, M. E., Lange, C. und Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 541-545.
- VanBogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L. und Neidhardt, F. C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 4344-4366.
- Vasicova, P., Abrahamova, Z., Nesvera, J., Patek, M., Sahn, H. und Eikmanns, B. (1998) Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Techniques* **12**: 743-746.
- Verhamme, D. T., Arents, J. C., Postma, P. W., Crielaard, W. und Hellingwerf, K. J. (2001) Glucose-6-phosphate-dependent phosphoryl flow through the Uhp two-component regulatory system. *Microbiology* **147**: 3345-3352.
- von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**: 487-494.
- Vrijbloed, J. W., Zerbe-Burkhardt, K., Ratnatilleke, A., Grubelnik-Leiser, A. und Robinson, J. A. (1999) Insertional inactivation of methylmalonyl coenzyme A (CoA) mutase and isobutyryl-CoA mutase genes in *Streptomyces cinnamomensis*: influence on polyketide antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* **181**: 5600-5605.
- Wagner, C., Saizieu Ad, A., Schonfeld, H. J., Kamber, M., Lange, R., Thompson, C. J. und Page, M. G. (2002) Genetic analysis and functional characterization of the *Streptococcus pneumoniae* vic operon. *Infect Immun* **70**: 6121-6128.
- Walker, M. S. und DeMoss, J. A. (1993) Phosphorylation and dephosphorylation catalyzed *in vitro* by purified components of the nitrate sensing system, NarX and NarL. *J Biol Chem* **268**: 8391-8393.
- Wanner, B. L. (1992) Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* **174**: 2053-2058.
- Wanner, B. L. (1995) Signal Transduction and Cross Regulation in the *Escherichia coli* Phosphate Regulon by PhoR, CreC, und Acetyl Phosphate. In: *Two-Component Signal Transduction*. Hoch, J. A. and Silhavy, T. J. (eds.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press: 203-221.
- Wanner, B. L. (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: *Escherichia coli and Salmonella; cellular and molecular biology (2nd edition)*. Edited by Neidhardt, F. C. et. al. (ASM Press, Washington, D. C.): 1357-1381.
- Wassarman, K. M. (2002) Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* **109**: 141-144.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. und Eisenbach, M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8787-8791.
- Wendisch, V. F., Zimmer, D. P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N. und Kustu, S. (2001) Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal Biochem* **290**: 205-213.

- Wright, G. D., Holman, T. R. und Walsh, C. T. (1993) Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* **32**: 5057-5063.
- Wu, J., Ohta, N. und Newton, A. (1998) An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1443-1448.
- Wyman, C., Rombel, I., North, A. K., Bustamante, C. und Kustu, S. (1997) Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**: 1658-1661.
- Yaku, H., Kato, M., Hakoshima, T., Tsuzuki, M. und Mizuno, T. (1997) Interaction between the CheY response regulator and the histidine-containing phosphotransfer (HPt) domain of the ArcB sensory kinase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **408**: 337-340.
- Yan, D., Cho, H. S., Hastings, C. A., Igo, M. M., Lee, S. Y., Pelton, J. G., Stewart, V., Wemmer, D. E. und Kustu, S. (1999) Berylliofluoride mimics phosphorylation of NtrC and other bacterial response regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14789-14794.
- Yoshinaga, F. und Nakamori, S. (1983) Production of amino acids. In: *Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation*. Herrmann K. M. und Somerville, R. L. (eds); Addison-Wesley Publishing Col, Inc., Reading, Mass.: 405-429.
- Zahrt, T. C. und Deretic, V. (2000) An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **182**: 3832-3838.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E. und Chasteen, N. D. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 27689-27696.
- Zheng, M. und Storz, G. (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol* **59**: 1-6.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L. J., Smulski, D. R., LaRossa, R. A. und Storz, G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**: 4562-4570.
- Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A. und Kustu, S. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14674-14679.

Danksagung

Ein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Michael Bott für die Überlassung des Themas, die erstklassige Betreuung sowie das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Herrn Prof. R. Wagner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. H. Sahm bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am IBT1 und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Der Degussa AG danke ich für die Bereitstellung der Genomsequenz von *Corynebacterium glutamicum*.

Bei der AG Wendisch bedanke ich mich für die Nutzung und sorgfältige Einarbeitung in die DNA-Chip-Technologie und ein besonderer Dank gilt Tino für seine Hilfe bei Computer-technischen Problemen.

Meiner Arbeitsgruppe, Andreas, Armin, Axel, Christian, Kerstin, Melanie, Martina, Sabine, Sibylle und Tanja möchte ich für die gute fachliche Zusammenarbeit und vor allem für die angenehme, hilfsbereite und lustige Atmosphäre während der gemeinsamen Zeit im Labor danken. Ein besonderer Dank gilt Steffen für die guten Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit einen wertvollen Beitrag geleistet haben.

Christina, Nicole, Axel und Martina danke ich für die angenehme Atmosphäre im Büro.

Marc Wingers danke ich für seine engagierte Arbeit im Rahmen seiner Praktika.

Außerdem sei allen Institutsangehörigen an dieser Stelle für die nette Atmosphäre, die stets gewährte Unterstützung und die netten Einstands-, Ausstands-, Promotions- und Geburtstagsfeste gedankt.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Andrea, Axel, Christina, Maren, Nicole, Olli, Ulli, Tino und ganz besonders Roman für die kleinen Aufmunterungen während der Arbeitszeit und die netten Abende nach Arbeitsschluss.

Meiner Freundin Guggel ein dickes Dankeschön für all die Aufmunterungen und guten Ratschläge besonders in der Endphase.

Ein besonders lieber Dank gilt Roman, dessen stete Hilfe, Motivation und selbstlose Unterstützung von unschätzbarem Wert für mich sind.

Ein grenzenloser und besonders lieber Dank gilt meiner Familie, die mich mit Fürsorge, Verständnis, Aufmunterungen und unzähligen, unbezahlbaren Unterstützungen durch Studium und Doktorarbeit begleitet hat.