

**Regulation der *clp*-Genexpression durch  
ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus  
*Corynebacterium glutamicum***

In 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

Sabine Engels

aus Bonn

Jülich, 2004



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich unter Anleitung von Prof. Dr. M. Bott und Dr. S. Schaffer durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. M. Bott  
Institut für Biotechnologie 1  
Arbeitsgruppe Biochemie  
Forschungszentrum Jülich GmbH

Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner  
Institut für Physikalische Biologie  
Abteilung für Molekularbiologie der Prokaryoten  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2004

Teile dieser Dissertation erschienen in der folgenden Publikation:

Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M. and Schaffer, S. (2004) *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. *Mol Microbiol*, 52, 285-302.





---

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>2</b>
<b>III</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
1.	<b>Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>10</b>
2.	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....</b>	<b>10</b>
2.1	Bakterienstämme.....	10
2.2	Plasmide .....	11
2.3	Oligonukleotide.....	13
3.	<b>Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien .....</b>	<b>18</b>
3.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen .....	18
3.2	Stammhaltung .....	19
3.3	Bestimmung der optischen Dichte .....	20
4.	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>20</b>
4.1	DNA-Isolierung.....	20
4.2	Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA .....	20
4.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	21
4.4	Rekombinante DNA-Techniken.....	21
4.5	Transformation von Bakterien .....	22
4.5.1	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
4.5.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	22
4.6	Konstruktion von Deletionsmutanten .....	23
4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	24
4.8	Zufallsmutagenese.....	25
4.9	DNA-Sequenzierung .....	25
5.	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>26</b>
5.1	Zellaufschluss und Fraktionierung .....	26
5.2	Proteinbestimmung .....	27
5.3	Proteinreinigung.....	27
5.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	28
5.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
5.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen .....	28
5.4.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen .....	29
5.5	Western-Blot .....	30

5.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	31
<b>6.</b>	<b>Genexpressionsanalysen.....</b>	<b>33</b>
6.1	Isolierung von RNA .....	33
6.2	DNA-Chip-Analysen .....	33
6.2.1	Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips .....	33
6.2.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	34
6.2.3	DNA-Chip-Hybridisierung.....	35
6.2.4	Auswertung von DNA-Chips .....	35
6.3	Primer-Extension-Analysen .....	36
6.4	RT-PCR .....	37
<b>7.</b>	<b>Analyse von DNA-Protein-Interaktionen .....</b>	<b>38</b>
7.1	Affinitätsreinigung mit Dynabeads Streptavidin-gebundener DNA.....	38
7.2	DNase I-Footprint-Analyse.....	39
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungen zur Regulation der <i>clp</i>-Gene durch ClgR.....</b>	<b>41</b>
1.1	Relative Quantifizierung der Transkripte von <i>clpPIP2</i> und <i>clpC</i> und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels Primer-Extension-Analyse .....	41
1.2	Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032, $\Delta clpC$ , $\Delta clgR$ und $\Delta clpC\Delta clgR$ .....	43
1.3	Identifikation der ClgR-Bindestellen stromaufwärts von <i>clpPIP2</i> und <i>clpC</i> .....	44
1.3.1	Aufreinigung von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II.....	44
1.3.2	Nachweis der Funktionalität der ClgR-Konstrukte.....	47
1.3.3	Bindung von ClgR-C an die Promotorbereiche von <i>clpPIP2</i> und <i>clpC</i> .....	48
1.4	Analyse der <i>clpPIP2</i> - und <i>clpC</i> -Promotorbereiche in Actinomyceten .....	50
<b>2.</b>	<b>Definition des ClgR-Regulon .....</b>	<b>53</b>
2.1	Eingrenzung weiterer putativer Mitglieder des ClgR-Regulons.....	53
2.2	Relative Quantifizierung der Transkripte putativer Gene des ClgR-Regulons .....	54
2.3	Untersuchung der Bindung von ClgR an weitere Zielpromotoren .....	56
2.3.1	Affinitätsreinigung mit ausgewählten Zielpromotoren .....	56
2.3.2	Identifikation der Bindungsstellen mittels DNase I-Footprint-Analysen.....	57
2.4	Untersuchungen zur Funktion von NCgl0748 und HflX.....	60
2.4.1	Anfügen von StrepTag-II codierenden Sequenzen an die chromosomalen NCgl0748- und hflX-Gene.....	60
2.4.2	Lokalisation von NCgl0748 und HflX über Anti-StrepTag-Westernblot.....	62
2.4.3	Konstruktion und phänotypische Charakterisierung von NCgl0748- und hflX- Deletionsmutanten.....	63
2.4.4	Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032, $\Delta NCgl0748$ und	

<i>ΔhflX</i> .....	64
2.4.5 Transkriptomvergleich von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>ΔNCgl0748</i> .....	66
<b>3. Versuche zur Regulation der ClgR-Aktivität.....</b>	<b>68</b>
3.1 Quantifizierung der mRNA-Menge von <i>clgR</i> in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und <i>ΔclpC</i> -Mutante .....	69
3.2 Untersuchung der Stabilität von ClgR in der <i>ΔclpC</i> -Mutante.....	70
3.2.1 Aufreinigung von Strep-getagtem ClgR.....	70
3.2.2 Lokalisation von ClgR nach zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	71
3.2.3 Proteomanalyse von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und <i>ΔclpC</i> -Mutante nach Silberfärbung.....	72
3.3 Untersuchung der Stabilität von ClgR in einer konditionalen <i>clpP</i> -Mutante .....	73
3.4 Entwicklung eines Screeningsystems zur Identifikation des Degradationssignals in ClgR.....	76
<b>4. Untersuchungen zum Stimulus der Aktivierung von ClgR .....</b>	<b>81</b>
4.1 Induktion der SOS-Antwort mit Mitomycin C .....	81
4.1.1 Vergleich des Wachstums von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>ΔclgR</i> in Gegenwart verschiedener Mitomycin-Konzentrationen.....	82
4.1.2 Vergleich der Zellmorphologie von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und <i>ΔclgR</i> nach Zugabe von Mitomycin C .....	82
4.1.3 Einfluss von Mitomycin auf die globale Genexpression von <i>C. glutamicum</i> 13032 und <i>ΔclgR</i> -Mutante.....	84
<b>V Diskussion.....</b>	<b>86</b>
<b>1. ClgR, ein Regulator der <i>clp</i>-Genexpression in Actinomyceten.....</b>	<b>86</b>
<b>2. Das ClgR-Regulon.....</b>	<b>88</b>
2.1 Identifikation der Mitglieder des ClgR-Regulons.....	88
2.2 Charakterisierung von NCgl0748 und HflX .....	91
<b>3. Transkriptionsaktivierung durch ClgR.....</b>	<b>93</b>
<b>4. Die Regulation der ClgR-Aktivität.....</b>	<b>94</b>
4.1 Posttranslationale Regulation von ClgR .....	94
4.2 Das Degradationssignal von ClgR .....	97
<b>5. Stimulus der Stabilisierung von ClgR.....</b>	<b>100</b>
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>102</b>
<b>VI Literaturverzeichnis.....</b>	<b>105</b>

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ClgR-C	ClgR mit C-terminalem StrepTag-II
Cm	Chloramphenicol
d	Durchmesser
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-carboxylsäure
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
$\mu$	mikro-
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionisation - time-of-flight
$M_r$	relatives Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
$\Omega$	Ohm
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Adenin oder Guanin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S	Cytosin oder Guanin
SDS	Natriumdodecylsulfat
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tc	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ )
v/v	Volumen pro Volumen
W	Adenin oder Thymin
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galactosid
Y	Thymin oder Cytosin



## I ZUSAMMENFASSUNG

Die energieabhängige Protease Clp ist sowohl für die Proteinqualitätskontrolle als auch für die Regulation zellulärer Prozesse von zentraler Bedeutung. In einer  $\Delta clpC$ -Mutante von *Corynebacterium glutamicum* sind die Proteinmengen der proteolytischen Untereinheiten ClpP1 und ClpP2 sowie auch die *clpP1P2*-mRNA-Mengen erhöht. An die Promotorregion des *clpP1P2*-Operons bindet ein Protein (ClgR) mit einem zentralen Helix-Turn-Helix-Motiv. Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des funktionalen Zusammenhangs zwischen ClgR, ClpC und der *clpP1P2*-Expression. Dabei wurden folgende Resultate erhalten:

1. ClgR bindet innerhalb der Promotorregionen von *clpC* und dem *clpP1P2*-Operon an die unvollständig palindromische Sequenz WCGC-N5-GCGWW und aktiviert die Transkription. ClgR-homologe Gene kommen in allen sequenzierten Actinomyceten ausser *M. leprae* vor und die ClgR-Bindestelle stromaufwärts von *clpC* und *clpP1P2* ist konserviert. Daher ist vermutlich auch die Funktion von ClgR als Transkriptionsaktivator der *clp*-Gene in diesen Actinomyceten konserviert.
2. Neben den *clp*-Genen aktiviert ClgR auch die Transkription von *ptrB*, *hflX*, *NCgl0748* und dem *NCgl0240-recR*-Operon. Während *NCgl0748* und *NCgl0240* für Proteine mit unbekannter Funktion kodieren, besitzt das *ptrB*-Genprodukt signifikante Ähnlichkeit zur Protease II aus *E. coli*. Auch HflX könnte durch Interaktion mit HflC bzw. FtsH möglicherweise an der Proteolyse beteiligt sein. RecR wird dagegen für die DNA-Reparatur nach UV-induzierter DNA-Schädigung benötigt. ClgR reguliert somit Gene, deren Produkte in die unterschiedlichen physiologischen Prozesse Proteolyse und DNA-Reparatur involviert sind. Für *recN* und *uvrA*, deren Genprodukte ebenfalls an der DNA-Reparatur/Rekombination beteiligt sind, wird eine indirekte Regulation durch ClgR postuliert.
3. Die Aktivität von ClgR wird hauptsächlich posttranslational durch konditionale Proteolyse mittels der ClpCP1- und/oder ClpCP2-Protease kontrolliert. Das Degradationssignal liegt im C-Terminus von ClgR. Ein Aminosäureaustausch von Leucin-73 zu Prolin führt zu einer Stabilisierung des Proteins.

## II EINLEITUNG

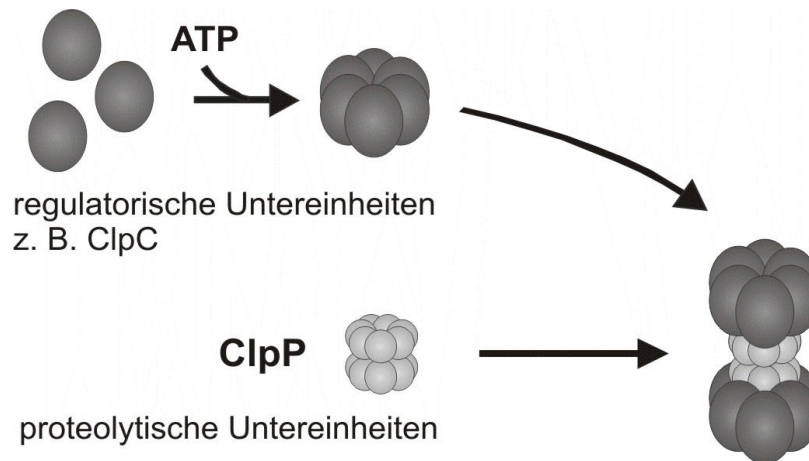
### Aufbau und Funktion energieabhängiger Proteasen

Energie-abhängige Proteasen helfen der Zelle bei der Beseitigung nicht-funktioneller Proteine und spielen daneben eine wichtige Rolle in regulatorischen Prozessen. Während in Eukaryoten verschiedene Ubiquitin-tagging-Systeme die unterschiedlichen Substrate einer cytosolischen Protease, dem 26S Proteasom, zuführen, erfolgt in Prokaryoten die Auswahl des Substrates durch die Protease selbst. In Prokaryoten findet man fünf verschiedene ATP-abhängige Proteasen. Neben den Serinproteasen Lon (Lon mutants form **long** cells) und Clp (caseinolytic protease) (Chung *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1987) gibt es noch die Threoninprotease HslUV (heat shock locus gene products **U** and **V**) (Chuang *et al.*, 1993), die membrangebundene Metalloprotease FtsH (filamentation temperature-sensitive) (Santos and De Almeida, 1975) und in einigen Actinomyceten Untereinheiten des Proteasoms (Nagy *et al.*, 1998). Bei allen handelt es sich um große oligomere Komplexe, wobei das proteolytische Zentrum im Inneren liegt und nur durch eine enge Pore zugänglich ist. Die Kontrolle der Proteolyse erfolgt durch die regulatorischen ATPase-Untereinheiten bzw. -Domänen. Diese binden die spezifischen Substrate, entfalten sie ATP-abhängig, so dass sie durch die Pore ins proteolytische Zentrum transloziert werden können, und haben neben der Translokation auch allosterischen Einfluss auf die proteolytische Aktivität (Gottesman *et al.*, 1997). Bei Clp- und HslUV-Proteasen erfolgen Substraterkennung und -entfaltung (Chaperonfunktion) und proteolytische Degradation durch verschiedene Untereinheiten, während bei Lon und FtsH separate Domänen einer Untereinheit dafür zuständig sind.

### Der Aufbau der Clp-Protease

Die Clp-Protease ist in Bakterien weit verbreitet und homologe Proteine wurden auch in Plastiden und Mitochondrien gefunden. Strukturell ist die Clp-Protease relativ gut charakterisiert (Abb. 1). Das proteolytische Zentrum wird aus den ClpP-Untereinheiten gebildet, die spontan zu einem Tetradecamer oligomerisieren, das aus zwei Kopf-an-Kopf aneinander gelagerten heptameren Ringen besteht (Wang *et al.*, 1997). Die katalytische Triade der einzelnen Untereinheiten, bestehend aus einem Serin-, einem Histidin- und einem Aspartat-Rest, liegen im Inneren des Tetradecamers, das nur durch zwei enge, axiale Poren zugänglich ist. Durch diese Anordnung wird der Abbau gefalteter zellulärer Proteine verhindert und die ClpP-Protease kann alleine nur kleine Peptide abbauen. Für den Abbau von größeren Peptiden bzw. Proteinen sind





**Abb. 1:** Modell zur Struktur der Clp-Protease. Die proteolytischen Untereinheiten bilden ein Tetradekamer, mit dem zwei hexamere Ringe aus regulatorischen Untereinheiten assoziieren können.

zusätzlich die ATPase-Untereinheiten notwendig. Diese gehören zur Clp/Hsp100-Proteinfamilie, die wiederum der AAA+ Superfamilie untergeordnet ist (Dougan *et al.*, 2002a). Die AAA+ Superfamilie (ATPases associated with a variety of functions) ist eine facettenreiche Proteinfamilie, deren Mitglieder an zellulären Prozessen wie Zellteilung und Zelldifferenzierung, Thermotoleranz, Hitzeschock-Antwort und Regulation der Transkription beteiligt sind. Trotzdem arbeiten sie nach einem gemeinsamen Mechanismus, um ihre unterschiedlichen biologischen Funktionen zu erfüllen, wie z. B. der Auflösung von Protein-Protein- oder DNA-Protein-Komplexen. Innerhalb der Clp/Hsp100-Proteinfamilie kann zwischen zwei Subklassen unterschieden werden. Mitglieder der ersten Klasse (z. B. ClpA, ClpB, ClpC und ClpE) enthalten zwei Nukleotid-bindende Domänen (NBD), während Mitglieder der zweiten Klasse (z. B. ClpX) nur eine NBD enthalten (Schirmer *et al.*, 1996). Neben den konservierten Nukleotid-bindenden Domänen unterscheiden sich die Proteine durch ihre N-terminalen Domänen. Bisher ist nicht bekannt, ob diese direkt oder indirekt an der Substraterkennung beteiligt sind. In Gegenwart von ATP oligomerisieren die ATPase-Untereinheiten und bilden hexamere Ringe. Während einige dieser Proteine ausschließlich als isolierte Chaperone agieren (z. B. ClpB), können andere mit dem proteolytischen ClpP-Tetradekamer assoziieren und eine proteolytisch aktive Protease bilden (Maurizi *et al.*, 1998). Die Interaktion zwischen ATPase und Peptidase erfolgt über den LGF-Loop der ATPase-Untereinheiten mit dem Sequenzmotiv [LIV]-G-[FL] (Kim *et al.*, 2001). Bei der Proteolyse durch die Clp-Protease entstehen Peptide aus 5-10 Aminosäuren, die durch geeignete Peptidasen weiter abgebaut werden. Für die Bindung der spezifischen Substrate an die ATPase-Untereinheit wird ATP benötigt, jedoch nicht hydrolysiert. ATP-Hydrolyse ist für die initiale Entfaltung des Proteins und die Translokation in das proteolytische Zentrum notwendig (Hoskins *et al.*, 2000b).

## Funktion und Regulation der Clp-Protease in Bakterien

Wie andere ATP-abhängige Proteasen ist auch die Clp-Protease an der Protein-Qualitätskontrolle beteiligt. Fehlgefaltete, aggregierte und denaturierte Proteine werden anhand exponierter hydrophober Bereiche erkannt und abgebaut. Daneben ist die Clp-Protease auch am Abbau von Proteinen, die C-terminal ein SsrA-Tag besitzen, beteiligt (Gottesman *et al.*, 1998). Das SsrA-Tag wird Polypeptiden, die aus beschädigter oder unvollständiger mRNA hervorgehen, cotranslational angehängen.

Neben der generellen Funktion in der Protein-Qualitätskontrolle dient die Proteolyse durch die konditionale Degradation funktionstüchtiger Proteine auch der Regulation zellulärer Prozesse. Dabei werden Proteine, die in der Zelle nicht mehr benötigt werden, abgebaut oder der Grundgehalt intakter Proteine, die nur unter bestimmten Bedingungen benötigt werden, durch fortwährenden Abbau niedrig gehalten. Der Vorteil dieses energieaufwändigen Prozesses von gleichzeitiger Synthese und Degradation eines Proteins liegt in der schnellen Regulation. Der Abbau eines regulatorischen Proteins kann z. B. durch Modifikation innerhalb von Sekunden gestoppt werden und die zelluläre Konzentration dieses Regulators somit schneller ansteigen als nach transkriptioneller Induktion (Jenal and Hengge-Aronis, 2003). Das ist insbesondere für die generelle Stress-Antwort von Bedeutung. Die Proteolyse dient somit auch der kontrollierten Degradation regulatorischer und struktureller Proteine, die an Prozessen wie Zellzyklus, Differenzierung und Stress-Antwort beteiligt sind. Eines der in diesem Zusammenhang am besten untersuchten Proteine ist der Sigma-Faktor  $\sigma^S$  (RpoS) aus *Escherichia coli*, der die Expression von Stationärphasen- und Stressantwort-Genen reguliert. In der exponentiellen Wachstumsphase ist die Konzentration von  $\sigma^S$  in der Zelle aufgrund der schnellen Degradation relativ gering.  $\sigma^S$  wird von der phosphorylierten Form des Response-Regulators RssB erkannt und der ClpXP-Protease zum Abbau zugeführt (Muffler *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2001). Ein anderes gut untersuchtes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor ComK, der die Expression der späten Kompetenz-Gene in *Bacillus subtilis* reguliert. MecA fungiert dabei als Adapterprotein zwischen ComK und ClpC und führt ComK der Degradation durch die ClpCP-Protease zu (Turgay *et al.*, 1998; Turgay *et al.*, 1997). Das Kompetenz-Quorum-sensing-System, bestehend aus dem Zweikomponenten-System ComP-ComA, dem extrazellulären Pheromon ComX und ComQ (zuständig für die proteolytische Spaltung und Modifikation von pre-ComX) (Ansaldi and Dubnau, 2004), aktiviert die Synthese von ComS (Hamoen *et al.*, 1995; Magnuson *et al.*, 1994), das an MecA bindet und die Freisetzung von ComK bewirkt. ComK wird dann nicht mehr durch ClpCP degradiert. Weitere Beispiele für eine Clp-abhängige konditionale Degradation intakter

Proteine sind Transkriptionsregulatoren wie CtsR von *B. subtilis* und CtrA von *Caulobacter crescentus* (Derre *et al.*, 2000; Jenal and Fuchs, 1998), metabolische Schlüsselenzyme wie das erste Enzym in der Methionin-Biosynthese, die Homoserin-Transsuccinylase (*metA*) (Biran *et al.*, 2000) und zahlreiche andere Proteine mit unterschiedlicher Funktion wie UmuD', HsdR und Dps von *E. coli*; MurA von *B. subtilis* oder McpA von *C. crescentus* (Gonzalez *et al.*, 2000; Kock *et al.*, 2004; Makovets *et al.*, 1999; Stephani *et al.*, 2003; Tsai and Alley, 2001).

Die selektive Substraterkennung durch die ATPase-Untereinheit ist für die konditionale Degradation entscheidend. Die Substratauswahl ist dabei von verschiedenen Faktoren wie Sequenzmotiven innerhalb des Proteins, Modulatoren und Adaptoren abhängig. Die Targeting-Motive in den Substraten, die von der Clp-Protease erkannt werden, sind in der Regel in der Nähe des N- bzw. des C-Terminus lokalisiert. Schon eine einzige N-terminale Aminosäure kann die Degradation eines Proteins beeinflussen („N-end rule“) (Varshavsky, 1996). Meist sind die Motive jedoch in der Nähe und nicht am unmittelbaren Terminus lokalisiert. Durch Sequenzanalyse von verschiedenen *E. coli* ClpXP-Substraten konnten fünf Motive identifiziert werden (Flynn *et al.*, 2003). Zwei dieser Motive befinden sich am C-Terminus der Proteine und haben Ähnlichkeit zu dem Motiv Leu-Ala-Ala-COOH des SsrA-Tags und dem Erkennungsmotiv von MuA, Arg-Arg-Lys-Lys-Ala-Ile-COOH (Levchenko *et al.*, 1997). Daneben wurden drei N-terminale Motive identifiziert. Inzwischen gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass ein Targeting-Motiv, das normalerweise an einem Ende eines Proteins erkannt wird, auch am entgegengesetzten Ende bzw. im Inneren der Primärsequenz wirkt und zum Abbau des Proteins führt (Hoskins *et al.*, 2002). Die Substratspezifität der Proteasen wird außerdem durch substratspezifische Modulatoren und Adaptoren modifiziert. Einige Modulatoren haben dabei einen globalen Einfluss auf die Art des Substrates, wie z. B. HflC/HflK auf FtsH, während andere sehr spezifisch wirken, wie z. B. RssB. Bei HflK und HflC handelt es sich um Membranproteine, die die membrangebundene Protease FtsH von der Degradation von Membranproteinen wie SecY zum Abbau cytosolischer Proteine umschalten können (Kihara *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1997). Wie die Aktivität von HflK und HflC moduliert wird, so dass sie sowohl die Regulation membranassoziierter als auch cytoplasmatischer Proteine beeinflussen, ist bisher nicht geklärt. RssB ist ein sehr spezifisches Adapterprotein, das an einen  $\alpha$ -helicalen Bereich von  $\sigma^S$  bindet. Ein nach  $\sigma^S$ -RssB Interaktion exponierter Bereich am N-Terminus von  $\sigma^S$  ist dann die Bindestelle für ClpX (Stüdemann *et al.*, 2003). ClpS ist ein weiteres Beispiel für einen Substratmodulator, der durch Bindung an ClpA die Degradation von SsrA-getagten Proteinen durch ClpAP verhindert. Möglicherweise modifiziert ClpS die Substratspezifität von

ClpA, damit aggregierte Proteine, z. B. nach einem Hitzeschock, bevorzugt abgebaut werden (Dougan *et al.*, 2002b).

Neben der Modulation der Substratspezifität wird auch die Clp-Konzentration in der Zelle den äußeren Bedingungen angepasst. Viele Proteasen sind Hitzeschock-Proteine und werden unter Bedingungen mit vielen fehlgefalteten, beschädigten Proteinen in größeren Mengen gebraucht. Eine Induktion der Expression der *clp*-Gene konnte in *B. subtilis* nach einem Hitzeschock, bei osmotischem Stress, bei Ethanol-Stress und bei Puromycin-Behandlung beobachtet werden (Gerth *et al.*, 1998). Die Mechanismen der Regulation der *clp*-Gene sind in *E. coli* und *B. subtilis* gut untersucht. In *E. coli* ist die RNA-Polymerase mit dem alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^{32}$  für die durch Hitze ausgelöste Transkriptionsaktivierung von *clpX*, *clpP* und anderen Stress-Genen verantwortlich (Arsene *et al.*, 2000), während die Expression von *clpC*, *clpE* und *clpP* in *B. subtilis* durch den Transkriptionsrepressor CtsR kontrolliert wird (Derre *et al.*, 1999; Krüger and Hecker, 1998). Sowohl die Aktivität von  $\sigma^{32}$  als auch von CtsR wird zumindest teilweise auf der Ebene der Proteinstabilität reguliert. Die Menge und Stabilität von  $\sigma^{32}$  wird durch das DnaKJ-GrpE-Chaperon-System negativ reguliert, wobei eine direkte Interaktion von DnaK und  $\sigma^{32}$  zum Abbau von  $\sigma^{32}$ , insbesondere durch die membranassoziierte Protease FtsH, führt (Gamer *et al.*, 1996; Straus *et al.*, 1989). Bei Hitzestress nimmt die Stabilität von  $\sigma^{32}$  drastisch zu, weil DnaKJ-GrpE nun für die Deaggregation und Entfaltung geschädigter Proteine benötigt wird und somit nicht mehr für die Bindung an  $\sigma^{32}$  zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu ist CtsR unter normalen Bedingungen stabil und reprimiert die Transkription von *clpC* und *clpP*. McsB, eine putative Kinase, inaktiviert CtsR unter Stress-Bedingungen durch Modifikation (z. B. Phosphorylierung) und markiert es für den Abbau durch die ClpCP-Protease (Krüger *et al.*, 2001).

### **ATP-abhängige Proteasen in *Corynebacterium glutamicum***

*Corynebacterium glutamicum* wurde 1957 aus Bodenproben isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957) und wird der Familie der *Corynebacteriaceae* in der Ordnung der *Actinomycetales* zugeordnet (Liebl, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1997). Es ist ein Gram-positives, unbewegliches Eubakterium mit stäbchen- bis keulenförmiger Morphologie, das keine Sporen bildet und unter Biotin-Mangel L-Glutamat ausscheidet (Abe *et al.*, 1967). Durch die Produktion von Primärmetaboliten ist es für die Biotechnologie von erheblicher Bedeutung und dient zudem als Modell-Organismus für die Unterordnung *Corynebacterineae*, zu der sechs Familien einschliesslich der *Mycobacteriaceae* mit ihren wichtigen pathogenen Vertretern wie *Mycobacterium tuberculosis* gehören. Das

Genom von *C. glutamicum* (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003) kodiert neben der membrangebundenen Protease FtsH sieben putative *clp*-Gene (Tab. 1). Die große Anzahl unterschiedlicher Clp-Untereinheiten ist möglicherweise auf die Abwesenheit von Lon, HslUV und proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms in *C. glutamicum* zurückzuführen.

**Tab. 1:** Annotation der *clp*-Gene aus *C. glutamicum* und Sequenzidentität der entsprechenden Proteine zu verwandten Proteinen aus *E. coli* bzw. *B. subtilis*.

NCBI	Annotation	Aminosäuresequenzidentität
NCgl1689	„ClpE“	30% zu <i>E. coli</i> ClpA, 28% zu <i>B. subtilis</i> ClpE
NCgl1716	„ClpA“	28% zu <i>E. coli</i> ClpA, 27% zu <i>B. subtilis</i> ClpC
NCgl2304	ClpX	57% zu <i>E. coli</i> ClpX
NCgl2328	ClpP1	53% zu <i>E. coli</i> ClpP
NCgl2327	ClpP2	47% zu <i>E. coli</i> ClpP
NCgl2585	ClpC	56% zu <i>B. subtilis</i> ClpC
NCgl0682	ClpB	55% zu <i>E. coli</i> ClpB

Die Gene *clpP1* und *clpP2* sind in einem bicistronischen Operon organisiert. Die Proteine ClpP1 und ClpP2 weisen 48% Sequenzidentität zueinander auf und besitzen beide die für proteolytische Untereinheiten typische katalytische Triade. Daneben wurden fünf Gene gefunden, deren Proteinprodukte der Clp/Hsp100-Proteinfamilie von ATPasen zugeordnet werden können. Von ClpC aus *B. subtilis* und ClpX aus *E. coli* ist bekannt, dass sie mit ClpP interagieren. „ClpA“ und „ClpE“ können aufgrund des Fehlens bestimmter Sequenzmotive und der relativ geringen Ähnlichkeit zu verwandten Proteinen nicht direkt den Clp-Unterfamilien zugeordnet werden. Von „ClpA“ und „ClpE“ weist nur das letztgenannte den für die Interaktion mit ClpP verantwortlichen LGF-Loop auf. ClpB agiert in anderen Organismen als isoliertes Chaperon und in *C. glutamicum* könnte dies ausser für ClpB auch für „ClpA“ zutreffen.

Bisher ist über die Regulation der *clp*-Gene und die physiologischen Prozesse, die in *Corynebacterium* durch die Clp-Protease reguliert werden, fast nichts bekannt. In einer DNA-Microarray-Untersuchung wurde gezeigt, dass der mRNA-Gehalt von *clpC*, *clpP1* und *clpP2* nach einem Hitzeschock erhöht ist (Muffler *et al.*, 2002). Da *C. glutamicum* weder CtsR- noch

$\sigma^{32}$ -homologe Proteine kodiert, ist davon auszugehen, dass die *clp*-Genexpression über einen anderen Mechanismus reguliert wird als die für *E. coli* und *B. subtilis* beschriebenen. In *Streptomyces lividans* wird die Expression des *clpP3P4*-Operons, das vermutlich durch Duplikation des *clpP1P2*-Operons entstand, durch den Transkriptionsaktivator PopR kontrolliert (Viala *et al.*, 2000). Die Aktivität von PopR wird durch konditionale Degradation durch eine Clp-Protease reguliert, wobei insbesondere zwei C-terminale Alanin-Reste für die Degradation essentiell sind (Viala and Mazodier, 2002).

Zur Analyse des Substratspektrums der Clp-Protease aus *C. glutamicum* und zur Identifikation der durch die Clp-Protease regulierten physiologischen Prozesse wurden bereits globale Proteom- und Transkriptomanalysen von *clp*-Mutanten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration der Proteine ClpP1 und ClpP2 und dem entsprechenden Transkript in einer  $\Delta clpC$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war. Da die Menge anderer genereller Stress-Proteine unverändert war, ist dieser Effekt nicht auf die Induktion einer generellen Stress-Antwort zurückzuführen. Zur Identifikation eines putativen regulatorischen Proteins wurde die *clpP1P2*-Promotorregion mit einem Biotin-„Tag“ amplifiziert, an Dynabeads® Streptavidin immobilisiert und eine Affinitätsreinigung mit Proteinextrakten von *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clpC$ -Mutante durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich aus der  $\Delta clpC$ -Mutante, nicht aber aus dem Wildtyp, ein Protein zu reinigen, das ClgR (*clp* gene regulator) genannt wurde. ClgR hat eine molekulare Masse von 11,3 KDa und weist ein zentrales Helix-Turn-Helix-Motiv auf, welches vermutlich für seine DNA-bindende Aktivität verantwortlich ist (Engels *et al.*, 2004b).

## Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen ClgR, ClpC und der *clpP1P2*-Expression zu klären und möglicherweise weitere durch ClgR regulierte Gene zu identifizieren. Dazu sollten zunächst die mRNA-Mengen der *clp*-Gene in verschiedenen Stämmen mittels Primer-Extension-Analysen verglichen werden. Durch DNase-I-Footprint-Experimente sollte die Bindestelle von ClgR identifiziert und zur bioinformatischen Suche des Genoms nach weiteren putativen Mitgliedern des ClgR-Regulons genutzt werden. Auch für diese sollte die Bindung von ClgR an die entsprechenden Promotor-Regionen experimentell nachgewiesen werden. Weiterhin sollte die Frage untersucht werden, wie die Aktivität von ClgR selbst reguliert wird. ClgR konnte mittels DNA-Affinitätschromatographie mit der Promotorregion von *clpP1P2* nur aus der  $\Delta clpC$ -Mutante gereinigt werden. Die Aktivität von ClgR könnte auf der Ebene der Transkription oder

der mRNA-Stabilität, durch Veränderung der DNA-bindenden Eigenschaften oder eine erhöhte ClgR-Halbwertszeit, reguliert werden. Deshalb sollte zum einen die mRNA-Menge von *clgR* im *C. glutamicum* Wildtyp und in der  $\Delta clpC$ -Mutante verglichen und zum anderen die Stabilität von ClgR in den verschiedenen Stämmen überprüft werden. Falls die Aktivität von ClgR durch seine Degradation reguliert wird, wie für die Transkriptionsregulatoren der *clp*-Gene aus anderen Organismen gezeigt (CtsR,  $\sigma^{32}$  und PopR), sollten auch Untersuchungen zum Degradationsmotiv im ClgR-Protein durchgeführt werden.

### III MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie (Seelze), Roth (Karlsruhe), Amersham Pharmacia (Freiburg) und Difco (Detroit, USA) verwendet. Die Chemikalien entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Chemikalien anderer Hersteller sind gesondert vermerkt. Biochemikalien und Enzyme, inklusive der zugehörigen Puffer, wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Die verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg).

#### 2. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

##### 2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tab. 2:** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Eigenschaft	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	F <i>thi-1 endA1 hsdR17</i> (r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> ) <i>supE44 <math>\Delta</math>lacUI69</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ) <i>recA1 gyrA96 relA1</i> ; Stamm für Klonierungen	(Hanahan, 1985)
BL21(DE3)	F <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> ( $\lambda$ cIts857 <i>ind1</i> Sam7 <i>nin5 lacUV5-T7 gene 1</i> ); Wirtsstamm für die Überproduktion von plasmid-kodierten rekombinanten Proteinen; enthält den lysogenen Phagen $\lambda$ DE3 mit dem T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors	Novagen Inc., Madison, USA
BB1553	MC4100 $\Delta$ <i>dnaK::cat sidB1</i>	(Tomoyasu <i>et al.</i> , 2001)



Fortsetzung Tab. 2

Stamm	Genotyp/Eigenschaft	Referenz
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
$\Delta clpC$	ATCC13032-Derivat mit <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clpC</i>	(Engels <i>et al.</i> , 2004b)
$\Delta clgR$	ATCC13032-Derivat mit <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clgR</i>	(Engels <i>et al.</i> , 2004b)
$\Delta clgR \Delta clpC$	ATCC13032-Derivat mit <i>in-frame</i> -Deletionen von <i>clgR</i> and <i>clpC</i>	(Engels <i>et al.</i> , 2004b)
$\Delta hflX$	ATCC13032-Derivat mit <i>in-frame</i> -Deletion von <i>hflX</i>	Diese Arbeit
$\Delta NCgl0748$	ATCC13032-Derivat mit <i>in-frame</i> -Deletion von <i>NCgl0748</i>	Diese Arbeit
<i>hflX</i> ::pK18- <i>hflX</i> -strep	ATCC13032-Derivat mit einer Integration des Plasmids pK18- <i>hflX</i> -strep in das <i>hflX</i> Gen, das <i>HflX</i> mit einem C-terminalem StrepTag-II kodiert	Diese Arbeit
<i>NCgl0748</i> ::pK18- <i>NCgl0748</i> -strep	ATCC13032-Derivat mit einer Integration des Plasmids pK18- <i>NCgl0748</i> -strep in das <i>NCgl0748</i> Gen, das <i>NCgl0748</i> mit einem C-terminalem StrepTag-II kodiert	Diese Arbeit

## 2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tab. 3 aufgelistet.

**Tab. 3:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pEKEx1	Km <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , lacI <sup>Q</sup> , pBL1 <i>oriV<sub>C.g.</sub></i> , pUC18 <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> Shuttle-Vektor für eine regulierte Genexpression	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pEKEx1- <i>clgR</i> -C	pEKEx1-Derivat kodierend für ein <i>clgR</i> -Derivat mit C-terminalem StrepTag-II	Diese Arbeit
pEKEx1- <i>clgR</i> -N	pEKEx1-Derivat kodierend für ein <i>clgR</i> -Derivat mit N-terminalem StrepTag-II	Diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3

Plasmid	Merkmale	Referenz
pEKEx3	Spec <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , lacI <sup>Q</sup> , pBL1 oriV <sub>C.g.</sub> , pUC18 oriV <sub>E.c.</sub> , C. glutamicum/E. coli Shuttle-Vektor für eine regulierte Genexpression	Eva Radmacher (unveröffentlicht)
pEKEx3-clgR	pEKEx3-Derivat kodierend für mutierte ClgR-Proteine	Diese Arbeit
pET16b	Ap <sup>R</sup> ; P <sub>T7</sub> , lacI, oriV aus pBR322, Vektor zur Überexpression von Genen in E. coli, der das Anfügen eines N-terminalen Tags aus 10 Histidin-Resten ermöglicht	Novagen
pET16b-StrepTag	pET16b-Derivat, zum Anfügen eines N-terminalen StrepTag-II an das synthetisierte Protein	Diese Arbeit
pET16b-clgR-N	pET16b-StrepTag-Derivat für die heterologe Überproduktion von ClgR mit N-terminalem StrepTag	Diese Arbeit
pET24b	Km <sup>R</sup> ; lacI, P <sub>T7</sub> , oriV <sub>E.c.</sub> , Vektor zur Überexpression von Genen in E. coli, der das Anfügen eines C-terminalen Tags aus 6 Histidinresten ermöglicht	Novagen
pET24b-StrepTag	pET24b-Derivat, zum Anfügen eines C-terminalen StrepTag-II an das synthetisierte Protein	Meyer und Bott (unveröffentlicht)
pET24b-clgR-C	pET24b-StrepTag-Derivat für die heterologe Überproduktion von ClgR mit einem C-terminalen StrepTag-II	Diese Arbeit
pJC1	Km <sup>R</sup> , pBL1 oriV <sub>C.g.</sub> , pACYC177 oriV <sub>E.c.</sub> E. coli/C. glutamicum Shuttle-Vektor	(Cremer <i>et al.</i> , 1990)
pJC1-clpCΔ533-932	pJC1-Derivat mit der regulatorischen Region von clpC und clpCΔ533-932	Diese Arbeit
pJC1-Pgap-tetR	pJC1-Derivat mit P <sub>gap</sub> vor tetR	Steffen Schaffer
pJC1-P <sub>gap</sub> -tetR-P <sub>tac</sub> -clgR	pJC1-Pgap-tetR-Derivat mit clgR unter Kontrolle von P <sub>tac</sub> zur regulierten clgR-Expression	Diese Arbeit
pK18mob	Km <sup>R</sup> , oriT <sub>E.c.</sub> , lacZα, mobilisierbarer E. coli-Vektor	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18-hflX-strep	pK18mob-Derivat für die chromosomale Addition einer StrepTag II-kodierenden Sequenz an hflX	Diese Arbeit
pK18-NCgl0748-strep	pK18mob-Derivat für die chromosomale Addition einer StrepTag II-kodierenden Sequenz an NCgl0748	Diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3

Plasmid	Merkmale	Referenz
pK19mobsacB	Km <sup>R</sup> ; pK18 <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>sacB</i> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletions-Mutanten von <i>C. glutamicum</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19ms- $\Delta$ <i>hflX</i>	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 900 bp-Fragment mit den flankierenden Bereichen des <i>C. glutamicum hflX</i> -Gens	Diese Arbeit
pK19ms- $\Delta$ <i>NCgl0748</i>	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1,1 kb-Fragment mit den flankierenden Bereichen des <i>C. glutamicum NCgl0748</i> - Gens	Diese Arbeit
pWK0	Km <sup>R</sup> ; <i>oriC<sub>C.g.</sub></i> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , mobilisierbarer <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor mit niedriger Kopienzahl (3-4)	(Reinscheid <i>et al.</i> , 1994)
pWK0-P <sub>clpC</sub> - <i>lacZ</i>	pWK0-Derivat mit P <sub>clpC</sub> vor <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pWK0-P <sub>clpP</sub> - <i>lacZ</i>	pWK0-Derivat mit P <sub>clpP</sub> vor <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pWK0-P <sub>hflX</sub> - <i>lacZ</i>	pWK0-Derivat mit P <sub>hflX</sub> vor <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pWK0-P <sub>NCgl0748</sub> - <i>lacZ</i>	pWK0-Derivat mit P <sub>NCgl0748</sub> vor <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pWK0-P <sub>ptrB</sub> - <i>lacZ</i>	pWK0-Derivat mit P <sub>ptrB</sub> vor <i>lacZ</i>	Diese Arbeit
pXMJ19	Cm <sup>R</sup> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> aus pK18, <i>oriV<sub>C.g.</sub></i> aus pBL1, <i>lacI<sup>q</sup></i> , P <sub><i>tac</i></sub> <i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor für eine regulierte Genexpression	(Jakoby <i>et al.</i> , 1999)
pXMJ19- <i>clgR</i>	pXMJ19-Derivat mit <i>clgR</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Steffen Schaffer

### 2.3 Oligonukleotide

Die zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgelistet.

**Tab. 4:** Sequenzen der Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung dargestellt. Restriktionsschnittstellen, die mit Hilfe der Oligonukleotide eingeführt wurden, sind unterstrichen, komplementäre Sequenzen sind kursiv und Sequenzen zur Integration des C-terminalen StrepTag-II sind fett gedruckt.

Name	Sequenz
PCR-Primer	
clpP-activator-fw	TTC GGT GAA GAA GAA GTA GCT GAG AC

## Fortsetzung Tab. 4

Name	Sequenz
PCR-Primer	
clpP-activator-rv	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCA TGC GCT CAC TCA GGA GGC G
PclpC-ClgR	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCC CTC TCG AAC ATG TCT CTC CCC
clpC -BS1-fw	CCT GAA CAC GGC AAG GGT ACC TC
clpC -BS2-rv	GCG TGC ACG ATC GGT AAA CCT CTC
OE-ClgR-fw	TAT <u>ACA TAT GGT</u> TAC TTA TAC AAC CCT TCT AGA C ( <i>NdeI</i> )
OE-ClgR-CT-rv	TATACT <u>CGA GGA</u> CGC GAG CGA GGT CTT CCT G ( <i>XhoI</i> )
OE-ClgR-NT-rv	TAT <u>ACT CGA GTT</u> AGA CGC GAG CGA GGT CTT CCT G ( <i>XhoI</i> )
StreptagII-fw	CAT GGC TAG <i>CTG GAG CCA CCC GCA GTT CGA AAA AGG CGC CCA</i>
StreptagII-rv	TAT GGG CGG <i>CTT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC</i> AGC TAG C
pEK-clgR-fw	TTA <u>CGA ATT CGA</u> GCG GAT AAC AAT TCC CCT CTA ( <i>EcoRI</i> )
pEK-clgR-rv	TCG <u>CGT CGA CAT</u> GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG ( <i>SalI</i> )
clpC-HOE-fw-2	TAT <u>ATC TAG ACC</u> TGA ACA CGG CAA GGG TAC C ( <i>XbaI</i> )
OE- clpC -rv-3	TAT <u>AGT CGA CTC</u> ATT CTT CTT CCA ATC CTT CTT CCA TGT TGA GCA GGT CTG AAG ( <i>SalI</i> ) <sup>2</sup>
RT-clgR-fw	CTT ATA CAA CCC TTC TAG ACA AGC CG
RT-clgR-rv	TCT TCC TGC GCT GCT TGC AGC
RT-dnaE-fw	TGC CCT TCC GGC GAT GTG CAA
RT-dnaE-rv	CTG GAA CCA TGT CGT CCC AGA G
Delta hflX-1	GGG <u>TCC CGG GAG</u> GAT CGA TGA TAT CGA CCA GGG A( <i>XmaI</i> )
Delta hflX-2	<i>CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GTT TTT CTT TTC ATC CAT TGT TTA TCT ATT GTT TCA C</i>
Delta hflX-3	<i>TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GAG CTG CAG AGT TAC GTT GTA GAA C</i>
Delta hflX-4	TTC <u>ATC TAG AAT</u> CCA ATG GCG ACG AGC ACG A ( <i>XbaI</i> )
hflX-out-fw	AAG CAT CTC ATT GTC GTG GAC C
hflX-out-rv	GAT GAG TGC CAC GAT CGC AC
Delta orf1309-1	GTT <u>GCC CGG GTG</u> TCG GTG AGG ACT TCT GCA AC ( <i>XmaI</i> )
Delta orf1309-2	<i>CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA AAA GCC ATT AGA GTT CAT</i>

Fortsetzung Tab. 4

Name	Sequenz
<b>PCR-Primer</b>	
	ATT TAC CAA TCT AC
Delta orf1309-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GAG GAC GAC GGT TCT GAA GGA A
Delta orf1309-4	CTC <u>GTC TAG AGG</u> ACG GGC AAA TCC AGG TGC ( <i>Xba</i> I)
orf1309-out-fw	TCG CAC GAT GGT TTG TGC ATC G
orf1309-out-rv	TGA GGT CAT CCG TTC AGC GAA AC
Strep-hflX-fw	TAT <u>AGC ATG CGT</u> CGT GTT CAC GGA CAC CGT C ( <i>Sph</i> I)
Strep-hflX-rv	TAT <u>AAA GCT TTT ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC</u> AGG CAG AGG TGG GTT CTA CAA CG( <i>Hind</i> III)
Strep-orf1309-fw	TAT <u>AGC ATG CAC</u> ACC TCA CAC ATC CAA GAG G ( <i>Sph</i> I)
Strep-orf1309-rv	TAT <u>AAA GCT TTT ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC</u> AGT TCT TGT CGG AGG TTC CTT CAG ( <i>Hind</i> III)
FP-orf1309-fw	GTC AAT GCT TAC CAA CGA TGC CAG
FP-orf1309-rv2	ATG CGT GCT GCT AAA TCA TAA TTA ACC GG
FP-orf1309-fw4	GGC ATA AGG CAC GCT CAA GTT G
FP-1308-fw1	TCA ACG ATC GGT CGG GCG GT
FP1308-rv1	TGC CCG TCC ACA ATT CGA GCT TG
FP-hflX-fw1	GCC ACT TGG CGA AAT CCA TAC CG
FP-hflX-rv1	GTG ACC GCG GAA GGC CTG A
FP-dapB-fw1	GCG TCT AAG CTG CTT GAT TTT CCC TA
FP-dapB-rv1	CAG TCT CCT GCT TGG TGA ACG C
recN-fw	GGT CCG CAA AAA CAG GCG GAA
recN-rv	CAA CAG CTT GAG GGG ATC CTG T
P-recK-fw	TCA GGA ACT CGG CGC GAA AC
recX-rv	TGC CGG CCA TAG TGA CGG TAA C
FP-recR-fw	CAT AAC AAG GTC GCA AAC GTT GC
FP-recR-rv	GAA ATG CGA TGC GTT GGG CAC TT
FP-uvrA-fw	GCA TCT TCG GCT AAT TTA AGT AGT GC
FP-uvrA-rv	CAT CGA GTC GCG TGG CAA ATC A
clgR-fw-pXMJ19-4	TAT <u>AGC CGG AAG GGC</u> CTG TGC AGG TCG TAA ATC ACT GCA ( <i>Bgl</i> II)

Fortsetzung Tab. 4

Name	Sequenz
<b>PCR-Primer</b>	
clgR-rv- pXMJ19-3	TAT <u>AAG TAC TTG</u> CTT TTC GAC GCC CAC CCA T ( <i>ScaI</i> )
SC-clgR-rv	TAT <u>AGA GCT CTT</u> ACT GCT TTT CGA CGC CCA CC ( <i>SacI</i> )
SC-clgR-fw3	TAT <u>AGG ATC CAA</u> GGA GAT ATA GAT ATG GTT ACT TAT ACA ACC CTT CTA GAC AA ( <i>BamHI</i> )
SC-lacZ-fw2	TAT <u>ATC TAG ATT</u> CCG GCT CGT ATG TTG TGT GGA ( <i>XbaI</i> )
SC-lacZ-rv2	TAT <u>ACT GCA GGT</u> ACA TAA TGG ATT TCC TTA CGC GAA ATA CG ( <i>PstI</i> )
SC-clpP-fw	TAT <u>AGG ATC CGC</u> TTT TCG ACG CGC CAC TGG ( <i>BamHI</i> )
SC-clpP-rv2	TAT <u>ATC TAG ACT</u> CCT ACA TTC TTA AAT CTT GGG T ( <i>XbaI</i> )
SC-clpC-fw	TAT <u>AGG ATC CAC</u> GGC AAG GGT ACC TCA ATT GCT ( <i>BamHI</i> )
SC-clpC-rv2	TAT <u>ATC TAG ACT</u> CGA ACA TGT CTC TCC CCT TA ( <i>XbaI</i> )
SC-orf1309-fw	TAT <u>AGG ATC CCG</u> TCA GAG TCT TGA TTC GGC GA ( <i>BamHI</i> )
SC-orf1309-rv2	TAT <u>ATC TAG AGA</u> GAA ACC AAA GCC ATT AGA GTT CAT ( <i>XbaI</i> )
SC-dapB-fw	TAT <u>AGG ATC CTG</u> CTT GAT TTT CCC TAA ACC C ( <i>BamHI</i> )
SC-ptrB-rv2	TAT <u>ATC TAG AGT</u> TCA GAC ATA GCC CCC GAT C ( <i>XbaI</i> )
SC-hflX-fw	TAT <u>AGG ATC CGC</u> GTT GAT GGA ATA GAG CGC TC ( <i>BamHI</i> )
SC-hflX-rv2	TAT <u>ATC TAG AGT</u> GAC CGC GGA AGG CCT GA ( <i>XbaI</i> )
<b>Primer für Dynabead Affinitätsreinigung</b>	
Biotinprimer 1	Biotin-GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC
Biotin-dapB1	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCC AGT CTC CTG CTT GGT GAA CGC
Biotin-orf1309	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCC ACC TTG TCC TCC GAA TCC
Biotin-hflX	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCG TGA CCG CGG AAG GCC TGA
Biotin-recK	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCT GCC GGC CAT AGT GAC GGT A
recN-rv-Biotin	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CCA ACA GCT TGA GGG GAT CCT GT

Fortsetzung Tab. 4

Name	Sequenz
Primer mit 5'-IRD 800-Markierung	
clpC -PE2	CGC CTC TTC CTG CGC GAG CAC A
clpC -PE3	GGT AAA CCT CTC GAA CAT GTC
clpP-PE1	ACG TCA TTT CCG AAA CCA GGC CCA C
clpP-BS1-rv	TGC GCT CAC TCA GGA GGC GAT CAA AG
clpC -BS1-rv	GCG TGC ACG ATC GGT AAA CCT CTC
clpC -BS2-fw	CCT GAA CAC GGC AAG GGT ACC TC
clpP-FP4	GCT TTT CGA CGC GCC ACT GG
orf1309-PE	GCC ACC TTG TCC TCC GAA TCC
FP-orf1309-fw3	GGC ATA AGG CAC GCT CAA GTT G
FP-orf1309-rv	ATG CGT GCT GCT AAA TCA TAA TTA ACC GG
FP1308-fw2	TCA ACG ATC GGT CGG GCG GT
FP1308-rv2	TCA ACG ATC GGT CGG GCG GT
FP-hflX-fw2	GCC ACT TGG CGA AAT CCA TAC CG
FP-hflX-rv2	GTG ACC GCG GAA GGC CTG A
PE-hflX-3	TGC GCC CAG GAT CTG ACG AG
FP-dapB-fw2	GCG TCT AAG CTG CTT GAT TTT CCC TA
FP-dapB-rv2	CAG TCT CCT GCT TGG TGA ACG C
PE-dapB1-2	GAC AAC TAT GAA TGG CTG AGG GAT
recN-fw-IRD	GGT CCG CAA AAA CAG GCG GAA
recN-rv-IRD	CAA CAG CTT GAG GGG ATC CTG T
PE-recN-1	CTG GAA TAA CTC CGA GGT TCT CA
recX-IRD-2	TAG TTG AGC CTG CAT CTG CTG AG
FP-orf650-fw-IRD800	TGG ATC GTC GTG ATG CGA AAA CC
PE-orf650-1	GCG AGG ATC TGG GAC ATA TCT G
PE-orf650-1	GCG AGG ATC TGG GAC ATA TCT G
FP-recR-fw-IRD800	CAT AAC AAG GTC GCA AAC GTT GC
FP-recR-rv-IRD800	GAA ATG CGA TGC GTT GGG CAC TT
PE-recR-1	GAC GAG AAA GTT CGT CGA TGA GA

Fortsetzung Tab. 4

Name	Sequenz
Primer mit 5'-IRD 800-Markierung	
FP-uvrA-fw-IRD800	GCA TCT TCG GCT AAT TTA AGT AGT GC
FP-uvrA-rv-IRD800	CAT CGA GTC GCG TGG CAA ATC A
PE-uvrA-1	CCT TTT AGG TTA TGT TCA CGC GCT

### 3. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

#### 3.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Luria-Bertani- (LB-) Medium (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Regeneration der Zellen nach Transformationen wurde SOC-Komplexmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

*C. glutamicum* wurde in dem Komplexmedium *Brain-Heart-Infusion* (BHI, von Difco) mit 0,5 M Sorbitol oder LB-Medium mit 4 % (w/v) Glucose bzw. dem Minimalmedium CGXII mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert. Nach Elektroporation wurden die Zellen in BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) regeneriert und auf BHIS-Platten ausgestrichen.

Zusammensetzung der Kulturmedien (Endkonzentration):

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 580 mg/l NaCl, 186 mg/l KCl, nach dem Autoklavieren wurden je 10 ml/l einer 2 M Glucoselösung und einer 2 M Magnesiumsalzlösung (1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 M MgSO<sub>4</sub>, sterilfiltriert) zugegeben

CGXII-Medium: 20 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/l Harnstoff, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,25 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 10 mg/l CaCl<sub>2</sub>, 42 g/l MOPS, pH 7 mit KOH eingestellt, nach dem Autoklavieren wurden 0,2 mg/l Biotin, 1 ml/l Spurensalzlösung, 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l in verd. NaOH gelöst) und 40 g/l Glucose zugegeben

Spurensalzlösung: 10 g/l FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 10 g/l MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 1 g/l ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 20 mg/l NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, zum Lösen angesäuert (pH 1)

Für die Vorkultur von *E. coli* wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und



über Nacht bei 37°C (DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3)) bzw. 30°C (BB1553) und 170 rpm kultiviert. Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte in 500-ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen, die 50-100 ml Medium enthielten und bei 130 rpm geschüttelt wurden. Für die Kultivierung von *C. glutamicum* in Komplexmedium wurden abends 20 ml Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C und 130 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur, bestehend aus 50-100 ml Medium in einem 500-ml-Erlenmeyerkolben, wurde morgens auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5-1 angeimpft. Zur Kultivierung in Minimalmedium wurden morgens 5 ml Komplexmedium in einem Reagenzglas angeimpft und über Tag bei 30°C und 150 rpm kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und zum Animpfen einer Übernachtkultur in CGXII-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 genutzt. Die Hauptkulturen in CGXII-Medium wurden am nächsten Morgen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5-1 angeimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 3-6 in der exponentiellen Phase geerntet. Zur Gewinnung größerer Mengen Biomasse von *C. glutamicum* für eine nachfolgende Proteinreinigung wurden 5-l-Erlenmeyerkolben mit 800 ml LB-Medium verwendet.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Für die selektive Kultivierung wurden die autoklavierten Medien nach dem Abkühlen mit den in Tab. 5 angegebenen Antibiotika versetzt.

**Tab. 5:** Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Kanamycin	50 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml bzw. 25 $\mu$ g/ml
Ampicillin	100 $\mu$ g/ml	-
Chloramphenicol	34 $\mu$ g/ml bzw. 25 $\mu$ g/ml (BB1553)	10 $\mu$ g/ml
Anhydrotetracyclin	-	0,2 $\mu$ g/ml
Spektinomycin	100 $\mu$ g/ml	250 $\mu$ g/ml

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 3 ml/l einer 0,1 M IPTG-Lösung (sterilfiltriert) und 4 ml einer 2 %igen (w/v) X-Gal-Lösung (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid in N,N-Dimethylformamid) zugesetzt.

### 3.2 Stammhaltung

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 25 ml einer LB-Übernacht-Kultur abzentrifugiert (10 min, 5200 x g, 4°C) und die Zellen in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml sterilem Glycerin (87 %, (v/v)) wurde die Zellsuspension in zwei Cryo-

Röhrchen aufgeteilt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3 Bestimmung der optischen Dichte

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm mit einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer (Pharmacia) verfolgt. Die Kulturen wurden mit Wasser so verdünnt, dass die gemessenen  $\text{OD}_{600}$ -Werte nie größer als 0,3 waren.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), das auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) beruht. Bei *C. glutamicum* wurde die Zellwand vor der eigentlichen Plasmid-Isolierung durch eine Lysozymbehandlung zerstört (Eikmanns *et al.*, 1994). Dazu wurde das Zellpellet in Puffer I resuspendiert, mit 20 mg/ml Lysozym versetzt und der Ansatz eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Isolierung größerer Plasmid-Mengen wurde das Qiagen Plasmid Midi-Kit (ausgehend von 100 ml Übernachtskultur) verwendet.

Chromosomale DNA von *C. glutamicum* wurde nach Eikmanns (Eikmanns *et al.*, 1994) isoliert. Eine 5 ml LB-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert, das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2 % (v/v) Triton X-100, 20 mg/ml Lysozym) resuspendiert und eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Aufschluss der Zellen in Lysispuffer erfolgte eine enzymatische Proteolyse durch Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) SDS und 25  $\mu\text{l}$  Proteinkinase K (20 mg/ml in TE) und 30 min Inkubation bei  $70^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA durch Ethanolfällung aus dem Überstand isoliert. Die präzipitierte DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst.

### 4.2 Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA

Die Reinigung der PCR-Produkte von Oligonukleotiden und überschüssigen Nukleotiden erfolgte in der Regel mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen). Die DNA wurde mit TE-Puffer oder Wasser eluiert. Zur Konzentrierung und Reinigung der IRD800-markierten Sonden wurden diese mit Mikrokonzentratoren Microcon YM-30 (Millipore) eingengt, mit 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und bis zur gewünschten

Konzentration nach den Angaben des Herstellers zentrifugiert. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangabe.

Zur Entfernung von Proteinverunreinigungen wurden die DNA-Proben mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 Volumenanteile, AquaPhenol<sup>TM</sup>, Roth) versetzt, gemischt und 3 min bei 15000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis keine Interphase mehr erkennbar war. Die obere, wässrige, DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Ethanol gefällt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumen eiskaltem Ethanol gemischt. Die präzipitierte DNA wurde durch 30 min Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C sedimentiert, mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer oder Wasser gelöst.

### 4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Extinktion bei 230-280 nm bestimmt. Ein Wert von  $E_{260} = 1$  entspricht 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Die Reinheit der DNA wurde anhand der Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  (Verunreinigung mit Proteinen) und  $E_{260}/E_{230}$  (Verunreinigung mit Kohlenhydraten) bestimmt, welche beide zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten.

### 4.4 Rekombinante DNA-Techniken

Die Restriktion der DNA wurde mit Enzymen von Roche Diagnostics bzw. New England Biolabs gemäß den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Für einen analytischen DNA-Verdau enthielten die 20 µl Ansätze ca. 0,5 µg DNA und 5 U Enzym, für präparative Restriktionsansätze wurde das Volumen auf 100 µl erhöht und 2 µg DNA und 20 U Enzym eingesetzt. Die Ansätze wurden mindestens eine Stunde bei der vorgeschriebenen Temperatur inkubiert. Zur Vermeidung der Rezirkularisierung von linearisierten Plasmiden erfolgte eine Dephosphorylierung durch Zugabe von 0,5 U Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Roche Diagnostics).

Ligationen wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die Ligationszeit wurde jedoch auf mindestens 30 min erhöht.

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch Elektrophorese in 0,8-

2 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA). Zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung wurden die DNA-Standards 100 bp DNA Ladder (Roche) und für größere Fragmente ein 1:1 Gemisch von *Hind*III geschnittener  $\lambda$ -Phagen-DNA (200 ng/ $\mu$ l) und *Hind*III/*Eco*RI geschnittener  $\lambda$ -Phagen-DNA (200 ng/ $\mu$ l) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden für die Elektrophorese mit 5 x Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (w/v) Glycerin) versetzt. Für die Auftrennung wurden Elektrophoresekammern und Stromversorgungsgeräte (PowerPac-300) der Firma BioRad verwendet. Die DNA-Moleküle wurden nach der Auftrennung in den Agarosegelen mit dem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 mg/l) gefärbt (10-30 min), kurz gewässert und unter UV-Licht mit einem ImageMaster VDS-System (Pharmacia) photographiert.

## 4.5 Transformation von Bakterien

### 4.5.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

*E. coli*-Zellen mit hoher Transformationseffizienz nach einem Hitzeschock wurden nach Inoue (Inoue *et al.*, 1990) hergestellt. Dazu wurden 250 ml SOB-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 0,19 g/l KCl, pH 7,0, nach dem Autoklavieren Zugabe von 5 ml 2 M  $\text{MgCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  pro Liter Medium) mit 10-12 Kolonien inokuliert und bei 18°C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 (ca. 24 h) kultiviert. Die Kultur wurde dann 10 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (10 min, 2500 x g, 4°C) und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,25 M KCl, pH 6,8 mit KOH, 55 mM  $\text{MnCl}_2$ , sterilfiltriert) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zell-Pellet vorsichtig in 20 ml TB-Puffer mit 7 % (v/v) DMSO resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und 0,2 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut und mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA bzw. 5  $\mu$ l Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 1 min bei 42°C, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Dann wurden 500  $\mu$ l SOC-Medium zugegeben und der Ansatz zur Synthese der Antibiotika-Resistenzproteine 45-60 min bei 37°C inkubiert. Aliquots davon wurden auf selektiven LB-Platten ausplattiert.

### 4.5.2 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von superkompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest (1999) (van der Rest *et al.*, 1999). Aus einer Übernacht-

Vorkultur in LB-Medium mit 2 % (w/v) Glucose wurde die Hauptkultur in 200 ml EPO-Medium (2 g Trypton, 2 g NaCl, 1 g Hefeextrakt, in 160 ml H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren, 800 mg Isonicotinsäure-Hydrazid, 5 g Glycin und 0,2 ml Tween 80 in 40 ml H<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltrieren und zum Medium geben) auf OD<sub>600</sub> = 0,3 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 18°C für 28 h. Die Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert, die Zellen anschließend dreimal mit eiskaltem 10 %igen Glycerin gewaschen und dann in 2 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert. 200 µl Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden Aliquots der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,25-5 µg Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm; VWR, Darmstadt) gegeben. Der Strompuls mit dem Gene Pulser<sup>TM</sup> (BioRad, Hercules, USA) erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 600 Ω und einer Kapazität von 25 µF. Unmittelbar nach dem Puls wurden 500 µl auf Raumtemperatur erwärmtes BHIS-Medium zugegeben und ein Hitzeschock für 6 min bei 46°C durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde zur Synthese der Antibiotika-Resistenzproteine 1 h bei 30°C geschüttelt und Aliquots auf selektivem BHIS-Medium ausplattiert.

#### 4.6 Konstruktion von Deletionsmutanten

Die Erzeugung von Deletionsmutanten erfolgte durch eine Kombination von "Crossover"-PCR (Link *et al.*, 1997) mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994), der in *C. glutamicum* nicht repliziert (Niebisch and Bott, 2001). Für die „Crossover“-PCR wurden zunächst zwei etwa 500 bp große PCR-Produkte hergestellt, die den 5'-flankierenden Bereich des zu deletierenden Gens inklusive der ersten 6 Codons (Primer Delta-...-1 und Delta-...-2) bzw. den 3'-flankierenden Bereich inklusive der letzten 12 Codons (Primer Delta-...-3 und Delta-...-4) des zu deletierenden Gens umfassten. Die äußeren Primer enthielten die Restriktionsschnittstellen *Xma*I (Delta-...-1) bzw. *Xba*I (Delta-...-4), die zur Klonierung in pK19*mobsacB* genutzt wurden und die inneren Primer (Delta-...-2, Delta-...-3) enthielten eine 21 bp lange komplementäre Sequenz. Die beiden so gebildeten PCR-Produkte wurden in eine zweite PCR mit den äußeren Primern eingesetzt. Das entstandene Fusionsprodukt wurde gereinigt, verdaut und in den entsprechend verdauten Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Nach Transformation von *C. glutamicum* und Selektion auf BHI-Platten mit Kanamycin wurden Klone isoliert, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination im Bereich des zu deletierenden Gens in das Chromosom integriert worden war. Um auf eine zweite Rekombination zu selektionieren, wurden die kanamycinresistenten Klone 12 h in LB + 4 %

Glucose (ohne Kanamycin) kultiviert und anschließend 100 µl einer 1:100 Verdünnung auf BHI-Platten mit 10 % Saccharose ausplattiert. Bei Anwesenheit von Levansucrase, dem Produkt des *sacB*-Gens, sind 10 % Saccharose im Medium letal. Entsprechend sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch einen zweiten Rekombinationsschritt wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein, wodurch entweder die Wildtypsituation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt wurde. Saccharoseresistente und gleichzeitig kanamycinsensitive Klone wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern hflX-out-fw/hflX-out-rv bzw. orf1309-out-fw/orf1309-out-rv überprüft.

#### 4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur in vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten, zur Kontrolle von Transformanten, Insertions- und Deletionsmutanten wurde die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, (Mullis and Faloona, 1987)) eingesetzt. Die Reaktionen wurden als 100 µl Ansätze in einem Mikroreaktionsgefäß (PCR-Softstrips 0,2 ml, Biozym, Oldendorf) angesetzt und in einem Thermo-Cycler (Primus 25 bzw. 96 plus von MWG Biotech) durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur wurde so gewählt, dass sie 3 – 6°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur ( $T_M = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ ) der verwendeten Oligonukleotide lag. Der Zeitraum der DNA-Kettenverlängerung variierte in Abhängigkeit von der Größe des zu amplifizierenden Fragments. Routinemäßig wurde 1 min pro 1000 Basen berechnet. Das Standard-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung (5 min, 95°C), 30 Zyklen mit Denaturierung (30 s, 95°C), Primer-Anlagerung (30 s,  $T_M-5^\circ\text{C}$ ) und Primer-Verlängerung (1 min pro 1 kb, 72°C), sowie einer abschließenden Primer-Verlängerung (5 min, 72°C). Die eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	1 µg
dNTP-Mix	je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligonukleotide (fw/rv)	je 40 pmol
10 x Puffer	10 µl
DNA-Polymerase	1 µl (5 U)
H <sub>2</sub> O (steril)	ad. 100 µl

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung verwendet wurden und zur Herstellung der Sonden für DNase I-Footprint-Versuche, wurde der Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) genutzt, der durch die Kombination von *Taq*-DNA-Polymerase mit einer fehlerkorrigierenden *Pwo*-DNA-Polymerase eine geringere Fehlerrate

bewirkt (Barnes, 1994). Für analytische PCR wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Zur Kontrolle von *C. glutamicum*-Mutanten wurden einzelne Kolonien in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, 10 min auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 5 µl dieser Suspension als Matrize in 20-µl-PCR-Ansätzen (analog zur Standard-PCR) eingesetzt.

#### 4.8 Zufallsmutagenese

Die Einführung von zufälligen Mutationen erfolgte mit dem Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech, Palo Alto, USA) nach dem Protokoll des Herstellers. Dieses Kit beruht auf der Einführung von Mutationen durch Fehler der *Taq*-Polymerase. Durch Variation der Mangankonzentration des Puffers und der dGTP-Konzentration war es möglich, die Bedingungen so einzustellen, dass nach der Amplifikation 0-1 Mutation in dem Zielgen *clgR* vorlag. Die Anzahl der Mutationen wurde jeweils durch Sequenzierung von *clgR* aus 6-10 verschiedenen Klonen überprüft. Deshalb wurde Ansatz 4 (37 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl 10 x Puffer, 3 µl MnSO<sub>4</sub> (8 mM), 1 µl dGTP (2 mM), 1 µl diversify dNTPs, je 0,4 µl Primer (100 pmol/µl), 1 µl Template (1 ng/µl) und 1µl *Taq*-Polymerase (20 U/µl)) ausgewählt.

#### 4.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem Thermosequenz fluoreszent sequencing Kit (Pharmacia) und dem Li-Cor 4200 DNA-Sequenziergerät (MWG Biotech) nach Angaben der Hersteller. Die verwendeten Oligonukleotide waren am 5'-Ende IRD800 markiert.

Die Auftrennung erfolgte in einem 4,6 %igen Sequenziergel (21 g Harnstoff, 5 ml 10 x TBE (890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, sterilfiltriert), 4,6 ml Long-Ranger-Polyacrylamid-Lösung (Biozym), 500 µl DMSO, 32 ml H<sub>2</sub>O, 50 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 350 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)). Die Elektrophorese wurde bei 2200 V, 37 mA, 50 W und 45°C mit 1 x TBE durchgeführt.

Zum Editieren der Sequenzdaten, zur Analyse von Restriktionsschnittstellen, offenen Leserahmen sowie zur Erstellung von Plasmidkarten wurde das Programm Clone Manager für Windows (Version 5.02, Scientific & Educational Software, Durham, USA) genutzt. Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Protein-Sequenzhomologien erfolgten mit den Programmen BLASTN, BLASTP und BLAST2 des National Center of Biotechnology Information (NCBI, Washington) und der Bioinformatik-Software ERGO (Integrated Genomics Inc., Chicago, USA). Sequenzalignments wurden mit ClustalW 1.8 (Thompson *et*

al., 1994) erstellt und identische bzw. ähnliche Aminosäuren mit dem BOXSHADE-Programm von K. Hoffmann und M. D. Baron markiert.

## 5. Biochemische Methoden

### 5.1 Zellaufschluss und Fraktionierung

Für die StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde *C. glutamicum* in 100 ml (bei Überproduktion) bzw. 800 ml (chromosomale Expression) LB-Medium mit 4 % (w/v) Glucose und *E. coli* in 100 ml LB-Medium kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5200 x g, 4°C) geerntet, mit einem Kulturvolumen 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 gewaschen und in 10 ml dieses Puffers mit 100 µl eines Proteaseinhibitor-Mix aus Diisopropylfluorophosphat und Phenylmethylsulfonylfluorid (je 100 mM DFP und PMSF in Ethanol) und einer Spatelspitze DNase I aufgenommen. Sollte das Protein später für DNase I-Footprint-Versuche eingesetzt werden, wurde keine DNase I zugesetzt.

Für die Affinitätsreinigung mittels DNA-beladener Dynabeads wurden die Zellen aus 800 ml Kultur mit 200 ml TGED-Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,01 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 10 ml TGED-Puffer mit 100 µl Proteaseinhibitor-Mix (100 mM PMSF und DFP) aufgenommen.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer French-Press-Zelle (SLM Aminco<sup>®</sup> Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei 108 MPa (*E. coli*) bzw. 172 MPa (*C. glutamicum*). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 5200 x g (Expressionskulturen) bzw. 60 min bei 18000 x g (Affinitätsreinigung mit Dynabeads) sedimentiert. Der Überstand wurde 1 h bei 150.000 x g ultrazentrifugiert. Für Versuche mit der Membranfraktion (Lokalisation Strep-getaggtter Proteine) wurden die sedimentierten Membranen nach der Ultrazentrifugation einmal in dem entsprechenden Puffer gewaschen.

Der Aufschluss der Zellen aus je 60 – 100 ml Kultur für Proteomanalysen erfolgte in 1 ml TE-Puffer (100 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) mit 40 µl Proteaseinhibitor (je 100 mM DFP und PMSF in Ethanol) und 100 µl RNase A/DNase I-Lösung (1 mg/ml DNase I, 0,25 mg/ml RNase A in 50 mM MgCl<sub>2</sub>) mechanisch mit 1 g Zirkonium-/Silica-Perlen (d = 0,1 mm, Roth). Die Reaktionsgefäße wurden mit Parafilm abgedichtet und die Zellen für 4 x 30 s in einem Amalgamator (Silamat S5, Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 min, 15.000 x g, 4°C) abgetrennt und die



Membranen durch Ultrazentrifugation (1 h, 150.000 x g, 4°C) sedimentiert.

## 5.2 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Bicinchoninsäure-Methode (Smith *et al.*, 1985) mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Als Standard wurde Rinder-Serumalbumin verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit dem BCA-Reagenz versetzt, 30 min bei 37°C inkubiert und vor der Messung der Extinktion bei 562 nm auf Raumtemperatur abgekühlt.

## 5.3 Proteinreinigung

Proteine mit einem StrepTag II (Sequenz: WSHPQFEK) wurden durch Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose gereinigt (Skerra and Schmidt, 2000). Die cytosolische Proteinfraction wurde zunächst zur Absättigung biotinylierter Proteine mit Avidin-Lösung (5 mg/ml, aus Hühnereiweiß, Sigma, Seelze) versetzt (für *C. glutamicum* 10 µl, für *E. coli* 2 µl) und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Säule mit StrepTactin-Sepharose (2 ml Bettvolumen, IBA, Göttingen) gegeben, die zuvor mit 5 ml 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8, äquilibriert worden war. Nach Waschen mit 5 x 2 ml 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8 (für *C. glutamicum* 5 x 10 ml) wurde spezifisch gebundenes Protein mit 6 x 1 ml 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin (Sigma, Seelze), 100 mM NaCl, pH 8 eluiert. Zur Co-Reinigung von Proteinen, die mit dem streptagtagten Protein einen Komplex bilden, wurde dem Elutionspuffer kein NaCl zugesetzt. Die Säule wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 ml 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8, 1 mM 4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure (HABA) und zweimaliges Waschen mit je 8 ml dieses Puffers ohne HABA regeneriert und bei 4°C gelagert.

Um das gereinigte Protein besser für weitere Versuche einsetzen und lagern zu können, wurde es durch Gelfiltration mit Sephadex G-25 (PD-10-Säule, Amersham Pharmacia, Freiburg) in 10 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8 umgepuffert. Dazu wurde die Säule zunächst mit dem genannten Puffer äquilibriert und anschließend 2 ml Proteinlösung gefolgt von 0,5 ml Puffer auf die Säule gegeben. Das Protein wurde in mehreren Fraktionen mit insgesamt 3,5 ml Puffer eluiert und konnte so bei – 20°C gelagert werden. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer gewaschen und bei 4°C gelagert.

## 5.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

### 5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (Schägger and von Jagow, 1987). Im allgemeinen wurden 10 %ige oder 16,5 %ige Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel genutzt (MiniProtean-II-Apparatur, Biorad, München).

**Tab. 6:** Zusammensetzung der SDS-Gele nach Schägger und von Jagow

	Sammelgel 4 %ig	Trenngel 10 %ig	Trenngel 16,5 %ig
30 % Acrylamid/Bis-acrylamid (w/v; 37,5/1)	0,4 ml	3 ml	4,95 ml
dH <sub>2</sub> O	1,6 ml	3 ml	1,05 ml
3 x Gelpuffer (3 M Tris, pH 8,45, 0,3 % (w/v) SDS)	3 ml	3 ml	3 ml
10 % (w/v) APS	3 µl	5 µl	5 µl
TEMED	30 µl	50 µl	50 µl

Die Proben wurden mit 4 x Probenpuffer (150 mM Tris, pH 7, 12 % (w/v) SDS, 6 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Proteingrößenstandard wurden der Perfect Protein Marker, 10-225 kDa (Novagen, Madison, USA) bzw. der Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard (Biorad, Hercules, USA) und bei einem anschließenden Western-Blot der SeeBlue<sup>®</sup> Pre-Stained Standard (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Der Anodenpuffer setzte sich aus 100 mM Tris-HCl, pH 8,9 und der Kathodenpuffer aus 100 mM Tris, 100 mM Tricine und 1 % SDS (pH uneingestellt bei ca. 8,25) zusammen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel bis die Proben ins Sammelgel eingewandert waren und wurde dann auf 60 mA pro Gel erhöht. Die Spannung war auf 150 V limitiert.

### 5.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgt die Trennung von Proteingemischen in der ersten Dimension mittels eines immobilisierten pH-Gradienten (18 cm Immobiline DryStrip, pH 4-7 oder pH 4,5-5,5, Amersham Pharmacia, Freiburg), der zur Anordnung der Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes führt. In der zweiten Dimension werden die Proteine in einer SDS-PAGE nach ihrer Größe separiert. Alle verwendeten Materialien und

Apparaturen stammten von Amersham Pharmacia (Freiburg). Für die isoelektrische Fokussierung wurden 300 µg Protein mit 9 Volumen Aceton über Nacht bei -20°C gefällt. Die Proteine wurden abzentrifugiert (10 min, 15.200 x g, 4°C), das Pellet luftgetrocknet und dann in 350 µl Solubilisierungspuffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) DTT, 1 % Pharmalyte 3-10NL) gelöst (Schaffer *et al.*, 2001). Nachdem die Proteinlösung gleichmäßig in dem Keramikschiffchen verteilt, der entsprechende IPG-Streifen luftblasenfrei aufgelegt und mit 2 ml Immobiline DryStrip Cover Fluid überschichtet worden war, erfolgte die Fokussierung in einem IPGphor-Gerät mitfolgenden Parametern: 5 h 30 V, 5 h 60 V, 1 h 200 V, 1 h 500 V, 1 h 2000 V, linearer Gradient innerhalb 30 min auf 8000 V, 22,5 h 8000 V bis ca. 200 kVh. Danach wurden die IPG-Streifen entweder direkt für die zweite Dimension äquilibriert oder bei -20°C gelagert. Als Vorbereitung für die zweite Dimension wurde der IPG-Streifen zunächst für 20 min in 10 ml Äquilibrierungslösung A (Äquilibrierungsstammlösung: 50 mM Tris, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS mit 10 mg/ml DTT und 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v))) und anschließend 20 min in 10 ml Äquilibrierungslösung B (Äquilibrierungsstammlösung mit 40 mg/ml Iodacetamid und 100 µl Bromphenolblau-Lösung) geschüttelt. Die Auftrennung nach der Größe erfolgte mit einem Fertiggel (ExcelGel SDS Gradient XL 12-14 %, Trennungsbereich ca. 5 bis 210 kDa) unter Verwendung des Horizontalgel-Systems Multiphor II. Die Kühlplatte wurde mit Cover Fluid benetzt und das Fertiggel luftblasenfrei aufgelegt. Anoden- und Kathoden-Pufferstreifen (ExcelGel SDS Buffer Strips) wurden ebenfalls luftblasenfrei an die äußere Begrenzung der Gele gelegt. Der IPG-Streifen wurde nach der Äquilibrierung kurz mit Wasser abgespült und 2 mm unterhalb des Kathoden-Pufferstreifens platziert. Auf gleicher Höhe wie der Gelstreifen wurde ein feuchtes Filterpapier mit 10 µl Protein-Größenstandard gelegt. Zunächst erfolgte die Elektrophorese bei 100 V, 50 W und 20 mA pro Gel für 45 min. Dann wurden Filterpapier und Gelstreifen entfernt und die Elektrophorese bei 800 V, 50 W, 40 mA pro Gel für 160 min fortgesetzt. Die Gele wurden mit Coomassie oder Silber gefärbt und anschließend luftgetrocknet. Zur Auswertung wurden die Gele mit einem JX-330 Scanner (Sharp, Tokyo, Japan) eingescannt und anschließend mittels der ProteomWeaver 2D-Gel-Analysesoftware (Version 1.13; Definiens Imaging GmbH, München) analysiert.

### 5.4.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Eindimensionale SDS-Gele wurden mit der Fertiglösung GelCode Blue Stain Reagent (für kolloidale Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung, Pierce, Illinois, USA) entsprechend der

Anweisung des Herstellers gefärbt.

Zweidimensionale SDS-Gele wurden zunächst mindestens 1 h in 300 ml Fixierlösung unter Schütteln inkubiert. Zur Herstellung der Fixierlösung wurden unmittelbar vor Gebrauch Stammlösung A (25 % (w/v) Ammoniumsulfat, 3 % (v/v) Phosphorsäure) und Stammlösung B (Methanol) im Verhältnis 2:1 gemischt. Anschließend wurde 1 ml Farbstofflösung (5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) zugegeben und über Nacht inkubiert. Danach wurden die Gele 3 x 20 min mit dH<sub>2</sub>O, 1 min mit Methanol und wieder 15 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

Für die Silberfärbung wurden die Gele zunächst mindestens 30 min in Fixierlösung (Wasser:Methanol:Eisessig, 38:50:12 mit 50 µl 37 %igem Formaldehyd pro 100 ml) und dann 2 x 10 min in 50 %igem Ethanol inkubiert. Um ein Reißen der 2D-Gele zu vermeiden wurden diese statt in 50 %igem in 30 %igem Ethanol inkubiert. Es folgten ein einminütiges Waschen in Thiosulfatlösung (0,02 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O) und 3 x 20 s in dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Gele 5 min in Silbernitratlösung (0,2 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 75 µl 37 %iges Formaldehyd pro 100 ml) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte in 6 % (w/v) NaCO<sub>3</sub>, 0,0004 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 50 µl 37 %iges Formaldehyd pro 100 ml. Nach ausreichender Färbung wurden die Gele 2 x kurz mit Wasser gespült und dann 10 min in Stop-Lösung (50 mM EDTA) geschüttelt.

## 5.5 Western-Blot

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Membranen erfolgte durch Elektroblothing in einer Transblot Semi-Dry Transfer Cell (Biorad, München). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond C Extra, Amersham Pharmacia, Freiburg) mit Towbin-Blotpuffer (Towbin *et al.*, 1979) und Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membranen (Immobilon P, Millipore) nach der Methode von Schägger und von Jagow (Schägger and von Jagow, 1991) übertragen.

Towbin-Blotpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

Anodenpuffer: 300 mM Tris, 100 mM Tricine

Kathodenpuffer: 30 mM Tris, 300 mM ε-Aminocaprinsäure

Der Aufbau des Blottapparatur war bei beiden Methoden im Wesentlichen gleich. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol befeuchtet und dann kurz in Wasser inkubiert. Für die Methode nach Towbin wurden die Blotting-Papiere (Roth), das Gel und die Membran zunächst in Towbin-Blotpuffer inkubiert. Bei der Methode nach Schägger wurde ein Blotting-Papier in Anodenpuffer inkubiert und das zweite Blottingpapier sowie das Gel, in

Kathodenpuffer. Für den Blotaufbau wurden das Anoden-Papier, die Membran, das Gel und das Kathoden-Papier in der angegebenen Reihenfolge luftblasenfrei auf die Anode gelegt und anschließend die Kathode aufgesetzt. Mit Towbin-Blotpuffer erfolgte der Transfer 30-60 min bei 15 V und nach der Methode von Schägger und von Jagow bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 3 h.

Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mit polyklonalen Kaninchen-Antisera (von Eurogentec) bzw. der Nachweis des C-terminalen StrepTag-II mit Streptactin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics). Die Membran wurde 1 h in PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschüttelt und dann 5 x 5 min mit PBS gewaschen.

Zur Maskierung biotinylierter Proteine bei der StrepTag-Detektion folgte eine Inkubation in PBS mit 4 µg/ml Avidin (aus Hühnereiweiß, Sigma) für 30 min. Danach wurde das Streptactin-alkalische-Phosphatase-Konjugat in 2000facher Verdünnung hinzugegeben und für eine Stunde weiter inkubiert.

Für die spezifische Detektion von Proteinen mit den aus Kaninchen gewonnenen Antisera wurden die gewaschenen Membranen für 2 h in 20 ml PBS mit 0,5 % (w/v) BSA (Roth, Karlsruhe) und den entsprechend verdünnten Antisera (Anti-ClpP1 SA32 und Anti-ClpP2 SA33 je 1:1000 und Anti-ClgR, gereinigt, gegen das synthetische Peptid Epo2115 H<sub>2</sub>N-PGY LSE LER GRK EVS C-CONH<sub>2</sub> 1:500) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBS für je 5 min wurden sie für 1 h in 20 ml PBS mit 0,5 % (w/v) BSA und dem sekundärem Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-AP Conjugate (Biorad)) in Verdünnung 1:4000 geschüttelt.

Vor der Detektion wurden die Membranen zunächst 2 x 5 min mit PBS und 1 x 5 min mit alkalische Phosphatase-Puffer (100 mM Tris, pH 9,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Die Farbdetektion erfolgte durch Inkubation der Membranen in 25 ml alkalische Phosphatase-Puffer mit je 250 µl BCIP- (20 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat pro ml H<sub>2</sub>O) und NBT-Lösung (30 mg Nitroblautetrazolium pro ml 70 %iges Dimethylformamid). Durch Überführung der Membran in H<sub>2</sub>O und anschließende Trocknung wurde die Reaktion gestoppt.

## 5.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Proteinen mittels „Peptidmassen-Fingerprint-Analysen“ wurde wie von Schaffer *et al.* (Schaffer *et al.*, 2001) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Banden aus eindimensionalen SDS-Gelen ausgeschnitten bzw. Spots aus 2D-Gelen mit einer

Pasteurpipette ausgestochen und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis and Langen, 1997). Die nachfolgend angegebenen Mengenangaben beziehen sich auf Spots aus 2D-Gelen. Für Proteinbanden aus 1D-Gelen sind die eingesetzten Volumina in Klammern angegeben.

Die Gelstücke wurden durch mehrmaliges Waschen mit 350  $\mu$ l (750  $\mu$ l) 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat entfärbt und anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Savant Instruments Inc., Holbrook) getrocknet. Dann wurden die Gelstücke 30 min in 1  $\mu$ l (5  $\mu$ l) 3 mM Tris-HCl, pH 8,8, mit Trypsin (10 ng/ $\mu$ l Endkonzentration, Promega) rehydratisiert und nach Zugabe von 2  $\mu$ l (6  $\mu$ l) 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 über Nacht bei RT inkubiert. Die Peptide wurden durch Zugabe von 6  $\mu$ l (12  $\mu$ l) H<sub>2</sub>O, 15 min Inkubation bei RT, Zugabe von 5  $\mu$ l (10  $\mu$ l) 30 % (v/v) Acetonitril (ACN) mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) und weitere 10 min Inkubation eluiert. Die Proben wurden entweder direkt gemessen oder für eine spätere Messung bei -20°C gelagert.

Für die Messung wurden 0,5  $\mu$ l der Peptidlösung zusammen mit 0,5  $\mu$ l einer gesättigten  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäure-Lösung in 50 % (v/v) ACN, 0,25 % (v/v) TFA auf eine Probenplatte gegeben. Eine externe Kalibrierung erfolgte mit den Calibration Mixtures 1 und 2 des Sequazyme Peptide Mass Standard Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry workstation (Applied Biosystems) analysiert. 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) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mit den theoretisch erwarteten Peptidmassen aus einer lokalen Datenbank mit 3746 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der GPMAW-Software 4.0 (Lighthouse Data) verglichen. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den vorhergesagten Peptidmassen übereinstimmten und die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen. Wenn die Anzahl der zugeordneten Peptide für eine sichere Identifizierung nicht ausreichte, wurden die Peptide durch ZipTip-Behandlung (Millipore, Schwalbach) aufkonzentriert und gereinigt. Das ZipTip wurde zweimal mit 50 % (v/v) ACN befeuchtet und dann zweimal mit Äquilierungspuffer (0,1 % (v/v) TFA) gespült. Die Peptide wurden durch zehnmalsiges Aufziehen (10  $\mu$ l) an die ZipTip-Matrix gebunden. Vor der Elution der Peptide in 5  $\mu$ l 50 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA wurde fünfmal mit Äquilierungspuffer gespült. Ein Aliquot der aufgereinigten Peptidlösung wurde erneut im MALDI-TOF Massenspektrometer gemessen.

## 6. Genexpressionsanalysen

### 6.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA aus *C. glutamicum* erfolgte nach mechanischem Aufschluß mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). 20 ml einer exponentiell wachsenden Kultur wurden mit 20 g Eis abzentrifugiert (3 min, 5000 x g, 4°C). Das Pellet wurde sofort in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) resuspendiert und zunächst 15 s und nach einer kurzen Inkubation auf Eis erneut 30 s mit 0,5 g Zirkonium-/Silica-Perlen in einem Silamat S5 (Vivadent) aufgeschlossen. Nach kurzer Zentrifugation (2 min, 13000 x g, RT) wurde der Überstand mit 250 µl eiskaltem Ethanol (abs.) gemischt und auf ein RNeasy-Säulchen gegeben. Die weitere Durchführung mit dem RNeasy-Kit und die DNase I-Behandlung auf der Säule erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Bei Einsatz der RNA für die RT-PCR wurden DNA-Reste durch einen weiteren DNase I-Verdau entfernt. Dazu wurden zu ca. 100 µl RNA-Lösung 20 µl 10 x DNase-Puffer (1 M NaAcetat, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 5,0) und 3 µl (30 U) DNase I (RNase frei, Roche Diagnostics) gegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Die DNase I wurde anschließend hitzeinaktiviert (10 min, 70°C). Zur Reinigung der RNA-Lösung wurde der Ansatz mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, kurz gemischt und 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und erneut extrahiert. Nach Zentrifugation (15 min, 15000 x g) wurde die RNA aus der oberen Phase durch Ethanol gefällt (vgl. 4.2). Das RNA-Pellet wurde getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O (40 min autoklaviert) resuspendiert und die Konzentration wie unter 4.3 beschrieben bestimmt.

### 6.2 DNA-Chip-Analysen

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chips enthalten 3542 PCR-Produkte von *C. glutamicum*-, „open reading frames“. Das zu deren Herstellung eingesetzte Robotersystem beruht auf dem an der Stanford University entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996) und wurde am Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich von der Arbeitsgruppe von Dr. V. Wendisch etabliert (Wendisch, 2003).

#### 6.2.1 Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Zur Absättigung der freien ε-Aminogruppen der mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträger sowie zur Immobilisierung und Denaturierung der DNA wurden die DNA-Chips vor der Hybridisierung chemisch und thermisch nachbehandelt. Staubfreie DNA-Chips

wurden zunächst in einer Feuchtigkeitskammer (Sigma-Aldrich) über einer 1 x SSC-Lösung rehydratisiert und anschließend fünf Sekunden bei 100°C auf einem Heizblock blitzgetrocknet, um gleichmäßigere und größere Fluoreszenzsignale zu erhalten. Durch UV-Bestrahlung (650 µJ, Stratalinker, Stratagene) wurde die DNA kovalent mit der Poly-Lysin-Schicht vernetzt. Um eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten cDNA zu verhindern, wurden die freien ε-Aminogruppen von Poly-L-Lysin blockiert. Dazu wurden die DNA-Chips 20-25 min in einer 1-Methyl-2-Pyrrolidinon-Lösung (180 mM Bernsteinsäureanhydrid, 50 mM Na-Borat) inkubiert. Die DNA-Doppelstränge wurden durch 1,5 min Inkubation in 95°C heißem Wasser denaturiert und die Einzelstränge durch 2 min Inkubation in 96 %igem (v/v) eiskaltem Ethanol fixiert. Zur Trocknung wurden die DNA-Chips 5 min bei 50 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung im Exsikkator gelagert.

### 6.2.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den genomweiten Vergleich von Genexpressionsmustern zweier verschiedener RNA-Proben wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen RNA-Mengen (20-25 µg) synthetisiert. Die RNA wurde mit 500 ng pdN6 Zufalls-Hexanukleotid-Primern (Pharmacia) in einem Gesamtvolumen von 14 µl inkubiert (10 min, 65°C) und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch reverse Transkription in der Gegenwart der dUTP-Analoga FluoroLink Cy3-dUTP ( $\lambda_{\text{Absorption max.}}$  550 nm,  $\lambda_{\text{Fluoreszenz max.}}$  570 nm, grün, Pharmacia) und Cy5-dUTP ( $\lambda_{\text{Absorption max.}}$  649 nm,  $\lambda_{\text{Fluoreszenz max.}}$  670 nm, rot, Pharmacia). Die reverse Transkription wurde durch Zugabe von 3 µl 1 mM FluoroLink und 11,6 µl RT-Mix bestehend aus 2 µl Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 3 µl 0,1 M DTT, 6 µl 5 x First Strand Buffer (Invitrogen) und 0,6 µl dNTPs (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP und 10 mM dTTP) gestartet. Der Ansatz wurde zunächst 10 min bei RT und anschließend 110 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl 0,1 M NaOH und 10 min Inkubation bei 72°C wurde die RNA hydrolysiert. Die Lösung wurde durch Zugabe von 10 µl 0,1 M HCl neutralisiert. Die Aufkonzentrierung der cDNA und die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch zwei Ultrafiltrationsschritte mit Microcon YM-30 Filtereinheiten (Millipore). Der 50 µl-Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt und 7 min bei 13000 x g zentrifugiert. Danach wurden die Cy3- und Cy5-markierten Sonden vereinigt, auf 500 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und auf ein Volumen von 14,5 µl eingeeengt. Die bei diesem zweiten Reinigungsschritt erhaltenen cDNA-Sonden wurden direkt zur DNA-Chip-Hybridisierung eingesetzt.



### 6.2.3 DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Zunächst wurde zu den vereinigten DNA-Sonden (14,5  $\mu$ l) 2  $\mu$ l polyA (10 ng/ $\mu$ l, Sigma) als Kompetitor gegeben. Dann wurden 3  $\mu$ l 20 x SSC mit 0,48  $\mu$ l HEPES (1 M, pH 7) zur Sicherung stringenter Bedingungen und 0,45  $\mu$ l 10 % (w/v) SDS zur Verringerung der Oberflächenspannung zugegeben, 2 min bei 100°C denaturiert und anschließend 5-10 min bei RT abgekühlt (Zimmer *et al.*, 2000). Vor der Hybridisierung wurde ein Spezialdeckgläschen (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire) auf dem DNA-Chip über den Bereich mit der immobilisierten DNA gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung zu gewährleisten. Um eine Austrocknung der Probenlösung während der Hybridisierung zu verhindern wurden an den Rand des Objektträgers mehrere Tropfen 3 x SSC-Lösung gesetzt, die vorbereitete Sonde unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., USA) für 14-16 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Nach der Hybridisierung wurde der DNA-Chip zuerst einmal in 1 x SSC mit 0,03 % (w/v) SDS und dann in 0,05 x SSC gewaschen, um die Hybridisierungslösung und unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen. Der DNA-Chip wurde durch Zentrifugation getrocknet (5 min, 50 x g, RT) und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

### 6.2.4 Auswertung von DNA-Chips

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen, welche direkt mit der Menge gebundener, fluoreszenzmarkierter Sonde korreliert. Die Auswertung erfolgte mit einem GenePix 4000 Laserscanner (Axon Inc., Union City, USA) und der GenePix Pro 3.0 Software (Axon Inc.). Der Laser-Scanner bestrahlt die Oberfläche der DNA-Chips mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen, eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und die andere für Cy5-dUTP (635 nm). Die daraufhin emittierte Fluoreszenz von Cy3 bei 570 nm und von Cy5 bei 670 nm wurde von lichtempfindlichen Kathoden registriert. Diese wandeln die Fluoreszenz in einen elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird und direkt mit der Cy3- und Cy5-Fluoreszenz korreliert. Mit Hilfe der GenePix Pro 3.0 Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert. Die „GenePix Array List“ (erstellt von Tino Polen) ermöglicht eine direkte Zuordnung der detektierten Spots zu den entsprechenden *C. glutamicum*-Genen bzw. den Hybridisierungskontrollen.

Für die Auswertung wurde zunächst das Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale durch Bildung des Quotienten aus  $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{SpotHintergrund}}$  ermittelt. Bei einem Signal/Rausch-Verhältnis für Cy3- und Cy5-Fluoreszenz  $< 3$  wurde das Signal als zu schwach betrachtet und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um Unterschiede bei Einbau und Stabilität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe ausgleichen zu können, wurden die erhaltenen Fluoreszenzverhältnisse durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor normiert. Dieser Faktor wurde so gewählt, dass der durchschnittliche Cy3/Cy5-Quotient („ratio of medians“) bei Hybridisierung mit der genomischen DNA von *C. glutamicum* den Wert 1 ergab (Eisen *et al.*, 1998). Um die aus den DNA-Chip-Analysen resultierenden Aussagen statistisch abzusichern, wurden die Experimente mehrfach wiederholt. Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze erfolgte die Berechnung von p-Werten mit dem t-Test (einseitiger Test, heteroskedastisch; TTEST-Tabellenfunktion, EXCEL 2000, Microsoft). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky *et al.*, 2000). Bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurde die Veränderung des mRNA-Spiegels als signifikant betrachtet. Ein p-Wert von 0,05 bedeutet, dass die ermittelten relativen RNA-Level sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von den mRNA-Leveln genomischer DNA unterscheiden. Bei der Analyse von Genexpressionsänderungen wurde nach Genen mit signifikantem und mindestens zweifach verändertem mRNA-Spiegel gesucht.

### 6.3 Primer-Extension-Analysen

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes und Quantifizierung der relativen mRNA-Spiegel eines Gens unter verschiedenen Bedingungen wurden Primer-Extension-Versuche durchgeführt. Zunächst wurden 5-30  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA mit 2 pmol eines IRD800-markierten Oligonukleotids hybridisiert, wobei die Oligonukleotide so gewählt wurden, dass sie unmittelbar stromabwärts des Translationsstartpunktes des entsprechenden Gens binden. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  mit 2  $\mu\text{l}$  5 x Annealing-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1,25 mM KCl) zunächst für 5 min auf 65°C erhitzt um RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren und dann zur Anlagerung der Oligonukleotide langsam (0,5°C/2 min) im Thermocycler auf 42°C abgekühlt. Zur Synthese des komplementären cDNA-Stranges wurde ein Gemisch aus 10  $\mu\text{l}$  5 x Reverse-Transkriptase-Puffer (250 mM

Tris-HCl, pH 8,3, 125 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 µl DTT (100 mM, GIBCO/BRL Life Technologies GmbH, Eggestein), 1 µl dNTP-Gemisch (25 mM; von GIBCO/BRL Life Technologies GmbH, Eggestein), 0,5 µl Actinomycin D (5 mg/ml in Ethanol), 23 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Reverse-Transkriptase (200 U, Superscript II, GIBCO/BRL Life Technologies GmbH, Eggestein) zu dem Ansatz gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 µl RNase A-Reaktionsmix (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 µg/ml „sonicated“ Lachssperma-DNA, 0,24 µl RNase A (100 mg/ml, DNase-frei, frisch zugegeben)) gestoppt und zum Abbau der RNA 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 17 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 380 µl eiskaltem Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Ethanol-fällung (vgl. 4.2) wurde das DNA-Pellet in 2 µl Wasser unter Schütteln gelöst und mit 2 µl Formamid-Ladepuffer (aus dem DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Freiburg) versetzt. Direkt vor dem Auftragen auf das Gel wurde die Reaktion 5 min bei 70°C inkubiert und 1 µl der Reaktion dann mittels denaturierender PAGE analysiert (vgl. 4.8). Die Länge des Reaktionsproduktes und somit der Transkriptionsstart wurden durch gleichzeitiges Auftragen einer DNA-Sequenzierungsreaktion mit dem gleichen markierten Oligonukleotid, das auch für die reverse Transkriptions-Reaktion eingesetzt wurde, bestimmt.

#### 6.4 RT-PCR

Die quantitative RT-PCR ermöglicht die Bestimmung der spezifischen mRNA-Menge eines Gens auch bei schwachen Transkripten. Zunächst wurden 5 µg Gesamt-RNA mit je 2 pmol der Oligonukleotide RT-clgR-rv und RT-dnaE-rv in einem Volumen von 12 µl für 10 min bei 65°C inkubiert. Dabei wurden Oligonukleotide gegen *dnaE* als interner Standard verwendet, weil sich bei DNA-Chip-Analysen gezeigt hat, dass die *dnaE*-Transkriptmengen in Wildtyp und  $\Delta clpC$ -Mutante gleich sind. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurde die cDNA-Synthese durch Zugabe von 4 µl 5 x Reverse-Transkriptase-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 125 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl DTT (100 mM, GIBCO/BRL Life Technologies GmbH, Eggestein), 1 µl dNTP-Gemisch (25 mM; von GIBCO/BRL Life Technologies GmbH, Eggestein) und 0,8 µl Reverse-Transkriptase (200 U, Superscript II, GIBCO/BRL Life Technologies GmbH, Eggestein) gestartet (Schlosser *et al.*, 2001). Der Ansatz wurde 90 min bei 42°C inkubiert. 2 µl dieses Ansatzes mit der synthetisierten cDNA wurden als Template in einer anschließenden PCR eingesetzt. Die PCR wurde zunächst mit 20, 25 und 30 Zyklen von Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung durchgeführt um herauszufinden bei welcher Zyklenzahl die Vermehrung der DNA-Moleküle noch exponentiell erfolgte und somit quantifizierbar war.

Nachfolgend wurde immer mit einer PCR mit 22 Zyklen gearbeitet. Die Reaktionsprodukte wurden durch Elektrophorese in einem 2 %igen (w/v) Agarosegel getrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

## 7. Analyse von DNA-Protein-Interaktionen

### 7.1 Affinitätsreinigung mit Dynabeads Streptavidin-gebundener DNA

Zur Identifikation von DNA-bindenden Proteinen, die mit den Promotorregionen bestimmter Gene interagieren, wurden die Ziel-DNA-Sequenzen über Biotin an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gebunden und eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin (DynaL A. S., Oslo) sind uniforme, supramagnetische „Kugeln“, an die aufgereinigtes Streptavidin, welches Biotin mit hoher Affinität ( $K_D = 10^{-15}$ ) bindet, kovalent gebunden ist. Die Zielpromotoren (ca. 300 bp) wurden durch PCR mit den entsprechenden Primern biotinyliert.

Zunächst wurde eine PCR mit unmarkierten Primern zur Amplifikation der Zielpromotors durchgeführt. Dazu wurde der im 3'-Bereich bindende Primer („Reverse-Primer“) so gewählt, dass er neben der kodierenden Sequenz auch eine 23 bp lange komplementäre Sequenz zu dem Biotinprimer 1 (siehe Tab. 3) enthielt. Das resultierende PCR-Produkt wurde dann als Template in eine zweite PCR mit dem am 5'-Ende biotinylierten Biotinprimer 1 eingesetzt. Die Bindungskapazität der Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin liegt bei ca. 40 bis 50 pmol eines 300 bp langen DNA-Fragmentes pro mg Beads. Bei größeren Fragmenten ist die Bindungskapazität aufgrund der sterischen Behinderung reduziert. Die Beads liegen in Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 10 mg Dynabeads pro ml vor. Es wurden jeweils 220 pmol biotinyliertes Promotorfragment (1 µg eines 1 kB langen DNA-Fragmentes entspricht 1,52 pmol) an 0,5 ml Dynabeads<sup>®</sup> M-280 Streptavidin gebunden.

Vor der Kopplung der DNA-Fragmente wurden die Dynabeads zunächst mit einem Ausgangsvolumen B + W-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 M NaCl) gewaschen. Dies erfolgte durch Sedimentation in einem Dynal MPC-1 Magnethalter und anschließende Resuspension bei Raumtemperatur. Auch alle nachfolgenden Waschschrte und die Proteinbindung erfolgten auf diese Weise. Die Dynabeads wurden nach einem zweiten Waschschrte in dem gleichen Volumen wie das DNA-Fragment in B + W-Puffer resuspendiert, mit dem DNA-Fragment versetzt und eine Stunde bei RT geschüttelt, wobei die Umdrehungszahl so gewählt wurde, dass die Dynabeads nicht sedimentierten. Bei einem

Gesamtvolumen größer 1 ml wurde der Ansatz in einem 15 ml Falcon inkubiert. Anschließend wurden der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von drei Waschschritten mit jeweils einem Ausgangsvolumen (bezogen auf die eingesetzte Menge Dynabeads® M-280 Streptavidin) B + W-Puffer. Zur Lagerung bzw. bei Verwendung zur eigentlichen Affinitätsreinigung wurden die mit den DNA-Fragmenten beladenen Dynabeads® M-280 Streptavidin in einem Ausgangsvolumen TGED-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,01 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl) resuspendiert.

Für die Proteinbindung wurden die *C. glutamicum*-Proteinextrakte aus 800 ml Kultur (siehe 5.1) mit 500 µg chromosomaler DNA und den DNA-beladenen Dynabeads in einem 50 ml Falcon gemischt und 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurde der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit TGED, zweimal mit TGED mit jeweils 400 µg chromosomaler *C. glutamicum*-DNA und ein weiteres Mal mit TGED gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden dann in zwei Schritten mit jeweils 350 µl Elutionspuffer (TGED-Puffer mit 2 M NaCl) eluiert. Die Eluate wurden gepoolt, mit Microcon-3 Mikrokonzentratoren (Millipore, Bedford) auf 50 µl aufkonzentriert, mit 500 µl H<sub>2</sub>O versetzt und nochmals auf 50 µl aufkonzentriert. 10 µl der konzentrierten Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

Zur Regeneration der DNA-beladenen Dynabeads wurden diese zunächst zweimal mit Elutionspuffer und anschließend dreimal mit B + W-Puffer gewaschen. Nach Resuspension der Dynabeads in TGED-Puffer können die DNA-beladenen Dynabeads bei 4°C gelagert werden.

## 7.2 DNase I-Footprint-Analyse

Zur Identifizierung der Bindungsstellen des Transkriptionsregulators ClgR im Promotorbereich putativer Zielgene wurden DNase I-Footprint-Analysen durchgeführt, wobei der vor dem Abbau durch DNase I geschützte Bereich der DNA-Sonden die Bindungsstelle des Proteins anzeigt.

Für die Herstellung der DNA-Sonde wurde die Promotorregion der Zielgene zunächst in einer PCR mit unmarkierten Oligonukleotiden amplifiziert, die PCR-Produkte aus dem Gel eluiert und als Template für eine PCR eingesetzt, bei der eines der Oligonukleotide am 5'-Ende eine IRD800-Markierung trug. Die IRD800-markierten PCR-Produkte wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt und anschließend mit Microcon YM-30

Mikrokonzentratoren (Millipore) auf ca. 20 µl aufkonzentriert.

Vor der eigentlichen Footprinting-Reaktion wurde die DNA-Sonde mit dem entsprechenden DNA-bindenden Protein äquilibriert. ClgR-C wurde dazu mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt (vgl. 5.3). In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden 1,5-3 nM IRD800-markierte DNA-Sonde mit 1 µl poly(dI-dC) (5 µg/µl, Sigma), 10 µl Footprinting-Salzlösung (100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>), 20 µl Bindepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM DTT (frisch zugesetzt), 0,05 % (v/v) Triton X-100, 500 mM NaCl) und verschiedenen Proteinmengen (ca. 0,1–30 µM Endkonzentration) gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl 0,25 µg/ml DNase I in DNase I-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM DTT (frisch zugegeben)) und 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Sonde partiell fragmentiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 700 µl eiskalter Stopplösung (640 µl 96 %iges (v/v) Ethanol, 10 µl Lachssperma-DNA („sonicated“, 2 µg/ml), 50 µl gesättigte Ammoniumsulfatlösung) gestoppt und die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA 30 min bei 16100 x g und 4°C sedimentiert, mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in je 2,5 µl Wasser und Formamid-Ladepuffer (Thermosequenzase-Kit, Pharmacia) resuspendiert.

Vor der Auftrennung in einem Sequenziergel wurde der Ansatz 5 min bei 70°C inkubiert. Die Sequenzzuordnung des geschützten Bereiches erfolgte mittels einer parallel aufgetragenen Sequenzierungsreaktion. Dazu wurde das der Sonde entsprechende, unmarkierte PCR-Produkt als Matrize für die Sequenzierungsreaktion mit dem entsprechenden IRD800-markierten Oligonukleotid eingesetzt.

## IV ERGEBNISSE

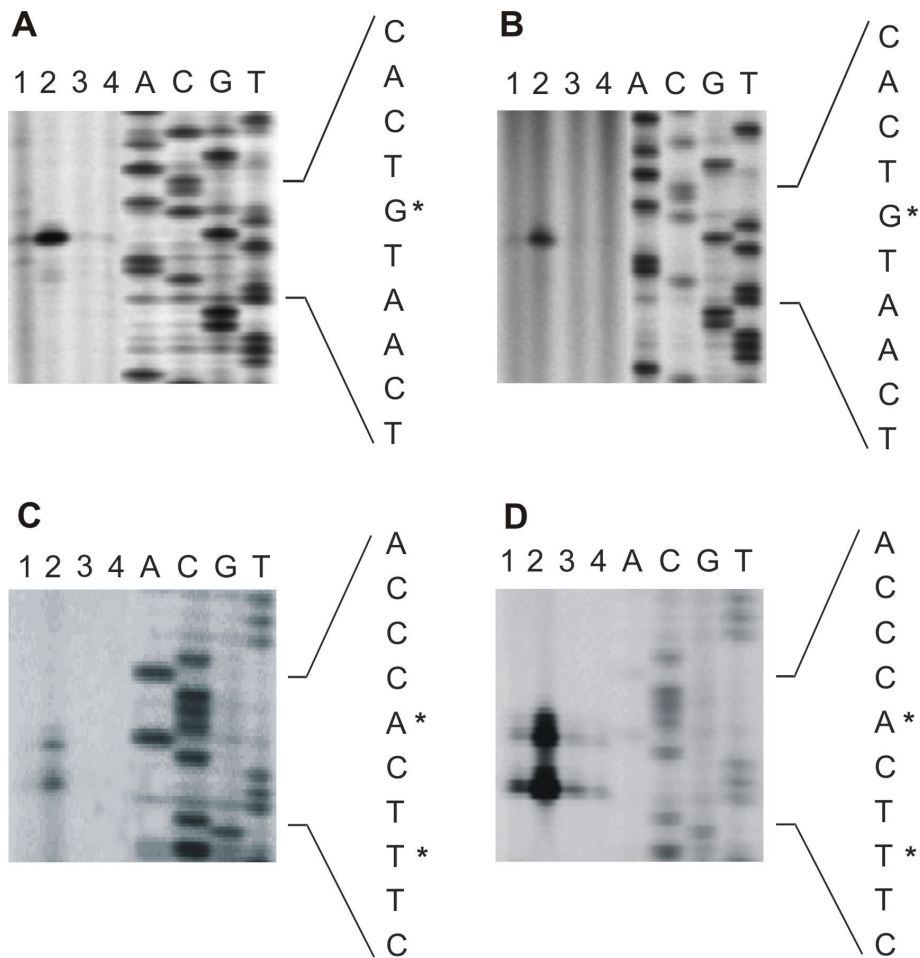
### 1. Untersuchungen zur Regulation der *clp*-Gene durch ClgR

Die Clp-Protease ist sowohl für die Degradation denaturierter, aggregierter und fehlgefalteter Proteine verantwortlich als auch für den konditionalen Abbau von funktionsfähigen Proteinen, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind. Deshalb ist ihre Regulation für die Zelle von zentraler Bedeutung.

In einem Proteomvergleich des *C. glutamicum*-Wildtyp-Stammes ATCC13032 mit einer  $\Delta clpC$ -Mutante wurde deutlich, dass die ClpP1- und ClpP2-Mengen in der Deletionsmutante um das acht- bis zehnfache höher sind als in dem Wildtyp (Engels *et al.*, 2004b). Dieser Effekt ist nicht auf die Induktion der generellen Stressantwort zurückzuführen, weil die Menge anderer genereller Stress-Proteine unverändert ist. DNA-Mikroarray-Experimente haben bestätigt, dass auch die mRNA-Mengen von *clpP1* und *clpP2* in der  $\Delta clpC$ -Mutante erhöht sind. Zur Identifikation eines putativen regulatorischen Proteins wurde eine Affinitätschromatographie mit der Promotor-Region von *clpPIP2* durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich ein Protein (ClgR, *clp gene regulator*) aus Rohextrakten der  $\Delta clpC$ -Mutante, aber nicht aus dem Wildtyp, anzureichern. ClgR hat eine molekulare Masse von 11,3 kDa und enthält ein zentrales Helix-Turn-Helix-Motiv (Engels *et al.*, 2004b). In weiteren Experimenten soll der Zusammenhang zwischen diesem Protein, ClpC und der *clpPIP2*-Expression geklärt werden.

#### 1.1 Relative Quantifizierung der Transkripte von *clpPIP2* und *clpC* und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte mittels Primer-Extension-Analyse

Die Tatsache, dass ClgR nur aus der  $\Delta clpC$ -Mutante, in der auch die *clpPIP2*-Expression erhöht ist, angereichert werden konnte, deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Protein um einen Transkriptionsaktivator handelt. Um die Funktion von ClgR näher zu untersuchen und die DNA-Mikroarray-Experimente zu verifizieren, wurden Primer-Extension-Versuche durchgeführt. Damit wurden die mRNA-Mengen von *clpPIP2* und *clpC* in *C. glutamicum* ATCC13032,  $\Delta clpC$ ,  $\Delta clpC \Delta clgR$  und  $\Delta clgR$  verglichen (Abb. 2). Für jedes Gen wurden die Experimente mit unabhängigen RNA-Präparationen und zwei verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt. Da in der  $\Delta clpC$ -Mutante nur die ersten 18 bp von *clpC* vorhanden sind, war es nicht möglich zwei verschiedene Primer aus diesem Bereich zu wählen. Deshalb wurde der zweite Versuch mit



**Abb. 2:** Primer-Extension-Analyse mit den *C. glutamicum* Genen *clpPIP2* und *clpC*. 10 µg Gesamt-RNA aus den Stämmen *C. glutamicum* ATCC13032 (1),  $\Delta clpC$  (2),  $\Delta clpC\Delta clgR$  (3) und  $\Delta clgR$  (4) wurden für die Bestimmung der relativen mRNA-Mengen und der Transkriptionsstartpunkte mit den Oligonukleotiden *clpP-PE1* (A), *clpP-BS1-rv* (B), *clpC-PE3* (C) und *clpC-PE2* (D) inkubiert. In D enthielten alle Stämme das Plasmid pJC1-*clpC* $\Delta$ 553-931. Die Transkriptionsstartpunkte sind mit einem Stern gekennzeichnet und konnten anhand der daneben aufgetragenen Sequenzierungsreaktion, die mit dem gleichen IRD800-markierten Oligonukleotid generiert wurde wie die Primer-Extension-Produkte, identifiziert werden.

den vier Stämmen, die jeweils das Plasmid pJC1-*clpC* $\Delta$ 553-932 enthielten, durchgeführt. Dieses kodiert für ein ClpC-Derivat, in dem die Aminosäurereste 533 – 932 fehlen und der isoelektrische Punkt durch Austausch eines Arginin zu Aspartat und die Kodierung von drei Glutamat-Resten vor dem Stop-Codon erniedrigt ist (siehe Tabelle 3). Weiterhin eignet sich pJC1-*clpC* $\Delta$ 553-932 für die Analyse der *clpC*-Regulation in der  $\Delta clpC$ -Mutante, weil es auch die regulatorische Region vor *clpC* kodiert.

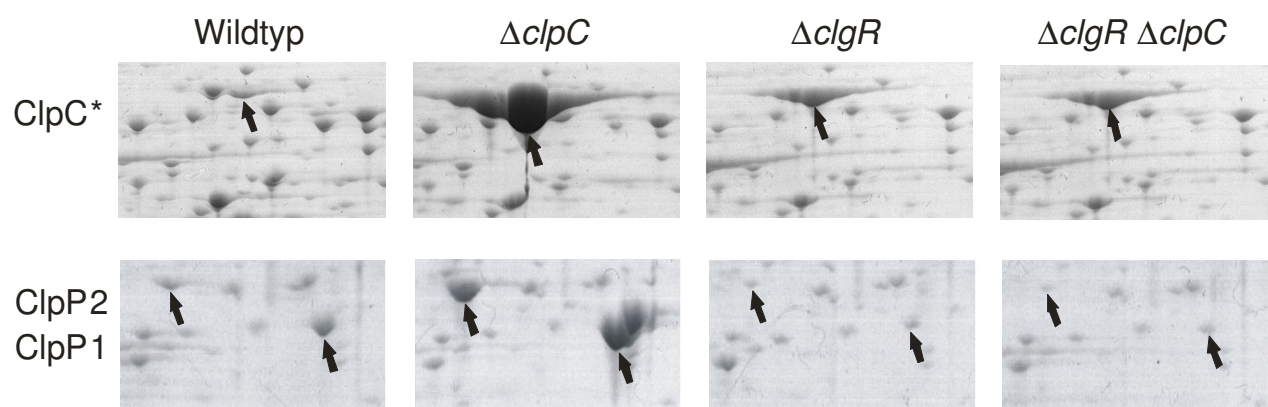
Wie in Abb. 2 zu sehen, ist der mRNA-Gehalt von *clpPIP2*, der durch die Bandenintensität wiedergespiegelt wird, in der  $\Delta clpC$ -Mutante, die wesentlich mehr ClgR enthält als der Wildtyp, deutlich erhöht. Interessanterweise ist für *clpC* der gleiche Effekt zu sehen. Bei einer Deletion von *clgR* waren die Transkriptmengen von *clpPIP2* und *clpC* niedriger als im Wildtyp.



Insgesamt war der Unterschied in der Expression zwischen Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante allerdings nicht sehr hoch. Der drastisch erhöhte mRNA-Gehalt von *clpP1P2* und *clpC* in der  $\Delta clpC$ -Mutante verglichen mit der  $\Delta clpC \Delta clgR$ -Doppelmutante bzw. der  $\Delta clgR$ -Mutante zeigt jedoch, dass die erhöhte Expression strikt abhängig von ClgR ist. Das unterstützt die Hypothese, dass ClgR als Aktivator der *clp*-Gene fungiert und bestätigt die DNA-Mikroarray-Ergebnisse. Demnach ist ClgR in Abwesenheit von ClpC ( $\Delta clpC$ -Mutante) und in geringerem Maße auch in Anwesenheit von ClpC (Wildtyp) an der Aktivierung der *clpP1P2*- und *clpC*-Expression beteiligt.

## 1.2 Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032, $\Delta clpC$ , $\Delta clgR$ und $\Delta clpC \Delta clgR$

Bisher wurde der Einfluss von ClgR auf der Ebene der mRNA-Menge untersucht. Zur Quantifizierung der Proteinmengen von ClpP1, ClpP2 und ClpC wurden die Proteome von *C. glutamicum* ATCC13032,  $\Delta clpC$ -,  $\Delta clgR$ - und  $\Delta clpC \Delta clgR$ -Mutante miteinander verglichen (Abb. 3). Dazu wurden die löslichen Proteine dieser Stämme durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und die Gele mit kolloidalem Coomassie gefärbt. ClpC ist ein Protein mit einer Masse von 102 kDa und wurde in den bisherigen 2D-Gel-Analysen nicht identifiziert (Schaffer *et al.*, 2001). Hinzu kommt, dass die  $\Delta clpC$ - und  $\Delta clpC \Delta clgR$ -Mutante kein natives ClpC enthalten. Deshalb wurden auch diese Versuche mit allen Stämmen mit pJC1-clpC $\Delta$ 533-932 durchgeführt.



**Abb. 3:** Proteomanalyse der *C. glutamicum*-Stämme ATCC13032 (Wildtyp),  $\Delta clpC$ ,  $\Delta clgR$  und  $\Delta clgR \Delta clpC$  jeweils mit pJC1-clpC $\Delta$ 533-931 zum Nachweis von ClpP1, ClpP2 und ClpC\*. Je 300  $\mu$ g der löslichen Proteinfraction wurden in der 1. Dimension in einem pH-Gradienten von 4-7 (obere Reihe) und 4,5-5,5 (untere Reihe) aufgetrennt. Es sind nur die relevanten Ausschnitte aus den Coomassie-gefärbten 2D-Gelen dargestellt.

Auch auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass die ClpP1-, ClpP2- und ClpC\*-Mengen in der  $\Delta clpC$ -Mutante drastisch höher sind als im Wildtyp (Abb. 3) und dass, wie die Analyse der  $\Delta clgR \Delta clpC$ -Doppelmutante ergab, diese Zunahme strikt abhängig von ClgR ist. Zudem waren die Proteinmengen von ClpP1 und ClpP2 in der  $\Delta clgR$ -Mutante deutlich niedriger als im Wildtyp. Diese Resultate bestätigten somit die Primer-Extension-Ergebnisse auf Proteinebene. Die Proteinmenge von ClpC\* war in der  $clgR$ -Mutante höher als im Wildtyp, während die Primer-Extension-Signale eine niedrigere Intensität zeigten. Möglicherweise ist diese Diskrepanz zwischen relativer mRNA- und Protein-Menge auf die Plasmid-kodierte Expression von ClpC\* zurückzuführen, weil die Kopienzahl von pJC1-clpC $\Delta$ 533-932 in den einzelnen Zellen leicht variieren kann.

### 1.3 Identifikation der ClgR-Bindestellen stromaufwärts von *clpP1P2* und *clpC*

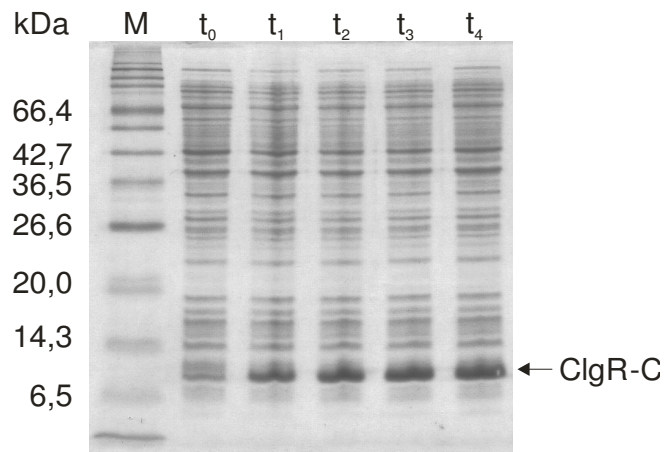
Mittels DNA-Affinitätschromatographie konnte gezeigt werden, dass ClgR an die Promotorbereiche von *clpC* und *clpP1P2* bindet (Engels *et al.*, 2004b). Zur genauen Lokalisation der Bindestellen wurden DNase I-Footprint-Analysen mit gereinigtem ClgR und IRD800-markierten DNA-Fragmenten der Promotorbereiche von *clpP1P2* und *clpC* durchgeführt.

#### 1.3.1 Aufreinigung von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II

Um die Bindung von ClgR an die putativen Zielpromotoren zu analysieren, sollte ein „getagtes“ ClgR-Derivat in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Für diesen Zweck wurde das StrepTag-II/StrepTactin-System gewählt, das auf der hochaffinen Bindung des StrepTag-II-Peptids (WSHPQFEK) an das Streptavidin-Derivat StrepTactin beruht (Skerra and Schmidt, 2000). Diese Bindung kann unter relativ milden Bedingungen mit einem Desthiobiotin-haltigen Puffer wieder gelöst werden.

Um Effekte, die auf der Position des StrepTag-II beruhen, ausschließen bzw. einordnen zu können, wurden ClgR-Derivate mit einem C-terminalen bzw. mit einem N-terminalen StrepTag-II konstruiert. Für die C-terminale Fusion lag bereits ein modifizierter pET-Vektor (pET24b-StrepTag) vor, während für die N-terminale Fusion zunächst ein Vektor konstruiert werden musste. Ausgegangen wurde dabei von dem Vektor pET16b. Für den StrepTag-II wurden komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die im hybridisierten Zustand Überhänge passend zu den Schnittstellen *NcoI* und *NdeI* besaßen. Das hybridisierte ds-Oligonukleotid wurde in den mit *NcoI* und *NdeI* geschnittenen Vektor pET16b ligiert. In den pET-Vektoren stehen die Zielgene unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird.

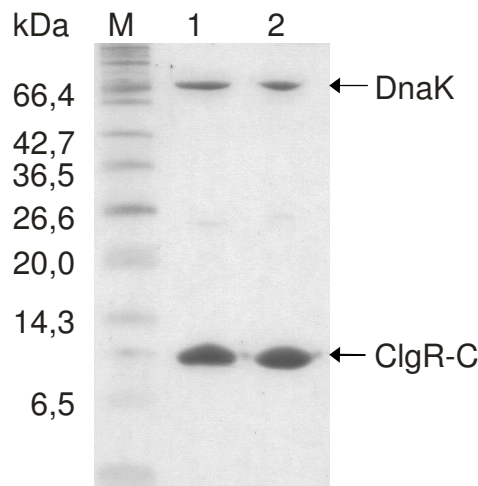
Für die Expression wurde deshalb der Stamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet, der den lysogenen Phagen  $\lambda$ DE3 enthält. Dieser trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, so dass die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens durch Zugabe von IPTG induziert wird. Somit stehen mit pET16b-StrepTag und pET24b-StrepTag Vektoren zur Verfügung, die unter Verwendung der *NdeI*- bzw. *XhoI*-Schnittstelle eine „in-frame“-Fusion des Zielgens mit einer StrepTag-II-kodierenden Sequenz am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende erlauben.



**Abb. 4:** Überproduktion von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II in *E. coli* BL21(DE3).  $t_0$ : Zellen unmittelbar vor der Induktion mit 1 mM IPTG;  $t_{1-4}$ : Zellen 1 – 4 h nach der Induktion mit 1 mM IPTG; M: Protein Marker Broad Range (New England Biolabs).

Nachdem *clgR* in die entsprechenden Vektoren kloniert wurde, erfolgte zunächst eine Überproduktion von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II (ClgR-C) in *E. coli* BL21(DE3). Die Kinetik der Überproduktion ist in Abb. 4 anhand einer SDS-PAGE mit Rohextrakten zu sehen. Bereits eine Stunde nach IPTG-Zugabe wurde ein dominantes Protein mit einer apparenten Masse von etwa 12 kDa gebildet, dessen Anteil am Gesamtprotein in den folgenden drei Stunden noch zunahm.

Die Reinigung von ClgR-C erfolgte mit einer StrepTactin-Affinitätssäule mit zwei ml Bettvolumen. Die Fraktionen der Aufreinigung wurden durch SDS-PAGE analysiert. ClgR-C befand sich ausschließlich in der löslichen Proteinfraction (UZ-Überstand) und es wurden keine Einschlusskörper gebildet. Die Desthiobiotin-haltigen Eluate enthielten außer ClgR-C auch ein Protein mit einer apparenten Masse von etwa 70 kDa. Dieses Protein ließ sich durch Erhöhung der Ionenstärke im Chromatographiepuffer auf 300 mM bzw. 1 M NaCl nicht abtrennen (Abb. 5). Die Zugabe eines Detergenz (0,1 % Nonident P40) zu den Chromatographie-Puffern führte ebenfalls nicht zur Abtrennung des 70 kDa-Proteins. Durch Peptidmassenfingerprint-Analyse konnte dieses Protein eindeutig als DnaK identifiziert werden, ein hochkonserviertes Hitzeschockprotein.

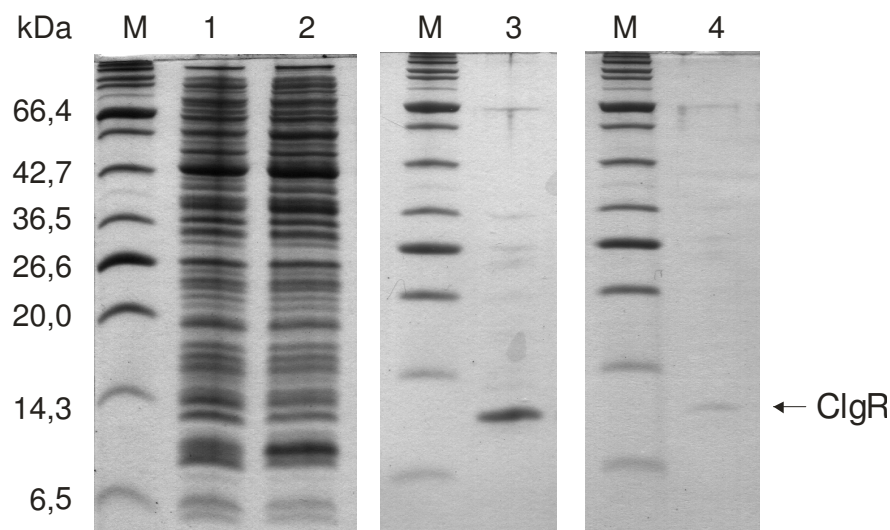


**Abb. 5:** StrepTactin-Affinitätsreinigung von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II aus *E. coli* BL21(DE3). Je 10  $\mu$ l der Eluate nach Reinigung mit 300 mM NaCl (Spur 1) bzw. 1 M NaCl (Spur 2) im Chromatographiepuffer wurden in einem 16,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. M: Protein Marker Broad Range (New England Biolabs).

Damit ClgR für die DNase I-Footprint-Analysen in reiner Form vorlag, wurde es statt in *E. coli* BL21(DE3) in *E. coli* BB1553  $\Delta$ *dnaK* (Tomoyasu *et al.*, 2001) überproduziert. Weil dieser Stamm keine T7-RNA-Polymerase besitzt, wurde *clgR* mit den StrepTag-II-kodierenden Sequenzen in den Vektor pEKEx1 kloniert. Dieser Vektor besitzt als Selektionsmarker ein Kanamycinresistenzgen und eignet sich für die Expression sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum*. Das klonierte Gen steht hier unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Der für ClgR-StrepTag kodierende Bereich aus den Vektoren pET24b-clgR-C und pET16b-clgR-N wurde mit den Oligonukleotiden pEK-popR-fw und pEK-popR-rv amplifiziert und über die *EcoRI*- und *SalI*-Schnittstellen in den Vektor pEKEx1 kloniert. Die Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass die Ribosomenbindestellen der pET-Vektoren mit amplifiziert wurden und somit identische Ribosomenbindestellen in den beiden pEKEx1-Vektoren vorlagen. Beide Plasmide (pEKEx1-clgR-C und pEKEx1-clgR-N) wurden sequenziert, um evtl. vorhandene Mutationen in den Zielgenen zu identifizieren. Die Sequenz von *clgR*-C stimmte mit der erwarteten Sequenz überein. In *clgR*-N lag jedoch eine Punktmutation vor. Bei Base 209 (bezogen auf die erste Base des *clgR* Startcodons) war Thymin gegen Cytosin ausgetauscht. Weil jedoch beide Triplets (TCT und TCC) für Serin kodieren, handelt es sich um eine stille Mutation und es konnte mit diesem Plasmid weitergearbeitet werden.

Nach Transformation in *E. coli* BB1553 und anschließender Überproduktion konnte ClgR-C ohne Co-Reinigung von DnaK isoliert werden (Abb. 6). ClgR-N konnte unter den gleichen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen angereichert werden. Nach der IPTG-Induktion war im Stamm mit ClgR-N auch keine deutlich verstärkte Bande mit der Größe von ClgR im

Zellextrakt zu erkennen. Da beide *clgR*-Konstrukte unter der Kontrolle des gleichen Promotors stehen, ist zunächst einmal davon auszugehen, dass beide gleich stark transkribiert werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Position des StrepTag-II die Translationseffizienz verändert, d. h., dass durch den N-terminalen StrepTag-II die Translation vermindert sein könnte und aus diesem Grund weniger ClgR-N gebildet wird. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass ClgR vom C-Terminus her abgebaut wird und ein C-terminaler StrepTag-II diesen Abbau hemmt.



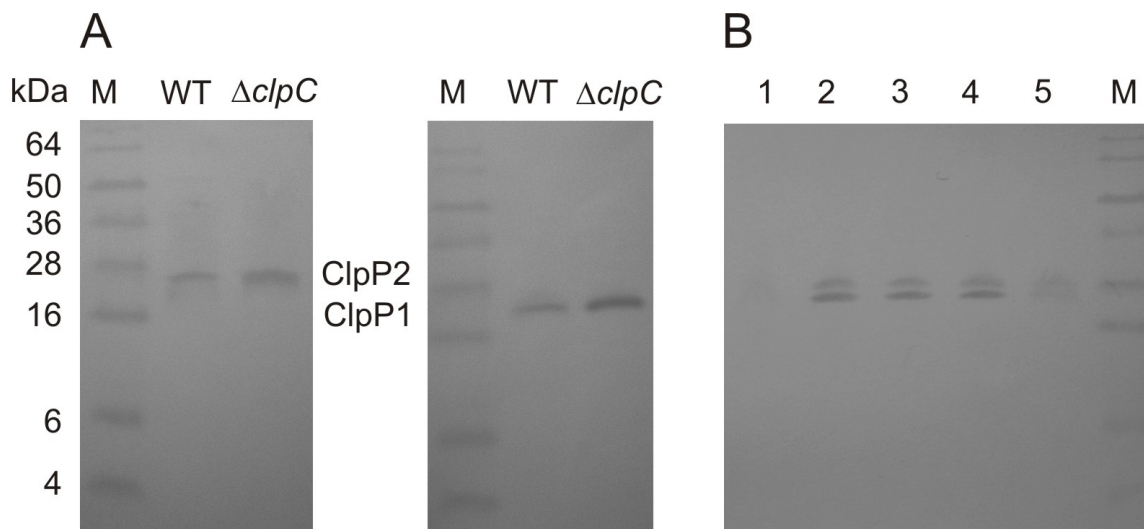
**Abb. 6:** Überproduktion und Reinigung von ClgR mit C- bzw. N-terminalem StrepTag-II aus *E. coli* BB1553  $\Delta dnaK$ . Es wurden je 10  $\mu$ g Gesamtprotein von *E. coli* BB1553/pEKEx1-clgR-C vor (Spur 1) und 2 h nach Induktion (Spur 2) der Überproduktion mit 1 mM IPTG aufgetragen. Von den Eluaten nach der StrepTactin-Affinitätschromatographie von ClgR mit C-terminalem (Spur 3) bzw. N-terminalem (Spur 4) StrepTag-II wurden je 10  $\mu$ l in einem 16,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. M: Protein Marker Broad Range (New England Biolabs).

### 1.3.2 Nachweis der Funktionalität der ClgR-Konstrukte

Um die Funktionalität der plasmid-kodierten ClgR-Proteine mit C- oder N-terminalem StrepTag-II bzw. ohne StrepTag-II zu überprüfen, wurden die entsprechenden Plasmide (pEKEx1-clgR-C, pEKEx1-clgR-N und pXMJ19-clgR) sowie die Ausgangsvektoren (pEKEx1 und pXMJ19) in den *C. glutamicum*-Stamm  $\Delta clpC\Delta clgR$  transferiert und die Aktivierung der Expression des *clpP1P2*-Operons mit polyklonalen Antisera gegen ClpP1 und ClpP2 bestimmt. Aus Abb. 7B wird ersichtlich, dass die ClpP1/P2-Menge in Gegenwart aller *clgR*-Expressionsplasmide in vergleichbarem Maße erhöht war. Die Anwesenheit sowie die Position des StrepTag-II scheinen somit keinen negativen Einfluß auf die Aktivität von ClgR zu haben. Der gleiche Versuch wurde auch unter nicht-induzierenden Bedingungen durchgeführt, wobei die ClpP1/P2-Menge ebenfalls

in Gegenwart aller *clgR*-Expressionsplasmide erhöht war. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass  $P_{tac}$  in *C. glutamicum* in Abwesenheit des Induktors nicht vollständig reprimiert wird. Folglich scheinen schon geringe Mengen an funktionalem ClgR auszureichen, um die Transkription von *clpP1* und *clpP2* zu aktivieren. Aufgrund der unspezifisch bindenden ersten Anti-ClgR-Antikörper, war es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich die ClgR-Mengen über Western-Blot zu quantifizieren. Es kann daher auch nicht eindeutig gesagt werden, ob die Reinigung der geringen ClgR-N-Mengen auf eine versteckte Lage des StrepTag-II oder eine verminderte Transkription/Translation zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurden auch noch die ClpP1/P2-Mengen in *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clpC$ -Mutante miteinander verglichen. Wie erwartet konnten deutlich größere Menge von ClpP1 und ClpP2 in der  $\Delta clpC$ -Mutante nachgewiesen werden (Abb. 7A). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den 2D-Gel-Analysen (Engels *et al.*, 2004b).

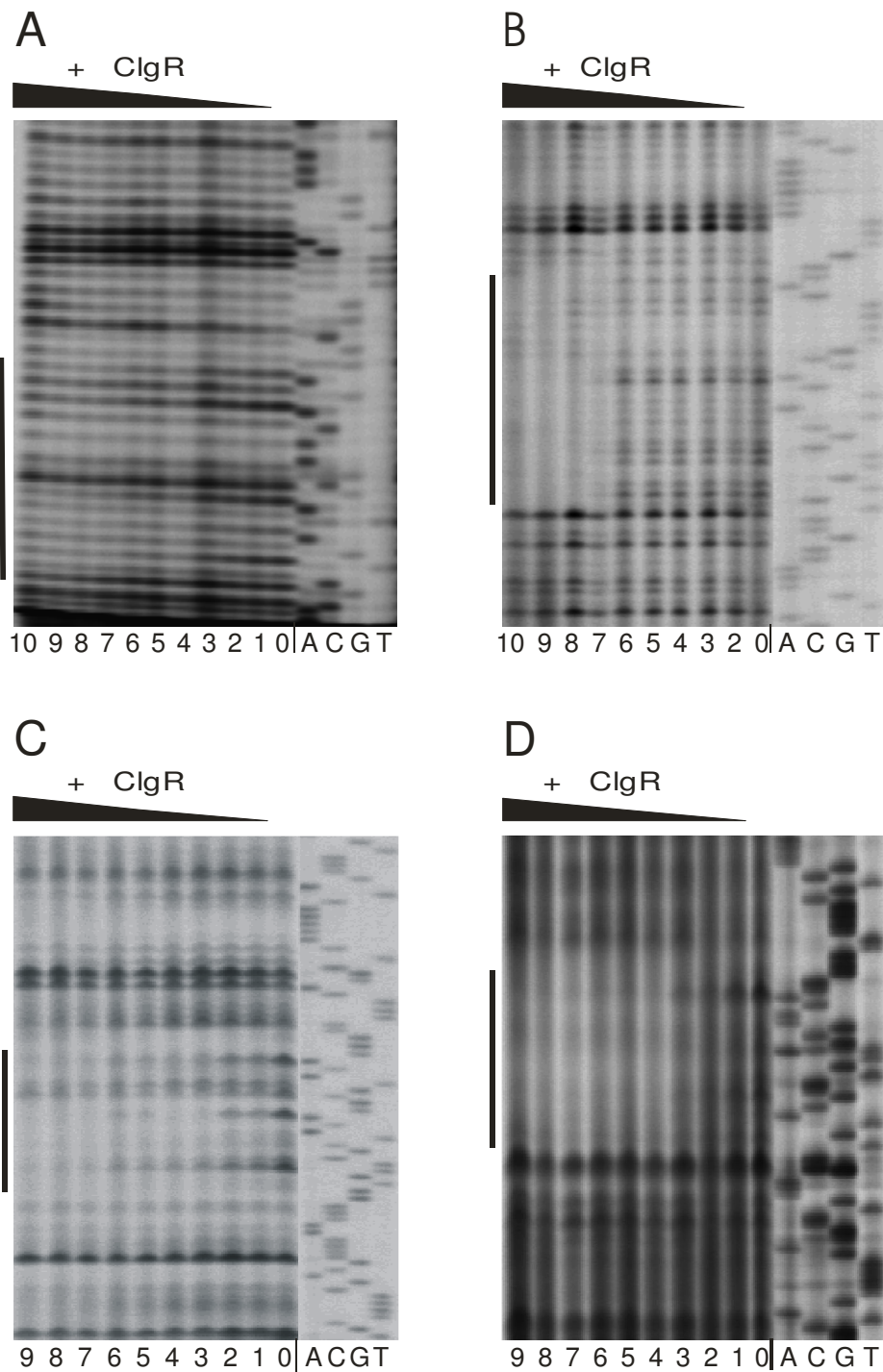


**Abb. 7:** Western-Blot-Analyse zum Vergleich der ClpP1- und ClpP2-Mengen in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen. Die Zellen wurden in BHIS-Medium mit 1 mM IPTG bis zu einer  $OD_{600}$  von 4 kultiviert und je 10  $\mu$ g der löslichen Proteinfraction in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. A: Vergleich der ClpP1/ClpP2-Mengen in *C. glutamicum* ATCC13032 (WT) und  $\Delta clpC$ . B: Vergleich der ClpP1/P2-Mengen in *C. glutamicum*  $\Delta clpC$   $\Delta clgR$  mit den Plasmiden pEKEx1 (Spur 1), pEKEx1-clgR-C (Spur 2), pEKEx1-clgR-N (Spur 3), pXMJ19-clgR (Spur 4) bzw. pXMJ19 (Spur 5).

### 1.3.3 Bindung von ClgR-C an die Promotorbereiche von *clpP1P2* und *clpC*

Mittels DNase I-Footprint-Analysen sollten die ClgR-Bindestellen vor *clpC* und *clpP1P2* bestimmt werden. Dazu wurde ClgR-C aus *E. coli* BB1553 gereinigt und IRD800-markierte DNA-Sonden der Promotorregionen von *clpP1P2* und *clpC* mit verschiedenen ClgR-C-Konzentrationen inkubiert. Sowohl in der regulatorischen Region von *clpP1P2* als auch von *clpC*





**Abb. 8:** DNase I-Footprint-Analyse zur Lokalisation der Bindung von ClgR-C an die regulatorischen Regionen von *clpPIP2* und *clpC*. Aliquots von 0,27 pmol IRD800-markiertem *clpPIP2* codierenden Strang (A, Primer-Paar IRD800-clpP-FP4/clpP-BS2-rv) und 0,43 pmol *clpPIP2* nicht-codierenden Strang (B, Primer-Paar clp-activator-fw/IRD800-clpP-BS1-rv), bzw. von 0,43 pmol IRD800-markiertem *clpC* codierenden Strang (C, Primer-Paar IRD800-clpC-BS2-fw/clpC-BS2-rv) und nicht-codierenden Strang (D, Primer-Paar clpC-BS1-fw/IRD800-clpC-BS1-rv) wurden mit verschiedenen ClgR-C-Konzentrationen inkubiert: 0: kein Protein, 1: 4,4 nM, 2: 11 nM, 3: 22 nM, 4: 44 nM, 5: 110 nM, 6: 220 nM, 7: 440 nM, 8: 1  $\mu$ M, 9: 2,2  $\mu$ M, 10: 4,4  $\mu$ M. Die geschützten Bereiche sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Sequenz dieser Bereiche kann anhand der daneben aufgetragenen Sequenzierungsreaktionen bestimmt werden, die mit den entsprechenden IRD800-markierten Oligonukleotiden durchgeführt wurden.

wurde ein Bereich durch ClgR-C vor dem DNase I-Verdau geschützt (Abb. 8). Anhand der Sequenzierungsreaktion konnte der geschützte Bereich identifiziert werden. Vor *clpPIP2* erstreckt er sich von Position -36 bis zu Position -59 bezogen auf den Transkriptionsstart. In der regulatorischen Region von *clpC* ist der Bereich von -120 bis -140 bezogen auf den distalen *clpC* Transkriptionsstart geschützt.

Sowohl vor *clpPIP2* als auch vor *clpC* konnten keine ClgR-C-induzierten hypersensitiven Bereiche festgestellt werden. Der vor DNase I-Verdau geschützte Bereich wird mit abnehmender Proteinkonzentration gleichmäßig freigegeben. Auffällig ist jedoch, dass ein erster Schutz der Sonde vor DNase I-Verdau bei *clpC* bereits bei einer ClgR-Konzentration von 44 nM zu sehen ist, während dies bei *clpPIP2* erst bei 440 nM der Fall ist. Demnach ist die Affinität von ClgR zu der Bindestelle vor *clpC* deutlich höher als zu der Bindestelle vor *clpPIP2*.

Bei dem codierenden Strang von *clpPIP2* ist der durch ClgR-C geschützte Bereich deutlich kleiner als in dem nicht-codierenden Strang. Eine Verschiebung von zwei bis drei Basenpaaren zwischen codierendem und nicht-codierendem Strang ist generell normal, weil bedingt durch die Größe des DNase I-Moleküls und die leichte Sequenzabhängigkeit der Methode keine genauere Bestimmung möglich ist. Im Fall von *clpPIP2* ist die relativ große Abweichung allerdings vermutlich darauf zurückzuführen, dass der geschützte Bereich sich unmittelbar am Anfang der Sonde für den codierenden Strang befand. Es war jedoch nicht möglich eine andere Sonde zu generieren, weil mit anderen Primern neben dem gewünschten PCR-Produkt zahlreiche Nebenprodukte entstanden.

#### **1.4 Analyse der *clpPIP2*- und *clpC*-Promotorbereiche in Actinomyceten**

Die Lokalisation der ClgR-Bindestellen bezogen auf die mittels Primer-Extension-Analyse ermittelten Transkriptionsstartpunkte sowie putative Promotor-Sequenzen sind in Abb. 9 zu sehen. Ein Vergleich der beiden durch ClgR geschützten Bereiche zeigt, dass es ein DNA-Sequenzmotiv gibt, welches in beiden ClgR-Bindestellen vorkommt. Dieses Motiv hat mit 5'-RWWCGCT-N3-RGCGWAC-3' partiell eine palindromische Struktur, was darauf hindeutet, dass ClgR als Dimer an die Operator-Region bindet. Der Abstand zwischen ClgR-Bindestelle und Transkriptionsstart ist bei *clpC* mit -130 bp deutlich größer als bei *clpPIP2* mit -46 bp. Möglicherweise deutet dies auf eine unterschiedliche Art der Transkriptionsaktivierung hin.





Nukleotid-Sequenzanalysen der DNA-Regionen stromaufwärts von *clpPIP2* und *clpC* haben deutlich gemacht, dass putative ClgR-Bindestellen auch in allen sequenzierten *Mycobacterium*-Arten, *Streptomyces coelicolor* und *Thermobifida fusca* vorkommen. In *Rhodococcus* sp. konnte eine Bindestelle für ClgR nur vor *clpC* gefunden werden (Abb.11). Das zentrale CGC-N5-GCG-Motiv ist mit Ausnahme der putativen ClgR-Bindestelle vor *clpPIP2* und *clpC* von *M. leprae*, dem ClgR fehlt, vollständig konserviert. Die Präsenz der *clgR*-homologen Gene und putativer ClgR-Bindestellen vor *clpPIP2* und *clpC* in anderen Actinomyceten legt eine konservierte Funktion von ClgR als Aktivator der *clpPIP2*- und *clpC*-Genexpression in Actinomyceten nahe.

### *clpP*

CGL	-117	ACGGTGAA	<b>AACGCTGAT</b>	<b>AGCGAAC</b>	AGAGGCG	-87													
CEF	-114	CACCCCGAA	<b>AACGCTGTT</b>	<b>AGCGAAC</b>	AGAGGCG	-84													
CDI	-114	AGGGCTTC	<b>GACGCTGAG</b>	<b>AGCGAAC</b>	AGAGAAG	-84													
MBO	-118	GACCGTAT	<b>GACGCTGTA</b>	<b>AGCGAAC</b>	GCGCCGG	-88													
MTU	-118	GACCGTAT	<b>GACGCTGTA</b>	<b>AGCGAAC</b>	GCGCCGG	-88													
MLE	-116	TGGGTTAT	<b>GACGCTGTA</b>	<b>AACGAAC</b>	GTGCCCC	-86													
MSM	-119	CGACAAGT	<b>GACGCTGTG</b>	<b>AGCGAAC</b>	GCGCCCC	-89													
MAV	-118	TTGCCGAT	<b>GACGCTGTG</b>	<b>AGCGAAC</b>	GCGCCCC	-88													
SCO	-124	GCGGAGCG	<b>TACGC</b>	<b>CCCG</b>	<b>GCGAAC</b>	ACCCGCA	-94												
TFU	-146	AAGAGACC	<b>TGCGCTGAC</b>	<b>AGCGAAC</b>	AGAATGG	-116													
Consensus			<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>

### *clpC*

CGL	-165	ACC CGGT	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>ACAGGCG</b>	<b>TAC</b>	AGGGCCT	-135												
CEF	-182	CGACGTT	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>ACAGGCG</b>	<b>TAC</b>	AGGGCCA	-158												
CDI	-174	GTGACGT	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>GCTGGCG</b>	<b>TAC</b>	AGGGGAG	-144												
MBO	-232	TTGCCGC	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>GGCGGCGAAC</b>		CGATGGC	-202												
MTU	-232	TTGCCGC	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>GGCGGCGAAC</b>		CGATGGC	-202												
MLE	-234	ATGTTGC	<b>TTT</b>	<b>CGT</b>	<b>TGCTGGCGAAC</b>		TGATCGC	-204												
MSM	-228	CGGCGTT	<b>TTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>TCTGGCGAAC</b>		TGATTAC	-198												
MAV	-294	TTTGTCT	<b>TTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>GGCGGCGAAC</b>	<b>A</b>	TGGTCGG	-264												
SCO	-225	GTC TCGC	<b>GTT</b>	<b>CGC</b>	<b>CATC</b>	<b>GGCGTAC</b>	TGGCGAG	-195												
TFU	-281	GCGGGCC	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>TGCGGCGTAC</b>		GCGGAAC	-251												
RHO	-256	GC AGCGT	<b>GTT</b>	<b>CGCT</b>	<b>GCTGGCGTAC</b>		ACGGAGG	-226												
Consensus			<b>G</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>

**Abb. 11:** Sequenzalignment der regulatorischen Regionen der Gene *clpP* und *clpC* verschiedener Actinomyceten. Die experimentell ermittelten ClgR-Bindestellen vor *clpPIP2* und *clpC* von *C. glutamicum* (CGL) wurden mit putativen ClgR-Bindestellen vor den orthologen Genen von *C. efficiens* (CEF), *C. diphtheriae* (CDI), *Mycobacterium tuberculosis* (MTU), *M. bovis* (MBO), *M. leprae* (MLE), *M. smegmatis* (MSM), *M. avium* (MAV), *Streptomyces coelicolor* (SCO), *Thermobifida fusca* (TFU) und *Rhodococcus* sp. (RHO) verglichen. Die putative ClgR-Bindestelle ist dunkel hinterlegt. Die Zahlen geben die relative Position zum putativen Translationsstart an.

## 2. Definition des ClgR-Regulon

### 2.1 Eingrenzung weiterer putativer Mitglieder des ClgR-Regulons

Es konnte bereits eindeutig gezeigt werden, dass ClgR ein Transkriptionsaktivator von *clpP1P2* und *clpC* in *C. glutamicum* ist. Analoge Untersuchungen bei *S. coelicolor* haben ergeben, dass in diesem Organismus auch ein weiteres Gen, *lon*, das ebenfalls für eine ATP-abhängige Protease kodiert, durch ClgR reguliert wird (Bellier and Mazodier, 2004). Lon ist in *C. glutamicum* nicht vorhanden. Um aber herauszufinden, ob auch in *C. glutamicum* noch andere Gene durch ClgR reguliert werden, wurde ein genomweiter Transkriptomvergleich durchgeführt. Weil ClgR nur in Abwesenheit von ClpC in größeren Mengen vorkommt, wurden die Transkriptome der  $\Delta clpC$ -Mutante (ClgR vorhanden) und der  $\Delta clpC \Delta clgR$ -Doppelmutante (ClgR nicht vorhanden) miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 (Schaffer, persönliche Mitteilung) aufgelistet.

Insgesamt zeigten 17 Gene einen mehr als 2-fach erhöhten mRNA-Spiegel in der  $\Delta clpC$ -Mutante im Vergleich zu der Doppelmutante. Die putative Funktion der Genprodukte wurde durch bioinformatische Analyse untersucht. Mit Ausnahme von sieben Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, konnten fast alle anderen Gene in zwei funktionelle Klassen unterteilt werden:

1. Gene mit möglicher Beteiligung an proteolytischen Prozessen (*ptrB*, *clpP1*, *clpP2* und *hflX*)
2. Gene, die an der Reparatur von DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung beteiligt sind (*NCgl0240-recR*, *recN* und *uvrA*).

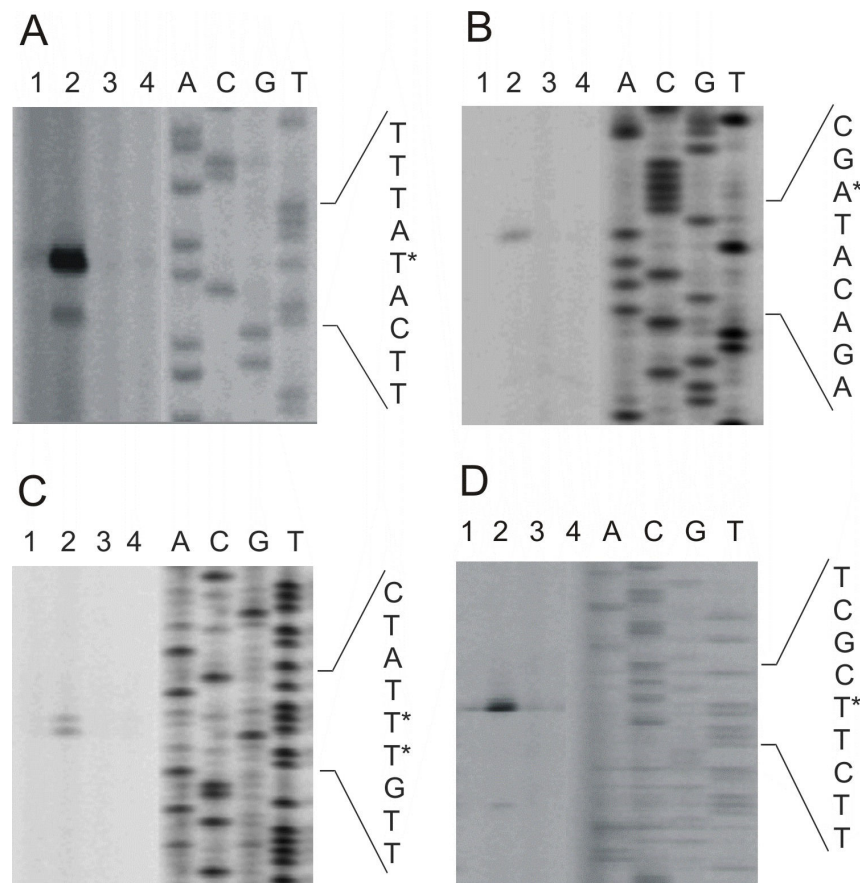
Die einzigen Ausnahmen bilden *elaA*, das für eine Acetyltransferase mit unbekannter Substratspezifität kodiert, und *cgIIIM*, das für eine 5-Cytosin-Methyltransferase kodiert. Stromaufwärts von *ptrB*, *hflX* und *NCgl0748* konnte zudem mit 5'-WCGC-N5-GCGW-3' ein DNA-Motiv gefunden werden, das große Ähnlichkeit zu der ClgR-Bindestelle vor *clpP1P2* und *clpC* besitzt.

**Tab. 7:** Transkriptomvergleich von *C. glutamicum*  $\Delta clpC$  und  $\Delta clpC\Delta clgR$ . Die Tabelle zeigt alle Gene, deren mRNA-Spiegel in der  $\Delta clpC$ -Mutante in mindestens zwei Experimenten 2-fach höher als in der Doppelmutante  $\Delta clpC \Delta clgR$  war. Es sind jeweils die Mittelwerte der Mediane mit der zugehörigen Standardabweichung (MW), die Ergebnisse des Student's T-Test (p-Wert), der Genname und die putative Funktion angegeben.

NCgl	Gen	Funktion	MW	p-Wert
0748		hypothetisches Protein	10,55 ± 0,93	1,3 x 10 <sup>-04</sup>
2507	<i>ptrB</i>	Endopeptidase	9,61 ± 1,19	4,18 x 10 <sup>-04</sup>
0747		hypothetisches Protein	5,38 ± 0,53	4,25 x 10 <sup>-04</sup>
0240		hypothetisches Protein	5,25 ± 1,03	1,95 x 10 <sup>-03</sup>
2327	<i>clpP1</i>	proteolytische Untereinheit der Clp-Protease	4,31 ± 1,01	3,72 x 10 <sup>-03</sup>
2328	<i>clpP2</i>	proteolytische Untereinheit der Clp-Protease	3,70 ± 0,12	1,23 x 10 <sup>-06</sup>
1359	<i>recN</i>	beteiligt an homologer Rekombination und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach UV-Schädigung	3,32 ± 0,58	3,11 x 10 <sup>-03</sup>
1357		putative rRNA-Methylase	2,93 ± 0,06	1,05 x 10 <sup>-04</sup>
854		hypothetisches Protein	2,83 ± 0,25	8,14 x 10 <sup>-04</sup>
2505		hypothetisches Protein	2,56 ± 0,48	5,64 x 10 <sup>-03</sup>
0241	<i>recR</i>	beteiligt an homologer Rekombination und Reparatur von Doppelstrangbrüchen nach UV-Schädigung	2,48 ± 0,53	8,13 x 10 <sup>-03</sup>
1887	<i>clgR</i>	Transkriptionsaktivator der <i>clpP1P2</i> - und <i>clpC</i> -Expression	2,36 ± 0,60	1,25 x 10 <sup>-02</sup>
2659	<i>elaA</i>	Acetyltransferase	2,26 ± 0,61	1,5 x 10 <sup>-02</sup>
1703	<i>cglIIM</i>	5-Cytosin-Methyltransferase	2,22 ± 0,18	1,1 x 10 <sup>-03</sup>
1881		hypothetisches Protein	2,22 ± 0,07	6,14 x 10 <sup>-06</sup>
1322	<i>uvrA</i>	UvrABC Exinuklease-Untereinheit A	2,04 ± 0,21	2,88 x 10 <sup>-03</sup>
1865	<i>hflX</i>	GTP-bindendes Protein	2,02 ± 0,19	2,25 x 10 <sup>-03</sup>

## 2.2 Relative Quantifizierung der Transkripte putativer Gene des ClgR-Regulons

Um die ClgR-Abhängigkeit der Transkriptionsaktivierung der identifizierten Gene genauer zu untersuchen, wurden Primer-Extension-Analysen mit allen Genen mit mehr als 3-fach erhöhtem mRNA-Gehalt und zusätzlich mit den Genen *recR*, *uvrA* und *hflX* durchgeführt. Der relative mRNA-Gehalt wurde, wie zuvor bereits für *clpP1P2* und *clpC* beschrieben (IV 1.1), in den Stämmen Wildtyp,  $\Delta clpC$ ,  $\Delta clgR$  sowie  $\Delta clpC \Delta clgR$  verglichen.

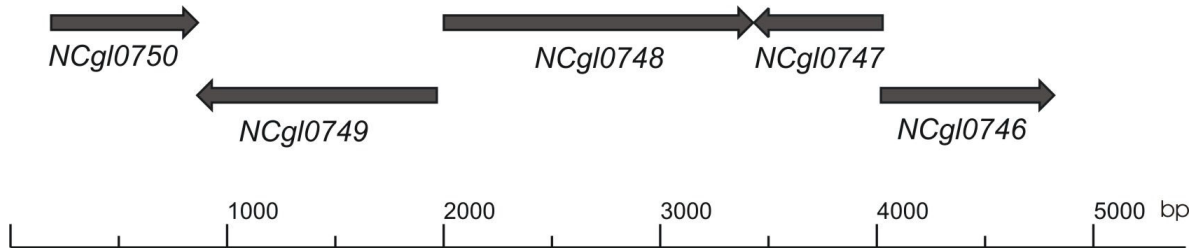


**Abb. 12:** Expressionsanalyse und Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der *C. glutamicum*-Gene *NCgl0748* (A), *ptrB* (B), *hflX* (C) und *NCgl0240* (D). 10 µg Gesamt-RNA von *C. glutamicum* ATCC1332 (1),  $\Delta clpC$  (2),  $\Delta clgR$  (3) und  $\Delta clpC\Delta clgR$  (4) wurden für die Primer-Extension-Analyse von *NCgl0748*, *ptrB* und *hflX* eingesetzt und 30 µg für die von *NCgl0240*. Die Transkriptionsstartpunkte sind mit einem Stern gekennzeichnet und konnten anhand der daneben aufgetragenen Sequenzierungsreaktionen identifiziert werden, die mit dem gleichen IRD800-markierten Oligonukleotid generiert wurden wie die Primer-Extension-Produkte.

Wie in Abb. 12 zu sehen, ist der mRNA-Gehalt von *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX* und *NCgl0240* in der  $\Delta clpC$ -Mutante, die wesentlich mehr ClgR enthält als der Wildtyp, deutlich erhöht. In der  $\Delta clgR$ -Mutante sowie in der Doppelmutante ist dieser Effekt des drastisch erhöhten mRNA-Gehaltes nicht sichtbar. Demnach ist ClgR auch ein Transkriptionsaktivator von *NCgl0748*, *hflX*, *ptrB* und *NCgl0240*.

Im Fall von *recR*, *recN*, *uvrA* und *NCgl0747* führte weder der Einsatz von 10 µg noch von 30 µg Gesamt-RNA in die Primer-Extension-Experimente zu einem eindeutigen Signal. Der mRNA-Gehalt von *recR*, *recN* und *uvrA* war möglicherweise zu niedrig, um mit der Primer-Extension-Methode bestimmt zu werden. Im Fall von *NCgl0747* können die widersprüchlichen Resultate der Primer-Extension- und DNA-Mikroarray-Analysen mit der Lokalisation von *NCgl0747* stromabwärts von und divergent zu *NCgl0748* erklärt werden (Abb. 13). Durch die erhöhte Expression von *NCgl0748* in der  $\Delta clpC$ -Mutante kommt es vermutlich zur Bildung größerer

Mengen Antisense-RNA von *NCgl0747*. Diese kann in den DNA-Mikroarray-Experimenten nicht von der entsprechenden mRNA unterschieden werden, da die Mikroarrays PCR-Produkte und nicht einzelsträngige Oligonukleotide als Sonden enthalten.



**Abb. 13:** Schematische Darstellung der Anordnung der Gene *NCgl0747* und *NCgl0748* im Genom von *C. glutamicum*.

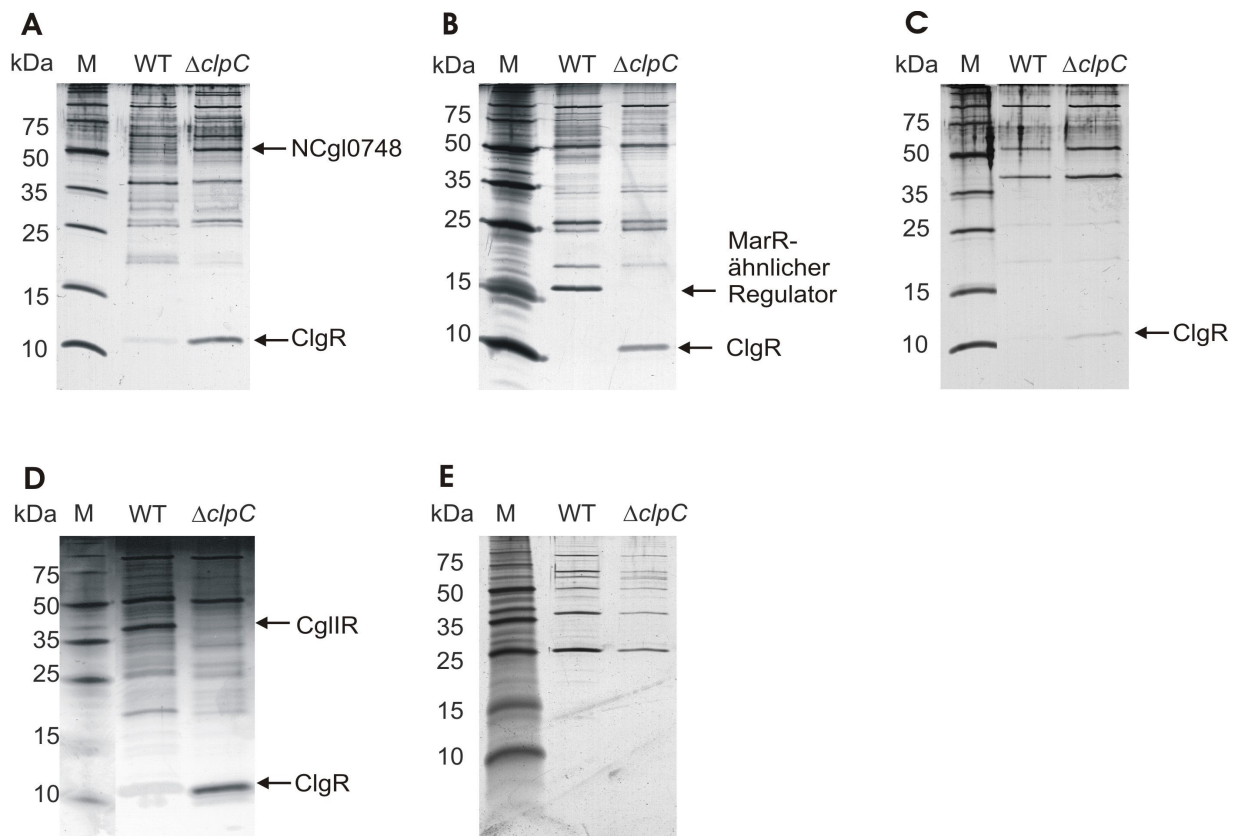
## 2.3 Untersuchung der Bindung von ClgR an weitere Zielpromotoren

### 2.3.1 Affinitätsreinigung mit ausgewählten Zielpromotoren

Um eine direkte Interaktion von ClgR mit den regulatorischen Regionen der in den DNA-Mikroarray- und Primer-Extension-Experimenten identifizierten putativen neuen Zielgene zu zeigen, wurde eine Affinitätsreinigung mit den an Dynabeads<sup>®</sup> Streptavidin gebundenen regulatorischen Regionen durchgeführt. Dieser Ansatz ermöglicht es, auch noch weitere regulatorische Proteine zu identifizieren, welche die Expression der untersuchten Gene kontrollieren. Mit den Promotorregionen von *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX* und *NCgl0240* wurde ClgR spezifisch aus dem Zellextrakt der  $\Delta clpC$ -Mutante, aber nicht aus dem des Wildtyps angereichert (Abb.14A-D). Mit der regulatorischen Region von *recN* konnte ClgR nicht angereichert werden (Abb. 14E). Außerdem wurde auch kein weiteres Protein spezifisch mit  $P_{recN}$  gereinigt, weder im Wildtyp noch der  $\Delta clpC$ -Mutante.

Neben ClgR konnten mit den an Dynabeads<sup>®</sup> Streptavidin gebundenen regulatorischen Regionen von *NCgl0748*, *ptrB* und *NCgl0240* auch noch andere Proteine spezifisch aus Wildtyp bzw.  $\Delta clpC$ -Rohextrakten angereichert werden. Zusammen mit ClgR konnte *NCgl0748* aus  $\Delta clpC$ -Rohextrakten mit der regulatorischen Region des eigenen Strukturgens gereinigt werden. Bei der im Wildtyp auf gleicher Höhe laufenden, aber deutlich schwächeren Bande handelte es sich nicht um *NCgl0748*. Da *NCgl0748* kein offensichtliches DNA-Bindemotiv enthält, könnte die Anreicherung auf einer Protein-Protein-Interaktion zwischen ClgR und *NCgl0748* beruhen. Mit  $P_{ptrB}$  konnte ein Protein mit Ähnlichkeit zu einem Transkriptionsregulator der MarR-Familie



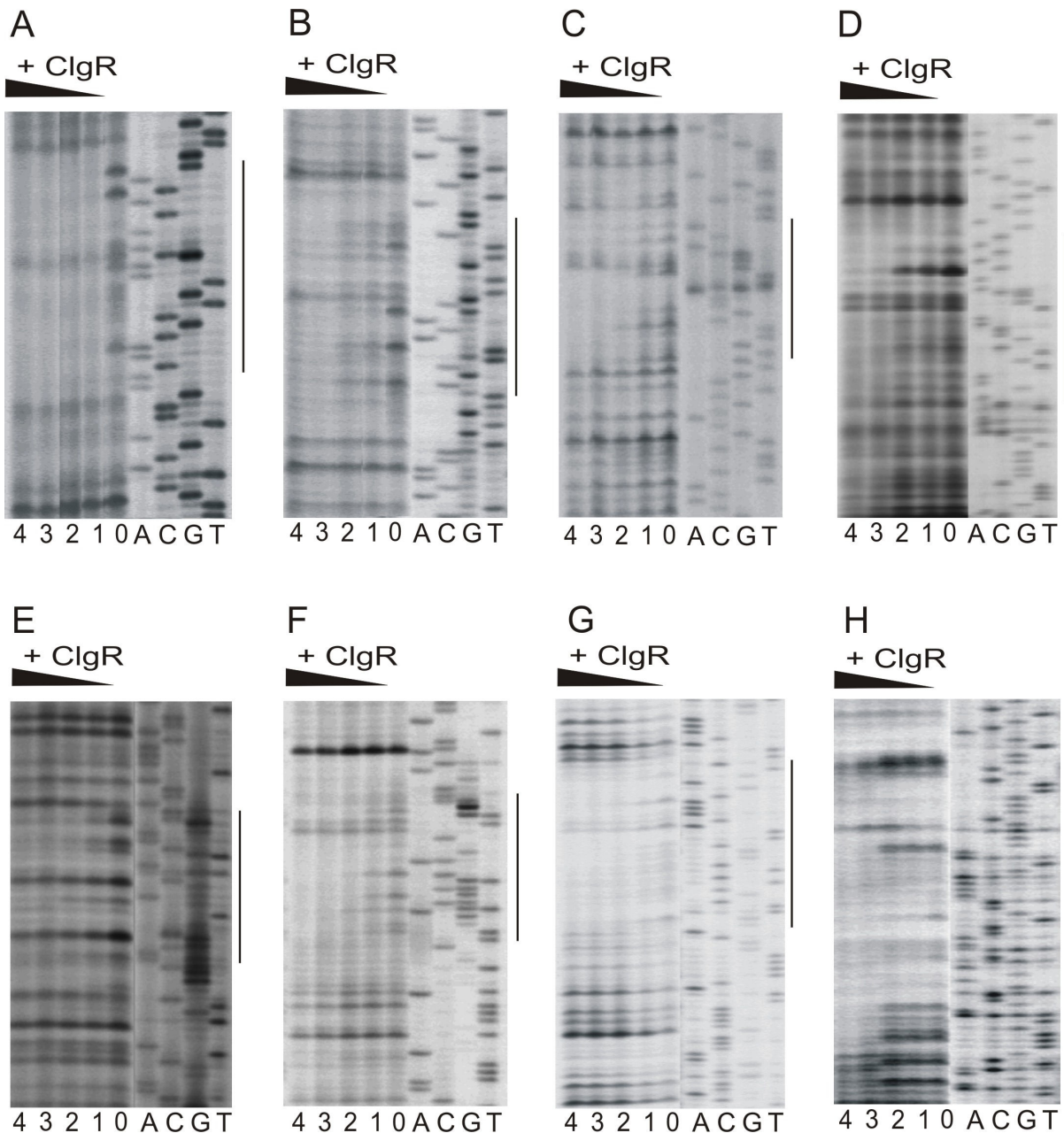


**Abb. 14:** DNA-Affinitätschromatographie mit den regulatorischen Regionen von *NCgl0748* (A), *ptrB* (B), *hflX* (C), *NCgl0240* (D) und *recN* (E) immobilisiert an Dynabeads® Streptavidin. Diese wurden zur Anreicherung von Regulator-Proteinen aus *C. glutamicum* ATCC13032 (WT) und  $\Delta clpC$  genutzt. Je 10  $\mu$ l der aufkonzentrierten Eluate wurden in einem 16,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und silbergefärbt. Die Protein-Identifizierung erfolgte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie der tryptisch verdauten Proteinbanden.

(NCgl2886) spezifisch aus den Rohextrakten des Wildtyps gereinigt werden. MarR ist ein Repressor des *mar*-Operon (multiple antibiotic resistance) und bindet als Dimer an die DNA, wobei jede Untereinheit eine geflügelte DNA-Bindedomäne enthält. Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* ist das *NCgl2886*-Regulatorgen bezüglich Sequenz und Lokalisation stromaufwärts von *uspA* (universal stress protein) konserviert. Mit der regulatorischen Region von *NCgl0240* wurde aus dem Wildtyp ebenfalls ein Protein gereinigt, dass in der  $\Delta clpC$ -Mutante nicht angereichert wurde. Dabei handelt es sich um die stress-sensitive Restriktions-Endonuklease CglIR (NCgl1704).

### 2.3.2 Identifikation der Bindungsstellen mittels DNase I-Footprint-Analysen

Zur genauen Lokalisation der ClgR-Bindungsstellen innerhalb der untersuchten Zielpromotoren, wurden DNase I-Footprint-Analysen durchgeführt. Stromaufwärts von *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX* und *NCgl0240* wurde ein Bereich durch ClgR mit C-terminalem StrepTag-II vor dem DNase I-Verdau geschützt (Abb. 15).



**Abb. 15:** DNase I-Footprint-Analyse zur Lokalisation der Bindung von ClgR-C an die regulatorischen Regionen von *NCgl0748* (A, B), *ptrB* (C, D), *hflX* (E, F) und *NCgl0240* (G, H). Aliquots von 0,12 pmol markiertem *NCgl0748* codierenden Strang (A, Primer-Paar orf1309-PE1/FP-orf1309-fw) und nicht-codierenden Strang (B, Primer-Paar FP-orf1309-fw3/FP-orf1309-rv2) sowie von *hflX* codierenden (E, Primer-Paar FP-hflX-rv2/FP-hflX-fw1) und nicht-codierenden Strang (F, Primer-Paar FP-hflX-fw2/FP-hflX-rv1) und 0,23 pmol *ptrB* codierenden (C, Primer-Paar FP-dapB-rv2/FP-dapB-fw1) und nicht-codierenden Strang (D, Primer-Paar FP-dapB-fw2/FP-dapB-rv1) sowie 0,24 pmol *NCgl0240* codierenden (G, Primer-Paar recX-IRD-2/P-recK-fw) und 0,3 nmol nicht-codierenden Strang (H, Primer-Paar recX-rv/FP-orf659-fw-IRD800) wurden mit verschiedenen ClgR-C-Mengen inkubiert: 0: kein Protein, 1: 22 nM, 2: 220 nM, 3: 2,2  $\mu$ M, 4: 6,6  $\mu$ M. Die geschützten Bereiche sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Sequenz dieser Bereiche kann anhand der daneben aufgetragenen Sequenzierungsreaktionen bestimmt werden, die jeweils mit den gleichen IRD800-markierten Oligonukleotiden durchgeführt wurden.



Vor *NCgl0748* erstreckt sich der geschützte Bereich von Position -45 bis -64 bezogen auf den Transkriptionsstart. Im Fall von *ptrB* war ein Bereich von -39 bis -61 durch ClgR geschützt, bei *hflX* von -45 bis -63 und bei *NCgl0240* von -49 bis -70. Bei genauer Untersuchung der durch ClgR geschützten Sequenzen wurde deutlich, dass vor *NCgl0748*, *ptrB* und *hflX* das Motiv 5'-WCGC-N5-GCGW-3' enthalten ist, das auch in den ClgR-Binderegionen vor *clpP1P2* und *clpC* vorkommt. Auch stromaufwärts von *NCgl0240* schützt ClgR einen Bereich, der dem bekannten ClgR-Bindemotiv ähnelt. In diesem Fall ist jedoch der palindromische Bereich mit 5'-WAGC-N5-GCGW-3' leicht verändert. Die Lokalisation der jeweiligen ClgR-Bindestellen bezogen auf die mittels Primer-Extension ermittelten Transkriptionsstartpunkte und putative Promotor-Sequenzen sind in Abb. 16 zu sehen.

#### *NCgl0748* Promotorregion

CACCTACAACCTC TGTTTCGCTTACAGCGTTGTTTCGG ATCGTAGCAATAGGAAATAGTTGCCTTGTAGATTGGTAAATATGAACTCTAATGGCT  
 GTGGATGTTG GACACAAGCGAATGTCGCAACAA GCCTAGCATCGTTATCCTTTA TCAACGGAACATCTAACCATTTA TACTTGAGATTACCGA  
 -50 -30 -10 \* +10  
 -35 -10

#### *ptrB* Promotorregion

TTCGGGGTGCAAATCA GAATGTCGCCAATGGCGAAACACACC AGCGTGCAGAAGATGTGCGTGACTAAGATCGGGGGCTATGTC TGAACGCCTA  
 AAGCCCCAGCTTTAG TCTTACAGCGGTTACCGCTTGTGT GCTCGCACGTCTTCTACACGCACTGATTCTAGCCCCGATACAGACTTGGCGAT  
 -50 -30 -10 \* +10  
 -35 -10

#### *hflX* Promotorregion

TGTTTATGGTGGCT TGATCGCTCACGGCGTTG CC GACACCTAGCCTTGGCGACAGCAGCTGAAACAATAGATAAACAATGGATGAAAAGA  
 ACAAATACCAC CGAACTAGCGAGTGC CGCAACGGC CTGTGGATCGGAACCGCTGTCGTCTGCACTTTGTTATCTATTTGT TACCTACTTTTCT  
 -50 -30 -10 \*\* +10  
 -35 -10

#### *NCgl0240* Promotorregion

TTGCTCAGGAACTCGGCGCGAAACCTT TGTAAGACTCGTTTGTAAAGCCGAGAGCGAACCTGCCAAAAGTAAG GGGCGGGTTCGCGGTGACGTC  
 AACGAGTCCCTTGAGCCGCGCTTTGAAACATTCTGAG CAAACATTCGGCTCTCGCTTGG ACGGTTTTTCATTCCCGCCCAAGCGCCACTGCAG  
 -90 -70 -50 -30  
 -10 \* +10  
 GGTAGGATCGAGCGAAGAAACCAACAACCTTCTTAGGAGCCATTCTCATGACCCAGC  
 CCATCCTAGCTCGCTCTTTGGTTGTTTGAAGAATCCTCGGTAAGAGTACTGGGTCTG  
 -10

**Abb. 16:** Regulatorische Regionen der *C. glutamicum* *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX* und *NCgl0240* Gene. Die durch ClgR-C geschützten Bereiche sind schwarz hinterlegt und die unvollständig palindromischen Sequenzen durch Pfeile gekennzeichnet. Mögliche -10 und -35 Sequenzen sind unterstrichen und die Transkriptionsstartpunkte mit einem Stern markiert. Der Beginn des translatierten Bereichs ist kursiv gedruckt.

Stromaufwärts der anderen Gene, deren mRNA-Gehalt in den DNA-Mikroarray-Ergebnissen erhöht war, konnte kein ähnliches Sequenzmotiv gefunden werden. Das deutet darauf hin, dass ClgR diese Gene nicht direkt reguliert. Zur Kontrolle, dass es nicht ein weiteres Sequenzmotiv gibt, welches von ClgR erkannt wird, wurden auch DNase I-Footprint-Experimente mit den regulatorischen Regionen von *NCgl0747*, *recR*, *recN* und *uvrA* durchgeführt. Dabei wurde kein durch ClgR-C geschützter Bereich sichtbar. Entsprechend gibt es keine Hinweise darauf, dass ClgR auch an ein anderes DNA-Motiv als das oben beschriebene bindet.

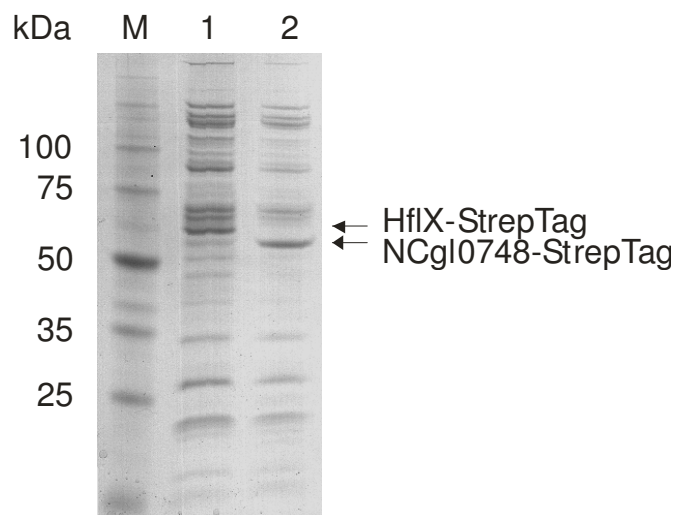
## 2.4 Untersuchungen zur Funktion von NCgl0748 und HflX

Anhand der vorliegenden Daten über PtrB und RecR aus *E. coli* können auch Rückschlüsse über die Funktion der orthologen Proteine in *C. glutamicum* gezogen werden (Aminosäure-Sequenzidentität liegt für PtrB bei 37% und für RecR bei 43%). Im Gegensatz dazu ist über die Funktion von NCgl0748, dessen Expression in Gegenwart von ClgR am stärksten erhöht ist, bisher noch nichts bekannt. Abgesehen von der Tatsache, dass HflX das Sequenzmotiv eines GTP-bindenden Proteins enthält, ist auch dessen Funktion bisher noch ungeklärt. Deshalb wurden nachfolgend einige Experimente durchgeführt, um mehr über die Funktion von NCgl0748 und HflX zu erfahren.

### 2.4.1 Anfügen von StrepTag-II codierenden Sequenzen an die chromosomalen NCgl0748- und hflX-Gene

Mit diesem Ansatz sollten NCgl0748 und HflX über Affinitätschromatographie unter milden Bedingungen gereinigt werden, um eventuell assoziierte Proteine, die Aufschluss über die Funktion von NCgl0748 und HflX geben könnten, zu identifizieren. Zur Isolierung *in vivo* an NCgl0748 und HflX gebundener Proteine wurden die chromosomalen Gene *NCgl0748* und *hflX* am 3'-Ende mit einer StrepTag-II-kodierenden Sequenz modifiziert. Dadurch wurden Kopienzahl-Artefakte vermieden, wie sie bei Verwendung von plasmidkodierten Derivaten auftreten hätten können. Dazu wurde jeweils der 3'-terminale Bereich der Gene mit Primern, die auch den StrepTag-II kodierten (bei NCgl0748: Strep-orf1309-fw/-rv; bei HflX: Strep-hflX-fw/-rv), durch PCR amplifiziert und über die *SphI*- und *HindIII*-Schnittstellen in den Vektor pK18mob kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden mittels Elektroporation in *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert und die Transformanten auf Kanamycin-haltigen Platten isoliert. Parallel wurden die Plasmide auch in *C. glutamicum*  $\Delta$ *clpC* transferiert. Diese Ansätze lieferten jedoch keine Transformanten. Da die Plasmide in *C. glutamicum* nicht replizieren können, muss bei kanamycinresistenten Klonen eine Integration der Plasmide ins Genom

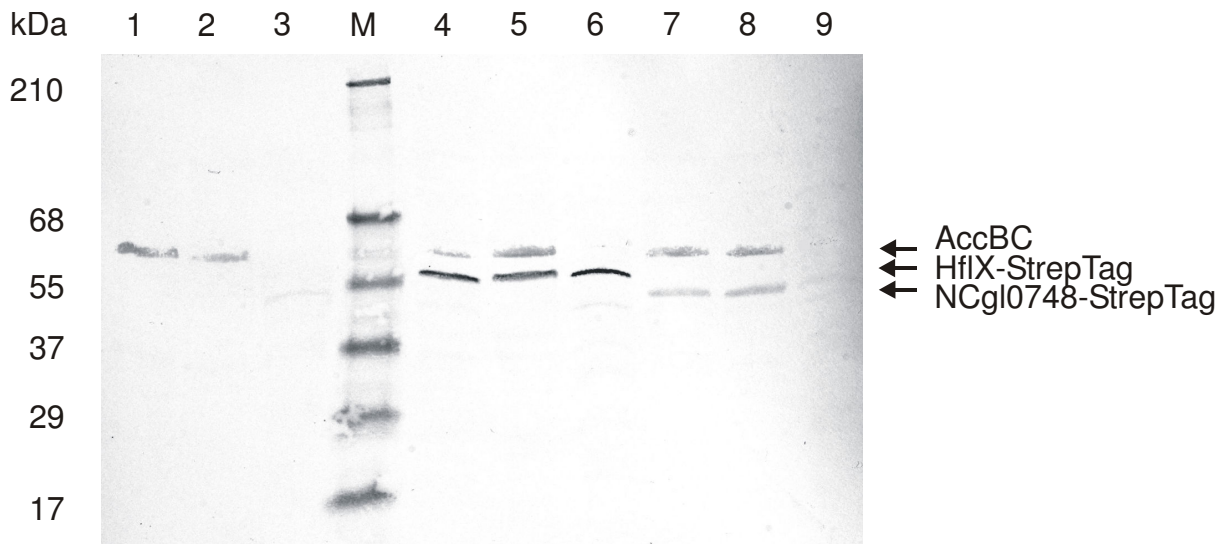
stattgefunden haben. Die erhaltenen Stämme *C. glutamicum* NCgl0748::pK18mob-NCgl0748-strep und hflX::pK18mob-hflX-strep wurden durch Kolonien-PCR mit den Primer-Paaren M13-fw-24mer/orf1309-out-fw bzw. M13-fw-24mer/hflX-out-fw überprüft. Die Aufreinigung der getaggtten Proteine aus der cytosolischen Fraktion erfolgte mit einer StrepTactin-Affinitätssäule und Elutionspuffer ohne NaCl. Die Eluate wurden ca. 10-fach mit Microcon-3 Mikrokonzentratoren aufkonzentriert und nach Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Gel nach Schägger silbergefärbt. Es zeigte sich, dass auch unter diesen milden Bedingungen keine Proteine spezifisch mit NCgl0748-StrepTag-II bzw. HflX-StrepTag-II mitgereinigt wurden (Abb. 17). Alle anderen im Eluat nachweisbaren Proteine interagierten unter den Niedrigsalz-Bedingungen vermutlich unspezifisch mit dem Säulenmaterial und traten durch die starke Aufkonzentrierung der Proben hier so deutlich hervor. Neben der Aufreinigung der getaggtten Proteine aus der cytosolischen Fraktion wurde aus *C. glutamicum* hflX::pK18mob-hflX-strep auch das gewaschene Membranpellet mit Dodecylmaltosid (2g DDM/g Protein) versetzt und eine StrepTactin-Affinitätschromatographie mit solubilisierten Membranproteinen durchgeführt. Dabei konnten jedoch nur sehr geringe Proteinmengen angereichert werden, so dass eine Identifizierung der einzelnen Proteine mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nicht möglich war.



**Abb. 17:** Anreicherung von HflX und NCgl0748 nach Anfügen von StrepTag-II codierenden Sequenzen an die chromosomalen *NCgl0748*- und *hflX*-Gene und Reinigung mittels StrepTactin-Sepharose unter Niedrigsalz-Bedingungen. Die Eluate von *C. glutamicum* hflX::pK18mob-hflX-strep (1) und NCgl0748::pK18mob-NCgl0748-strep (2) wurden 10-fach aufkonzentriert, je 10 µl in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und silbergefärbt. Die Identifizierung von HflX-StrepTag (57 kDa) und NCgl0748-StrepTag (53 kDa) erfolgte nach weiterer Aufkonzentrierung der Proben und MALDI-TOF-Massenspektrometrie der tryptisch verdauten Proteinsbanden aus coomassie-gefärbten Gelen.

### 2.4.2 Lokalisation von NCgl0748 und HflX über Anti-StrepTag-Westernblot

Zur Lokalisation von NCgl0748 und HflX in der Zelle wurde eine Western-Blot-Analyse mit Rohextrakten, löslicher Proteinfraction (Überstand nach Ultrazentrifugation des Rohextraktes) und Membranproteinfraction (resuspendiertes Sediment der Ultrazentrifugation) durchgeführt. NCgl0748-StrepTag-II konnte im Rohextrakt und in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen werden, nicht aber in der Membranfraction (Abb. 18). Demnach handelt es sich bei NCgl0748 um ein cytosolisches Protein. Dies wurde auch durch das Fehlen von vorhergesagten Transmembranhelices durch Hydrophobizitätsanalyse bestätigt. HflX-StrepTag-II konnte nicht nur im Rohextrakt und der löslichen Proteinfraction detektiert werden, sondern auch in der Membranfraction. In *E. coli* wird *hflX* zusammen mit *hflC* und *hflK* in einem Operon kodiert. *hflC* und *hflK* kodieren für Membranproteine, welche die Funktion einer membranassoziierten Protease modulieren (Kihara *et al.*, 1996). *C. glutamicum* besitzt ebenfalls Gene, die für FtsH und HflC kodieren. Die Primärsequenz von HflX weist keine putativen Transmembranhelices auf. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse handelt es sich bei HflX um ein cytosolisches Protein, das allerdings mit der Cytoplasmamembran und/oder einem membranassoziierten Protein interagieren kann. Neben HflX-StrepTag und NCgl0748-StrepTag war in den Rohextrakten und löslichen Fractionen aller Stämme noch eine zusätzliche Bande im Größenbereich um 60 kDa nachweisbar. Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit

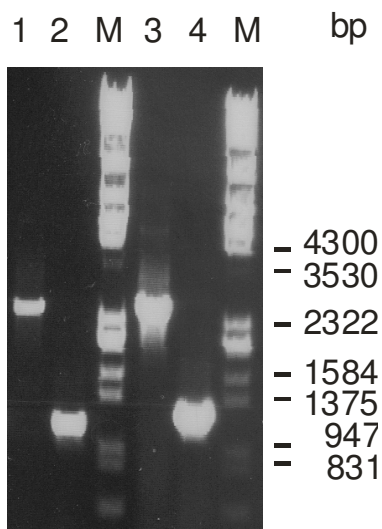


**Abb. 18:** Anti-StrepTag-Western-Blot zum Nachweis von HflX-strep und NCgl0748-strep. Je 100 µg Protein von Rohextrakt (1, 4, 7), löslicher Fraction (2, 5, 8) und Membranfraction (3, 6, 9) der Stämme *C. glutamicum* ATCC13032 (1-3), *hflX::pK18mob-hflX-strep* (4-6) und *NCgl0748::pK18mob-NCgl0748-strep* (7-9) wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion des StrepTag-II erfolgte mit einem StrepTactin-alkalische-Phosphatase-Konjugat und den Farbstoffen BCIP und NBT. Trotz Maskierung mit Avidin war auch die biotinylierte  $\alpha$ -Unterheit der Acyl-CoA-Carboxylase (AccBC), nachweisbar.

um die  $\alpha$ -Untereinheit der Acyl-CoA-Carboxylase (AccBC), ein biotinyliertes Protein, das trotz Inkubation des Western-Blots mit Avidin (Sigma, Seelze), nachweisbar war. Biotinylierte Proteine können das StrepTactin-alkalische Phosphatase-Konjugat mit hoher Affinität binden und sollten deshalb durch Inkubation mit Avidin maskiert werden.

### 2.4.3 Konstruktion und phänotypische Charakterisierung von *NCgl0748*- und *hflX*-Deletionsmutanten

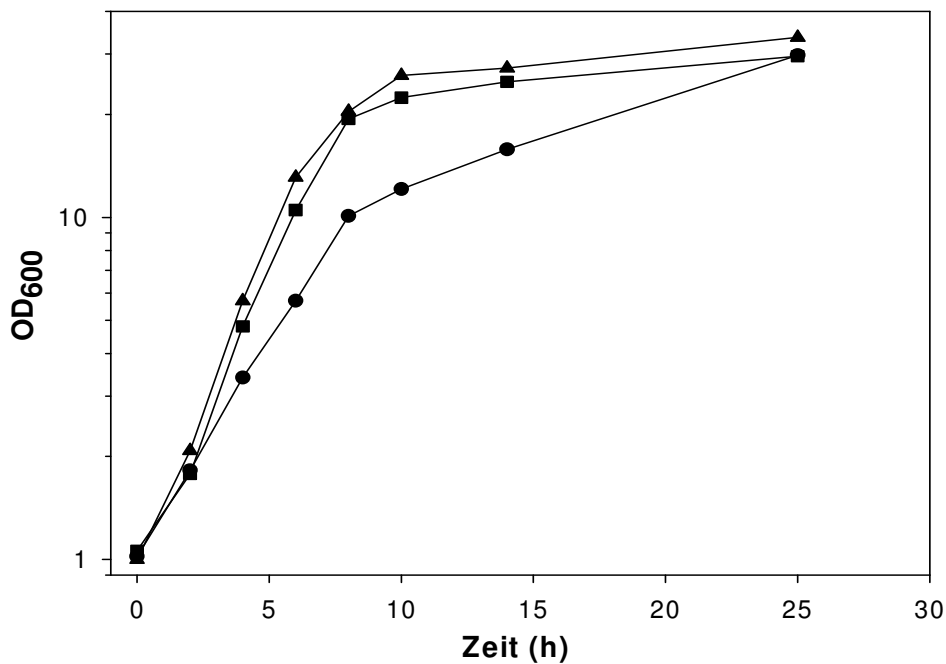
Um Anhaltspunkte über die Funktion von *NCgl0748* und *HflX* zu bekommen, wurden Mutanten konstruiert, in denen der für *NCgl0748* bzw. *HflX* kodierende Bereich *in frame* deletiert war. Die erfolgreiche Deletion wurde durch Kolonien-PCR überprüft. Mit den Primern *hflX*-out-fw/*hflX*-out-rv ergab sich für den Wildtyp eine Fragmentgröße von 2599 bp und für die  $\Delta$ *hflX*-Mutante von 1144 bp, während mit den Primern *orf1309*-out-fw/*orf1309*-out-rv im Wildtyp ein 2549 bp-Fragment und in der  $\Delta$ *NCgl0748*-Mutante ein 1197 bp-Fragment generiert wurde. In Abb.19 ist zu erkennen, dass eine  $\Delta$ *hflX*- und eine  $\Delta$ *NCgl0748*-Mutante erhalten wurden.



**Abb. 19:** Kolonien-PCR zur Kontrolle der Deletion von *hflX* und *NCgl0748*. Saccharoseresistente und kanamycinsensitive Klone wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden *hflX*-out-fw/*hflX*-out-rv (1 und 2) bzw. *orf1309*-out-fw/*orf1309*-out-rv (3 und 4) analysiert. Die PCR-Produkte in Spur 2 und 4 zeigen das erwartete Resultat für die beiden Deletionsmutanten, während die PCR-Produkte in Spur 1 und 3 das Resultat für die jeweilige Wildtyp-Situation zeigen. M:  $\lambda$ -DNA-Längenstandard II und III (Roche Diagnostics, Mannheim).

Bei der phänotypischen Charakterisierung zeigte sich, dass die  $\Delta$ *hflX*-Mutante hinsichtlich Zellmorphologie und Wachstumsverhalten in LB-Medium mit 4% Glucose (Abb. 20), mit dem Wildtyp übereinstimmt. Die Zellen der  $\Delta$ *NCgl0748*-Mutante waren dagegen durchschnittlich etwa 20% länger als der Wildtyp und die Wachstumsrate in der exponentiellen Phase war

niedriger als die der beiden anderen Stämme. Alle Stämme erreichten allerdings die gleiche End-OD<sub>600</sub>.



**Abb. 20:** Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 (■),  $\Delta hflX$  (▲) und  $\Delta NCgl0748$  (●) in LB-Medium mit 4 % Glucose.

#### 2.4.4 Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC 13032, $\Delta NCgl0748$ und $\Delta hflX$

Um Veränderungen im Proteinmuster der Mutanten  $\Delta NCgl0748$  und  $\Delta hflX$  gegenüber dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 festzustellen und darüber eventuell Rückschlüsse auf deren Funktion ziehen zu können, wurden die löslichen Proteine der genannten Stämme durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden jeweils 300  $\mu\text{g}$  Protein aus drei unabhängigen Kultivierungen in LB-Medium mit 4% Glucose (OD<sub>600</sub> ca. 4) einer isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich von 4,5 – 5,5 unterzogen. Unterschiede im Proteinmuster wurden mit der ProteomWeaver-Software (Version 1.13; Definiens Imaging GmbH, München) analysiert und quantifiziert. Die in ihrer Intensität mindestens zweifach veränderten Proteine wurden durch eine Peptidmassenfingerprintanalyse identifiziert. In Tabelle 8 sind die Proteine, die einen mindestens zweifach veränderten Proteinspiegel in *C. glutamicum*  $\Delta NCgl0748$  im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen und signifikant verändert waren (p-Wert  $\leq 0,2$  im t-Test nach Student), aufgelistet.

**Tabelle 8:** Proteine, die im Vergleich *C. glutamicum*  $\Delta$ NCgl0748/Wildtyp eine veränderte Konzentration zeigten. Es sind nur solche Spots aufgeführt, die in mindestens zwei von drei Versuchen auswertbar waren, deren Standardabweichung innerhalb einer Gruppe bei <70% lag und die einen p-Wert  $\leq 0,2$  (t-Test nach Student) hatten.

NCBI	Gen	Annotation	Protein-Spiegel	p-Wert	Mass <sub>theor.</sub> [kDa]	Mass <sub>exp.</sub> [kDa]
NCgl0478	<i>fusA</i>	Translations-Elongationsfaktor EF-G	2,73	0,05	77,9	40 - 45
NCgl2621	<i>groEL</i>	GroEL2	2,36	0,11	58,9	55 - 60
NCgl1982	<i>glnB</i>	PII-Signaltransduktionsprotein	2,10	0,04	12,2	11
NCgl1835	<i>ppgK</i>	Polyphosphat-Glucokinase	2,02	0,04	28	25 - 30
NCgl2268	<i>gpm</i>	Phosphoglycerat-Mutase	0,49	0,04	26,2	20 - 25
NCgl1514	<i>zwf2</i>	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0,49	0,03	54,2	50

Insgesamt zeigten vier Proteine eine signifikant erhöhte und zwei eine signifikant erniedrigte Konzentration in der  $\Delta$ NCgl0748-Mutante. Zu den Proteinen mit erhöhter Konzentration gehörten ein Translationsfaktor, ein Chaperon, ein regulatorisches Protein des N-Stoffwechsels sowie eine Polyphosphat-Glucokinase, die keine offensichtlichen Rückschlüsse auf die Funktion von NCgl0748 erlauben. Das Gleiche trifft auch für HflX zu. Die vier Proteine, deren Konzentration in der  $\Delta$ hflX-Mutante ca. zweifach gegenüber dem Wildtyp verändert war, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9:** Proteine, die im Vergleich *C. glutamicum*  $\Delta$ hflX/Wildtyp eine veränderte Konzentration zeigten. Weitere Erläuterungen wie in Tabelle 8.

NCBI	Gen	Annotation	Protein-Spiegel	p-Wert	MW [kDa] <sub>theor.</sub>	MW [kDa] <sub>exp.</sub>
NCgl2765	<i>pck</i>	PEP-Carboxykinase	2,31	0,05	66,8	75 - 90
NCgl0976		Hypothetisches Protein	2,07	0,07	35,3	40
NCgl0634	<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	1,86	0,04	80,8	75 - 90
NCgl2919		putative 2-Hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioate-Isomerase	0,56	0,06	27,8	25

#### 2.4.5 Transkriptomvergleich von *C. glutamicum* ATCC 13032 und $\Delta NCgl0748$

Da die bisherigen Versuche keine Hinweise auf die Funktion des Proteins NCgl0748 erbracht hatten, wurde in einem weiteren Versuch die mRNA-Menge aller Gene der Stämme *C. glutamicum*  $\Delta NCgl0748$  und Wildtyp durch Transkriptom-Analyse mit DNA-Mikroarrays miteinander verglichen. Die Versuche wurden nach Kultivierung in LB-Medium, in CGXII-Medium und in LB-Medium mit zusätzlich 1% (w/v) Ammoniumsulfat durchgeführt. Alle Medien enthielten 4 % Glucose.

Eine komplette Liste aller Gene, deren mRNA-Menge im Vergleich  $\Delta NCgl0748$ /Wildtyp in LB-Medium  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  war (Mittelwert der Mediane aus drei unabhängigen Experimenten) ist im Anhang zu finden (Tabelle 10). Mit 3,8 % aller Gene waren relativ viele in ihrer mRNA-Menge verändert. Ein großer Teil dieser Veränderungen, wie z. B. das Auftreten zahlreicher Gene für ribosomale Proteine, war auf die unterschiedlichen Wachstumsraten der Stämme zurückzuführen. Diese veränderten mRNA-Mengen wurden deshalb nicht berücksichtigt. Auffällig war, dass viele am Stickstoff-Stoffwechsel beteiligte Gene in der  $\Delta NCgl0748$ -Mutante eine sehr stark erhöhte mRNA-Menge aufwiesen (Tabelle 11). Dazu gehörten u. a. die Urease und akzessorische Proteine, Aminotransferasen, Amid-bindende Proteine, Aminosäure- und Ammonium-Transporter. Die z. T. über 10-fach erhöhte mRNA-Menge dieser Gene deutete auf einen Zusammenhang zwischen NCgl0748 und dem N-Stoffwechsel hin. Da es sich bei einigen um integrale Membranproteine bzw. membran-assoziierte Proteine handelt, war es auch nicht möglich, diese mittels 2D-Gelelektrophorese nachzuweisen. Für das PII-Signaltransduktionsprotein konnte bei Kultivierung in LB-Medium sowohl ein erhöhter mRNA- wie auch ein erhöhter Protein-Spiegel nachgewiesen werden. Protein- und mRNA-Spiegel weichen jedoch relativ stark voneinander ab, wie auch die mRNA-Verhältnisse der einzelnen Experimente.

Um zu testen, ob der erhöhte mRNA-Spiegel der N-Stoffwechsel-Gene in  $\Delta NCgl0748$  auf einer aus unbekanntem Gründen früher als im Wildtyp einsetzenden N-Limitation beruht, wurde der Transkriptomvergleich  $\Delta NCgl0748$  vs. Wildtyp auch nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glucose durchgeführt. Der Stickstoffgehalt dieses Mediums (469 mM) liegt vermutlich deutlich über dem von LB-Medium, der nicht genau bekannt ist. Nach Wachstum in CGXII-Medium war der mRNA-Spiegel von nur 8 Genen in der Mutante signifikant verändert (Tabelle 12). Einen erhöhten mRNA-Spiegel wiesen die Gene *malE*, *malF* und *malG* auf, die für einen Trehalose/Maltose-Transporter bzw. ein Trehalose/Maltose-



Bindeprotein kodieren. Die nach Kultivierung in LB-Medium mit Glucose in ihrer Expression veränderten Gene aus dem N-Stoffwechsel waren unter diesen Bedingungen unverändert. Da in allen Versuchen der mRNA-Spiegel von *NCgl0748* in der  $\Delta NCgl0748$ -Mutante deutlich erniedrigt war, ist nicht davon auszugehen, dass der beobachtete Effekt auf die Verwendung falscher Stämme zurückzuführen ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die  $\Delta NCgl0748$ -Mutante entweder einen höheren N-Bedarf hat als der Wildtyp und dadurch in LB-Medium früher N-Mangelbedingungen eintreten oder dass die N-Regulation so verändert ist, dass die Induktion der N-Mangelgene bei einer höheren N-Konzentration als im Wildtyp ausgelöst wird.

**Tabelle 11:** Auszug aus dem Transkriptomvergleich von *C. glutamicum*  $\Delta NCgl0748$  mit dem Wildtyp nach Kultivierung in LB-Medium mit 4% Glucose. Es sind die Mittelwerte (Mutante/Wildtyp) der Mediane aus drei unabhängigen Experimenten ( $\emptyset$ ), die Standardabweichung (SD) und die Ergebnisse des Student's t-Test (p-Wert) der im Text erwähnten Gene angegeben. (Gesamttabelle Nr. 10 siehe Anhang)

ORF	NCBI	Annotation	$\emptyset$	SD	p-Wert
454	NCgl0074	Virginiamycin S Resistenz-Protein	10,86	5,36	0,012
455	NCgl0075	Creatinin-Deaminase	10,63	3,84	0,004
466	NCgl0083	Urease Gamma-Untereinheit UreA	6,85	1,43	0,002
467	NCgl0084	Urease Beta-Untereinheit UreB	10,05	0,95	0,009
468	NCgl0085	Urease Alpha-Untereinheit UreC	12,23	0,53	0,002
470	NCgl0087	Urease-Akzessorisches-Protein UreF	7,71	0,98	0,001
471	NCgl0088	Urease-Akzessorisches-Protein UreG	2,94	1,05	0,016
472	NCgl0089	Urease-Akzessorisches-Protein UreD	3,33	0,19	0,000
575	NCgl0182	Glutamin 2-Oxoglutarat-Aminotransferase GltD	15,81	3,98	0,001
1498	NCgl0893	Amid-Harnstoff bindendes Protein FmdD	18,30	14,79	0,012
1500	NCgl0895	Leucin-Transporter LivM	12,46	2,13	0,001
1501	NCgl0896	Transporter verzweigtkettiger Aminosäuren LivG	5,32	1,36	0,004
2173	NCgl1981	[PII]-Adenylyltransferase GlnD	6,86	3,28	0,011
2175	NCgl1982	PII-Signaltransduktionsprotein GlnK	7,36	2,07	0,003
2176	NCgl1983	Ammoniumtransporter AmtB	5,89	3,53	0,017
2480	NCgl1521	Ammoniumtransporter Amt	32,82	24,53	0,008
2935	NCgl2327	ClpP2	1,94	0,69	0,044

Um das genauer zu untersuchen, wurden der Transkriptom-Vergleich  $\Delta NCgl0748$ -Mutante vs. Wildtyp auch nach Kultivierung in LB-Medium mit 4% Glucose und 1% Ammoniumsulfat durchgeführt. Die vollständige Liste der veränderten Gene ist im Anhang zu finden (Tabelle 13). Sie zeigt, dass nach Supplementation von LB-Medium mit 1% Ammonium der mRNA-Spiegel der am N-Stoffwechsel beteiligten Gene nicht mehr erhöht war.

**Tabelle 12:** Transkriptomvergleich von *C. glutamicum*  $\Delta NCgl0748$  vs. *C. glutamicum* Wildtyp nach Kultivierung in CGXII-Medium mit 4% Glucose. Die Tabelle zeigt alle Gene, deren mRNA-Spiegel mindestens 2-fach verändert war. Es sind jeweils die Mittelwerte der Mediane ( $\emptyset$ ) mit der zugehörigen Standardabweichung (SD) und die Ergebnisse des Student's t-Test (p-Wert) angegeben.

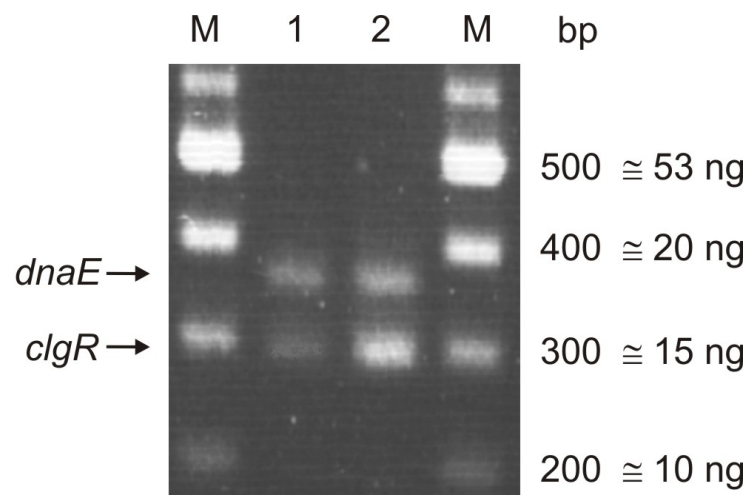
ORF	NCBI	Annotation	Exp. 1	Exp. 2	$\emptyset$	SD	p-Wert
1155	NCgl0626	Kohlenstoff-Speicherprotein CstA	0,29	0,38	0,33	0,06	0,034
1309	NCgl0748	Hypothetisches Protein Rv3195	0,20	0,30	0,25	0,07	0,042
2748	NCgl1253	Thiamin-Biosynthese-Protein ThiA	0,49	0,60	0,55	0,07	0,047
1242	NCgl0694	Trehalose/Maltose Transporter MalG	2,67	3,76	3,21	0,77	0,048
1243	NCgl0695	Trehalose/Maltose Transporter MalF	2,39	2,76	2,57	0,26	0,025
1244	NCgl0696	Hypothetisches Protein	3,00	2,82	2,91	0,13	0,008
1245	NCgl0697	Trehalose/Maltose Bindepotein MalE	3,79	3,61	3,70	0,13	0,004
1247	NCgl0699	Hypothetisches Protein TcsE	2,02	1,88	1,95	0,09	0,015

### 3. Versuche zur Regulation der ClgR-Aktivität

Die bisherigen Untersuchungen haben sich mit der Identifizierung der Zielgene des Transkriptionsaktivators ClgR und ihrer Funktion beschäftigt. Nun stellt sich die Frage, wie ClgR selbst reguliert wird. Aktives ClgR (bezogen auf die Fähigkeit an DNA zu binden) konnte durch DNA-Affinitätschromatographie mit den untersuchten Promotorregionen nur aus der  $\Delta clpC$ -Mutante gereinigt werden. Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Die Aktivität von ClgR könnte auf der Ebene der Transkription oder der mRNA-Stabilität, durch Veränderung der DNA-bindenden Eigenschaften oder eine erhöhte ClgR-Halbwertszeit reguliert werden. Bei einem Vergleich der Transkriptome von *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clpC$  war der mRNA-Spiegel von *clgR* in der  $\Delta clpC$ -Mutante nur 1,5-fach höher als im Wildtyp (S. Schaffer, unpublizierte Ergebnisse). Das deutet darauf hin, dass ClgR nicht oder nur geringfügig auf der Ebene der Transkription oder der mRNA-Stabilität reguliert wird. Die Regulation von ClgR wurde mit verschiedenen Ansätzen untersucht.

### 3.1 Quantifizierung der mRNA-Menge von *clgR* in *C. glutamicum* ATCC13032 und $\Delta clpC$ -Mutante

Um die DNA-Mikroarray-Ergebnisse unabhängig zu bestätigen, wurde die mRNA-Menge von *clgR* im Wildtyp und der  $\Delta clpC$ -Mutante mittels RT-PCR quantifiziert. Dazu wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA von Wildtyp bzw.  $\Delta clpC$ -Mutante mit *clgR*- und *dnaE*-spezifischen Antisense-Oligonukleotiden inkubiert. Das *dnaE*-Gen kodiert für die  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III und wurde als interner Standard verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe von reverser Transkriptase bei 42°C. 2  $\mu\text{l}$  dieses 20  $\mu\text{l}$ -Ansatzes wurden als Matrize für die anschließende PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Mengen nach Färbung mit Ethidiumbromid mit Hilfe des Molekulargewichtstandards abgeschätzt.



**Abb. 21:** Quantifizierung der mRNA-Menge von *clgR* in *C. glutamicum* ATCC13032 (1) und  $\Delta clpC$  (2) durch RT-PCR. Je 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA und Oligonukleotide gegen *clgR* und *dnaE* (interner Standard) wurden für die reverse Transkription eingesetzt. 10  $\mu\text{l}$  der anschließenden PCR wurden in einem 2 %igen (w/v) Agarosegel zusammen mit einem DNA Größenstandard (M, 100 bp ladder, Roche) aufgetrennt. Die Transkriptmenge kann anhand der Standard-Mengen abgeschätzt werden.

Die eingesetzte mRNA-Menge von *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clpC$  war vergleichbar, weil die *dnaE*-spezifische Bande in beiden Stämmen die gleiche Intensität aufwies (Abb. 21). Die Bandenintensität von *clgR* konnte durch Vergleich mit den Banden des Molekulargewichtsmarkers und den definierten DNA-Mengen abgeschätzt werden. Demnach ist der mRNA-Gehalt von *clgR* in der  $\Delta clpC$ -Mutante etwa zweifach höher als im Wildtyp. Ein 1,5-fach (DNA-Mikroarray-Ergebnisse) bzw. zweifach (RT-PCR) erhöhter mRNA-Gehalt kann jedoch nicht den Unterschied, der auf Proteinebene beobachtet wurde, erklären. Demnach wird

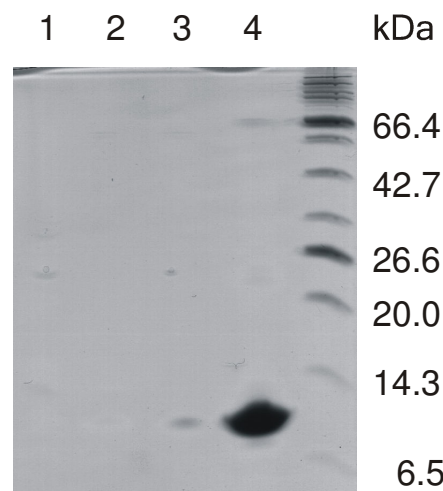
ClgR hauptsächlich auf Ebene der Translation bzw. post-translational, z. B. durch Degradation oder Modulation der DNA-bindenden Eigenschaften, reguliert.

### 3.2 Untersuchung der Stabilität von ClgR in der $\Delta clpC$ -Mutante

Mittels Affinitätsreinigung mit DNA-beladenen Dynabeads konnte ClgR nur aus der  $\Delta clpC$ -Mutante und nicht aus dem Wildtyp gereinigt werden. Um herauszufinden, ob ClgR im Wildtyp nicht an DNA bindet oder abgebaut wird, wurde die Stabilität von ClgR in diesen Stämmen genauer untersucht. Dazu wurde ClgR plasmid-kodiert mit einem C-terminalen StrepTag-II in *C. glutamicum*  $\Delta clgR$  bzw.  $\Delta clgR\Delta clpC$  überproduziert und über StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Ein direkter Nachweis von nativem ClgR erfolgte durch 2D-Gelelektrophorese und Silberfärbung.

#### 3.2.1 Aufreinigung von Strep-getagtem ClgR

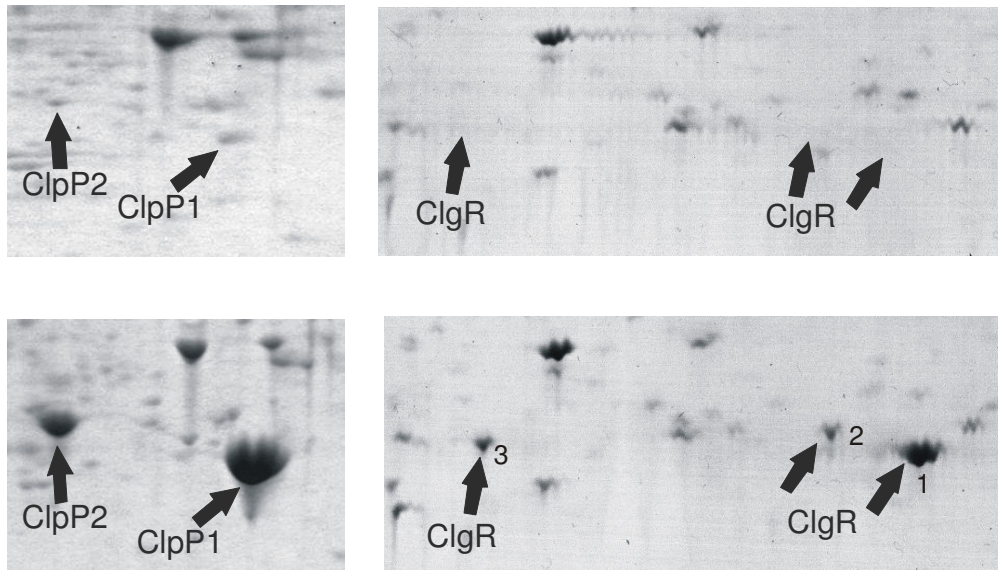
Die Untersuchung der Stabilität von ClgR erfolgte zunächst durch den Nachweis von strep-getagtem ClgR in *C. glutamicum* ATCC13032 und der  $\Delta clpC$ -Mutante. Die für die *clgR*-Überexpression in *E. coli* BB1553 verwendeten Plasmide pEKEx1-clgR-C/-N eignen sich auch für die Überexpression in *C. glutamicum* und wurden durch Elektroporation in die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta clgR$  und  $\Delta clgR\Delta clpC$  eingebracht. Es wurde erwartet, dass ClgR nur aus dem Stamm  $\Delta clgR\Delta clpC$ , nicht aber aus dem  $\Delta clgR$ -Stamm isoliert werden kann. Die Kultivierung der Stämme erfolgte in 100 ml BHIS-Medium mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin. Die Reinigung aus der löslichen Zellfraktion wurde entsprechend dem Protokoll für *E. coli* mit 300 mM NaCl im Chromatographiepuffer durchgeführt. Tatsächlich konnte ClgR-C aus *C. glutamicum*  $\Delta clgR/pEKEx1-clgR-C$  nicht gereinigt werden, unabhängig davon, ob die Zellen unter induzierenden (1 mM IPTG) oder nicht-induzierenden Bedingungen kultiviert worden waren (Abb. 22, 1 und 2). Aus *C. glutamicum*  $\Delta clgR\Delta clpC/pEKEx1-clgR-C$  dagegen wurden unter nicht induzierenden Kultivierungsbedingungen geringe und unter induzierenden Bedingungen große Mengen ClgR-C angereichert (Abb. 22, 3 und 4). Dieses Ergebnis spricht gegen einen translationalen Kontrollmechanismus, weil die Translationsinitiations-Signale von *clgR* auf pEKEx1-clgR-C von dem Plasmid pET24b stammen. Weiterhin ist auch eine Regulation über die Modifikation der DNA-bindenden Eigenschaften relativ unwahrscheinlich, weil die Isolierung in diesem Experiment unabhängig von den DNA-bindenden Eigenschaften war. Höchstwahrscheinlich wird ClgR auf der Ebene der Stabilität in Abhängigkeit von der proteolytischen Untereinheit ClpC reguliert. ClgR-N, das auch aus *E. coli* nur in sehr geringen Mengen gereinigt wurde, konnte aus *C. glutamicum* nicht gereinigt werden.



**Abb. 22:** StrepTactin-Affinitätsreinigung von ClgR mit C-terminalem StrepTag aus *C. glutamicum*  $\Delta clgR/pEKEx1-clgR-C$  (1, 2) und *C. glutamicum*  $\Delta clgR \Delta clpC/pEKEx1-clgR-C$  (3,4). Die Stämme wurden in BHIS-Medium mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin in Abwesenheit (1, 3) bzw. in Anwesenheit (2, 4) von 1 mM IPTG kultiviert. Nach der StrepTactin-Affinitätschromatographie wurden je 10  $\mu\text{l}$  der 10-fach aufkonzentrierten Eluate in einem 16,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

### 3.2.2 Lokalisation von ClgR nach zweidimensionaler Gelelektrophorese

Da es sich bei ClgR um einen Transkriptionsaktivator handelt, der auch in Abwesenheit von ClpC vermutlich nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommt, war es nicht möglich ClgR nach 2D-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung nachzuweisen. Um ClgR im 2D-Gel zu lokalisieren, wurden die Proteome von *C. glutamicum*  $\Delta clgR \Delta clpC$  mit pXMJ19 bzw. pXMJ19-clgR nach Kultivierung in BHIS-Medium mit 1 mM IPTG miteinander verglichen. Proteinspots, die bei Überproduktion von ClgR verstärkt waren, wurden mittels Peptidmassenfingerprintanalyse identifiziert. Bei Überproduktion von ClgR war die Menge an ClpP1 und ClpP2 deutlich erhöht (Abb. 23). ClgR war an drei verschiedenen Positionen mit ähnlicher Masse, aber unterschiedlichem isoelektrischen Punkt im 2D-Gel nachweisbar. ClgR-Spot 1 hatte einen  $pI_{\text{obs.}}$  von 4,94, ClgR-Spot 2 von 4,89 und ClgR-Spot 3 von 4,72. Der theoretische isoelektrische Punkt von ClgR liegt bei 5,25. Das deutet auf eine Modifikation, z. B. durch Anfügen einer Phosphatgruppe oder Prozessierung, hin.

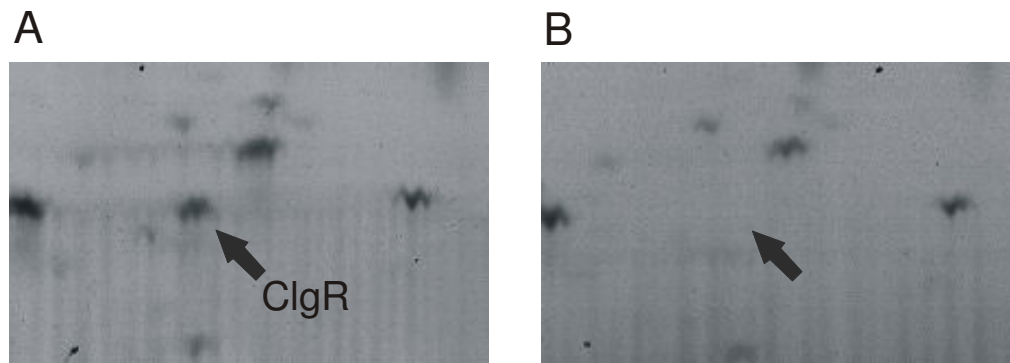


**Abb. 23:** Proteomanalyse von *C. glutamicum*  $\Delta clgR\Delta clpC$  mit pXMJ19 (obere Reihe) bzw. mit pXMJ19-clgR (untere Reihe) zum Nachweis von ClpP1, ClpP2 und ClgR. Je 300  $\mu$ g der löslichen Proteinfraction wurden in der 1. Dimension in einem pH-Gradienten von 4,5-5,5 aufgetrennt. Nach der zweiten Dimension wurden die Gele silbergefärbt.

### 3.2.3 Proteomanalyse von *C. glutamicum* ATCC13032 und $\Delta clpC$ -Mutante nach Silberfärbung

Alle bisherigen Untersuchungen zum Nachweis von ClgR beruhten auf der Überproduktion von ClgR bzw. ClgR-C oder der Reinigung über DNA-Affinitätschromatographie. Aufgrund der niedrigen ClgR-Konzentration in den Zellen war ein direkter Nachweis von ClgR in den Rohextrakten bisher nicht möglich. Auch nach Auftrennung von 300  $\mu$ g löslicher Proteinfraction mittels 2D-Gelelektrophorese und Anfärbung mit kolloidalem Coomassie konnte ClgR nicht sichtbar gemacht werden. Deshalb wurden die Proteome von *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clpC$  nach der sensitiveren Silberfärbung miteinander verglichen. Durch die Proteomanalysen mit dem überproduziertem ClgR-Protein (3.2.2) war die Lokalisation der ClgR-Spots im 2D-Gel bekannt. Aufgrund der mit 11,3 kDa relativ geringen Masse von ClgR lagen alle ClgR-Spots im Randbereich der 2D-Gele. Weil die Zahl der Proteinspots in diesem Bereich verhältnismäßig niedrig war, konnten auch nach längerer Färbung mit Silbernitrat noch einzelne Spots erkannt werden, während andere Bereiche bereits überfärbt waren. Somit war es möglich, ClgR direkt in der  $\Delta clpC$ -Mutante nachzuweisen (Abb. 24). Der entsprechende ClgR-Spot kommt im Wildtyp nicht vor. Während ClgR nach Überproduktion mit dem Vektor pXMJ19-clgR an drei verschiedenen Positionen im 2D-Gel nachweisbar war, wurde es in der  $\Delta clpC$ -Mutante nur an einer Position identifiziert, die Spot 2 ( $pI$  4.89) aus Abbildung 23 entspricht. Demnach würde

ClgR, wenn es in größeren Mengen vorkommt, verstärkt modifiziert. Die Tatsache, dass auch der direkte ClgR-Nachweis unter physiologischen Bedingungen, also ohne Überexpression und/oder Anreicherung, nur in der  $\Delta clpC$ -Mutante gelang, belegt zusätzlich die Abhängigkeit der ClgR-Stabilisierung von der Abwesenheit von ClpC. Möglicherweise ist ClgR ein Substrat der ClpCP-Protease und wird im Wildtyp durch diese abgebaut, während es in Abwesenheit von ClpC zu einer Stabilisierung von ClgR kommt.



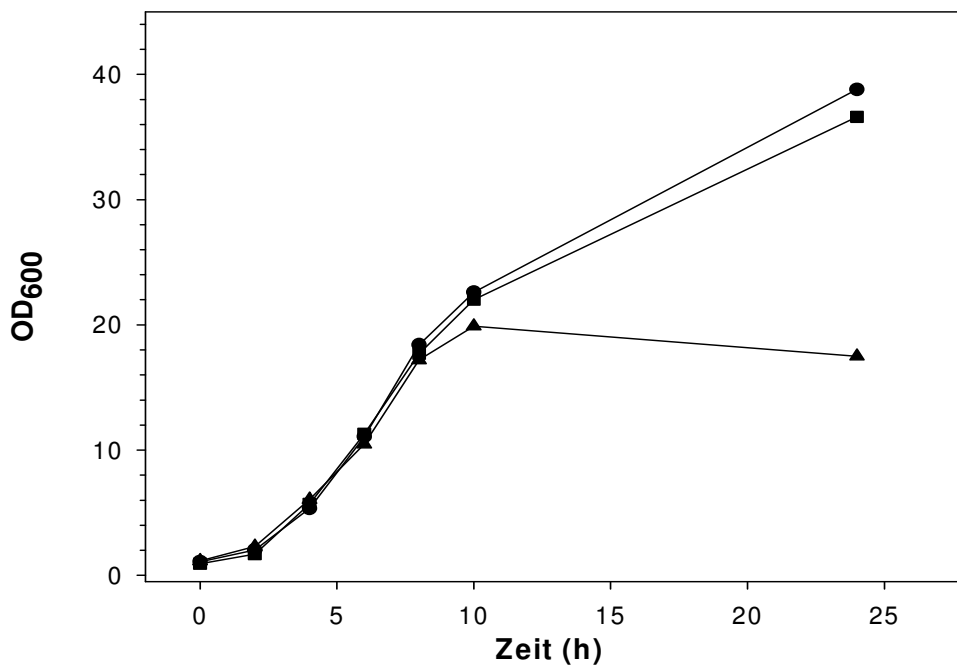
**Abb. 24:** Proteomvergleich der *C. glutamicum*-Stämme  $\Delta clpC$  (A) und ATCC13032 (B) nach Silberfärbung. Je 300  $\mu\text{g}$  der löslichen Proteinfraction wurden in der ersten Dimension in einem pH-Gradienten von 4,5-5,5 aufgetrennt. Die Pfeile kennzeichnen ClgR entsprechend Nr. 2 aus Abb. 19.

### 3.3 Untersuchung der Stabilität von ClgR in einer konditionalen *clpP*-Mutante

Die Stabilität von ClgR wird offensichtlich durch eine ClpC-abhängige Proteolyse reguliert. Da bekannt ist, dass ClpC mit den proteolytischen ClpP-Untereinheiten assoziiert und eine funktionelle Protease bildet, sollte untersucht werden, ob die ClpP-Proteine an der Degradation von ClgR beteiligt sind. Es war nicht möglich, die Gene *clpP1* und *clpP2*, die für die proteolytischen Untereinheiten kodieren, einzeln oder gemeinsam zu deletieren, was auf eine essentielle Funktion beider Proteine hindeutet (S. Schaffer, unpublizierte Ergebnisse). Deshalb wurden die Versuche zum Nachweis der ClgR-Degradation durch ClpP in einer konditionalen *clpP*-Mutante durchgeführt. Bei dieser Mutante ist der *clpP1P2*-Promotor durch den *tetA*-Promotor ersetzt und das *tetR*-Gen, das für den Tet-Repressor kodiert, liegt plasmidkodiert unter der Kontrolle des starken *gap*-Promotors (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in diesem Stamm vor ( $p\text{JC1-P}_{\text{gap}}\text{-tetR}$ , S. Schaffer). Tetracyclin bindet mit hoher Affinität an den Tet-Repressor ( $K_D = 10^{-9}$  M), wodurch dieser seine Fähigkeit, an den Operator zu binden, verliert. Das heißt, dass in Anwesenheit von Tetracyclin *clpP1* und *clpP2* transkribiert werden, während bei Abwesenheit von Tetracyclin der Tet-Repressor die Transkription nahezu vollständig blockiert ist.

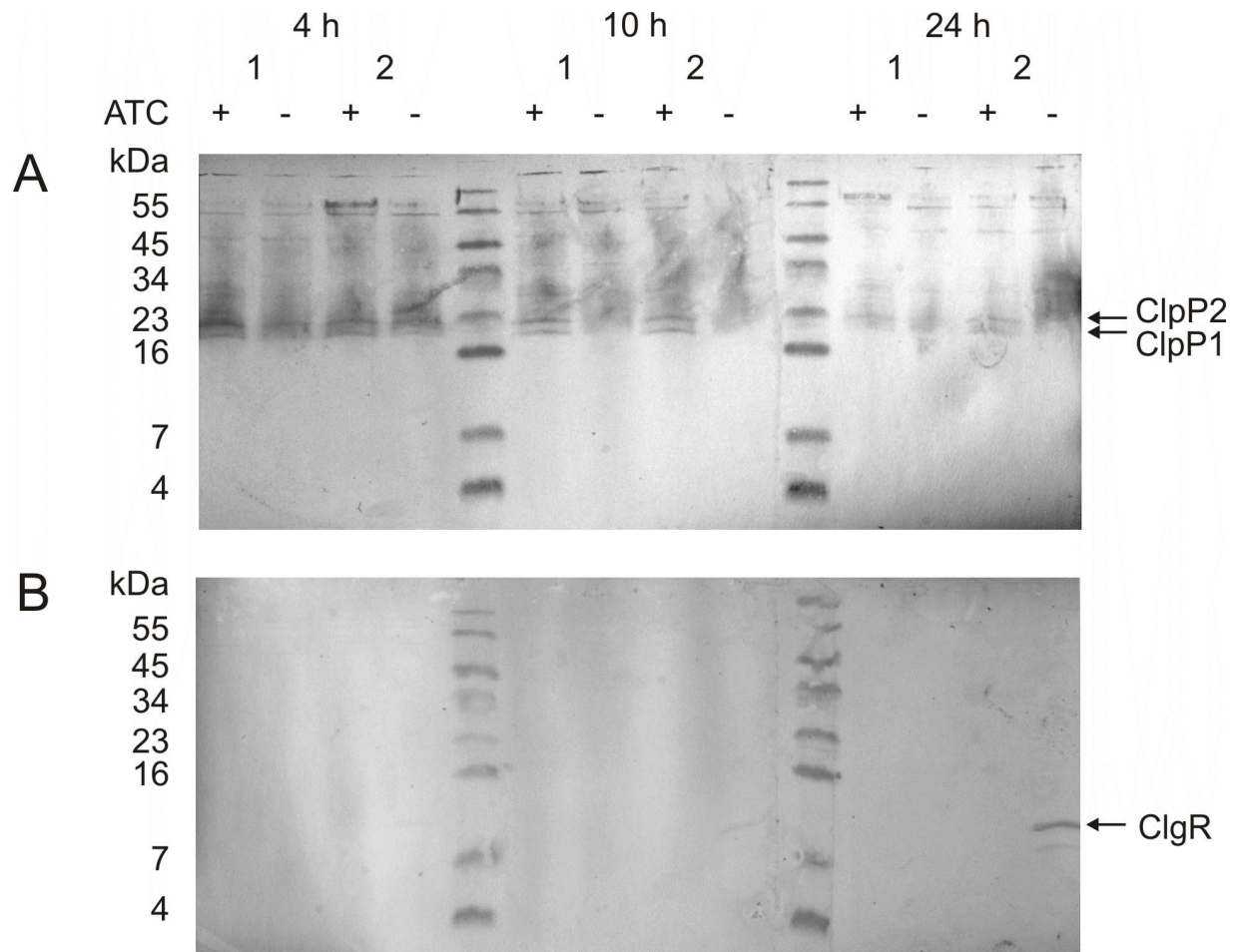
Die Kultivierung von *C. glutamicum*  $P_{tet}\text{-}clpP1P2/pJC1\text{-}P_{gap}\text{-}tetR$  erfolgte in LB-Medium mit 4 % Glucose. Zum Animpfen der Hauptkultur wurde die Vorkultur, die in Gegenwart von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin kultiviert wurde, einmal mit 0,9 % NaCl gewaschen. Ausgehend von einer  $OD_{600}$  von eins wuchsen die Zellen in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin bis zu einer  $OD_{600}$  von 15-20 und in Gegenwart von Anhydrotetracyclin (200 ng/ml) bis zu einer  $OD_{600}$  von 40-50 (Abb. 25). Die Tatsache, dass die Zellen in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin bereits bei OD 15-20 in die stationäre Phase übergangen, ist vermutlich auf die abnehmende ClpP1- und ClpP2-Menge und die damit verbundene Wachstumslimitierung zurückzuführen.

Mit der konditionalen *clpP1P2*-Mutante konnte die Stabilität von ClgR *in vivo* in Gegenwart und in Abwesenheit von ClpP1 und ClpP2 untersucht werden. Die ClpP1-, ClpP2- und ClgR-Mengen wurden durch Westernblot-Analyse in den Stämmen *C. glutamicum*  $P_{tet}\text{-}clpP1P2/pJC1\text{-}P_{gap}\text{-}tetR$  und  $P_{tet}\text{-}clpP1P2/pJC1\text{-}P_{gap}\text{-}tetR\text{-}P_{tac}\text{-}clgR$  (kodiert zusätzlich *clgR* unter der Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors) bei Kultivierung mit und ohne Anhydrotetracyclin (ATC) in der Hauptkultur verglichen. Es wurde jeweils eine Probe in der exponentiellen Phase (nach ca. 4 h), zu Beginn der stationären Phase (nach ca. 10-11 h) und nach 24 h genommen.



**Abb. 25:** Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 (■) und von  $P_{tet}\text{-}clpP1P2/pJC1\text{-}P_{gap}\text{-}tetR\text{-}P_{tac}\text{-}clgR$  in Gegenwart von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin (●) und in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin (▲) in LB-Medium mit 4 % Glucose.





**Abb. 26:** Westernblot-Analyse zur Quantifizierung von ClgR, ClpP1 und ClpP2 in *C. glutamicum*  $P_{tet}$ -*clpP1P2*/pJC1- $P_{gap}$ -tetR und *C. glutamicum*  $P_{tet}$ -*clpP1P2*/pJC1- $P_{gap}$ -tetR- $P_{tac}$ -clgR. Die Mengen von ClpP1 und ClpP2 (A) und ClgR (B) in *C. glutamicum*  $P_{tet}$ -*clpP1P2* pJC1- $P_{gap}$ -tetR (1) und  $P_{tet}$ -*clpP1P2* pJC1- $P_{gap}$ -tetR- $P_{tac}$ -clgR (2) wurden in verschiedenen Wachstumsphasen in ATC-haltigem (200 ng/ml, +) und ATC-freiem (-) LB-Medium mit 4% Glucose nach Vorkultivierung in LB-Medium mit 4% Glucose und 200 ng/ml ATC verglichen. 100  $\mu$ g Rohextrakt (von Zellen nach 4 h, 10 h und 24 h Wachstum) wurden in einem 16%igen SDS-Gel getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Detektion erfolgte mit polyklonalen Anti-ClpP1 und Anti-ClpP2 (gleichzeitige Detektion) und Anti-ClgR Antiseren aus Kaninchen und Anti-Kaninchen IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat.

ClpP1 und ClpP2 sind in Gegenwart von ATC in allen Wachstumsphasen nachweisbar (Abb. 26A). Im Gegensatz dazu führt die Kultivierung in Abwesenheit von ATC 10 und 24 h nach dem Transfer der Zellen in ATC-freies Medium zu drastisch reduzierten ClpP1- und ClpP2-Mengen. Das fiel, wie zu erwarten, mit der frühen Einstellung des logarithmischen Wachstums bei einer  $OD_{600}$  von 15-20 zusammen. Diese Versuche wurden sowohl mit *C. glutamicum*  $P_{tet}$ -*clpP1P2*/pJC1- $P_{gap}$ -tetR als auch mit  $P_{tet}$ -*clpP1P2*/pJC1- $P_{gap}$ -tetR- $P_{tac}$ -clgR, einem Stamm, in dem *clgR* unter Kontrolle des *tac*-Promotors überexprimiert wird, durchgeführt. Ohne ClgR-Überproduktion war ClgR auch nach 10 bzw. 24 h nicht nachweisbar. Das ist wahrscheinlich auf die sehr geringen ClgR-Mengen in den Zellen zurückzuführen. Zudem könnten auch nach 10

bzw. 24 h Kultivierung in Abwesenheit von ATC noch geringe Mengen ClpP1 und ClpP2 (unterhalb der Nachweisgrenze der Westernblots) vorhanden sein. Diese könnten ausreichen, um die geringen ClgR-Mengen unter die Nachweisgrenze abzubauen. Unter induzierenden Bedingungen (1 mM IPTG) für die *clgR*-Expression war ClgR nach 4 h Kultivierung in Abwesenheit von ATC und in Gegenwart von noch signifikanten ClpP1 und ClpP2-Mengen nicht nachweisbar. Sobald die ClpP1- und ClpP2-Menge aber signifikant reduziert war, konnte zunächst ein schwaches Signal (nach 10 h) und später ein stärkeres Signal (nach 24 h) von ClgR detektiert werden. Offensichtlich steht die ClgR-Konzentration in der Zelle in umgekehrtem Verhältnis zu der ClpP1- und ClpP2-Konzentration. Das deutet auf eine Beteiligung der beiden proteolytischen Untereinheiten an der ClgR-Degradation hin und unterstützt, dass ClgR mit grosser Wahrscheinlichkeit ein Substrat der ClpCP-Protease in *C. glutamicum* ist.

### **3.4 Entwicklung eines Screeningsystems zur Identifikation des Degradationssignals in ClgR**

Obwohl die Clp-Protease für viele physiologische Prozesse von großer Bedeutung ist, sind bisher nur wenige Substrate identifiziert worden, die einem konditionalen Abbau unterliegen. Insbesondere stellt sich die Frage, mit welchen Peptidsequenzen (Erkennungssignalen) die Clp-Protease interagiert. Das bekannteste Erkennungssignal ist der SsrA-Tag, eine Sequenz aus 11 Aminosäuren, die der wachsenden Polypeptidkette cotranslational am C-Terminus angehängen wird und diese zum Abbau markiert (Gottesman *et al.*, 1998; Keiler *et al.*, 1996). Daneben sind inzwischen aber auch einige andere Erkennungssignale bekannt, die in der Nähe des C- bzw. N-Terminus lokalisiert sind (Flynn *et al.*, 2003). Da ClgR keines der bekannten Motive enthält, sollte ein Screeningsystem entwickelt werden, mit dem das Degradationssignal in ClgR identifiziert werden kann.

Das Prinzip des entwickelten Screeningsystems beruht darauf, dass ClgR bei einer geeigneten Mutation im Degradationssignal nicht mehr durch die ClpCP-Protease erkannt und dadurch im Wildtyp stabilisiert wird. Somit steht ClgR zur Aktivierung der Expression von Zielgenen zur Verfügung. Die bekannten ClgR-abhängigen Promotoren wurden deshalb vor ein geeignetes Reportergen (*lacZ*, kodiert für die  $\beta$ -Galaktosidase) kloniert und in *C. glutamicum*  $\Delta clgR$  transferiert. Diese Stämme wurden dann mit einem kompatiblen Plasmid transformiert, welches das mutagenisierte *clgR*-Gen trug. Bei einer Stabilisierung von ClgR aufgrund einer Mutation im Degradationssignal sollte es zu einer erhöhten *lacZ*-Transkription kommen. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase führt zu einer Umsetzung von X-Gal im Medium, wobei ein relativ unlöslicher

blauer Farbstoff entsteht. Die entsprechende Kolonie erscheint blau und die Mutation in *clgR* kann durch DNA-Sequenzanalyse des Plasmids identifiziert werden.

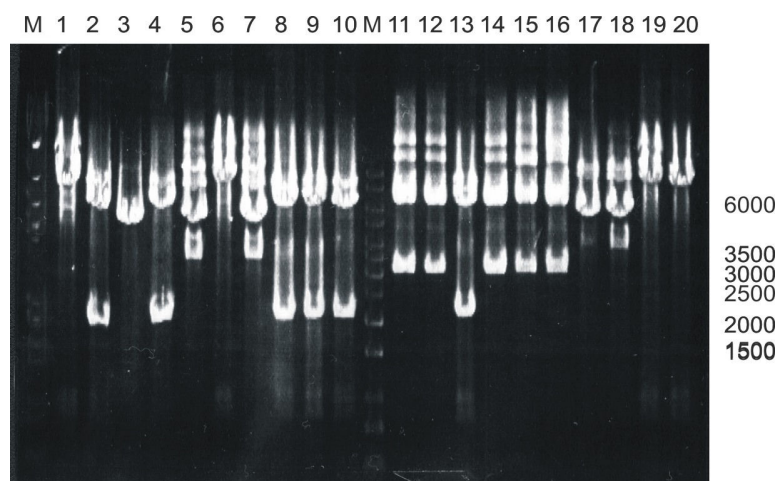
Die Klonierung der  $\beta$ -Galaktosidase in den Vektor pWKO, der keinen Promotor für *C. glutamicum* besitzt, erfolgte nach Amplifikation von chromosomaler *E. coli*-DNA (*E. coli* MG1655) mit den Primern SC-lacZ-fw2/SC-lacZ-rv2 in die Schnittstellen *XbaI/PstI*. Vor das *lacZ*-Gen wurden über die *BamHI/XbaI*-Schnittstellen die ClgR-abhängigen Promotoren von *clpP1P2*, *clpC*, *hflX*, *NCgl0748* und *ptrB* kloniert. Da sich in den DNase I-Footprint-Analysen gezeigt hat, dass ClgR unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Promotoren besitzt und diese daher vermutlich unterschiedliche Induktionsraten haben, sollte zunächst bestimmt werden, welcher Promotor sich am besten für das Screeningsystem eignet, d.h. den größten Farbunterschied bewirkt. Dazu wurden die Vektoren pWKO-P<sub>clpP</sub>-lacZ, pWKO-P<sub>clpC</sub>-lacZ, pWKO-P<sub>NCgl0748</sub>-lacZ, pWKO-P<sub>ptrB</sub>-lacZ und pWKO-P<sub>hflX</sub>-lacZ jeweils in die Stämme  $\Delta clgR/pXMJ19-clgR$  und  $\Delta clgR \Delta clpC/pXMJ19-clgR$  transferiert. Optimale Screeningbedingungen würden vorliegen, wenn in der  $\Delta clgR$ -Mutante nur weiße Kolonien entstehen (ClgR wird durch ClpCP abgebaut) und in der  $\Delta clgR \Delta clpC$ -Mutante nur blaue Kolonien (ClgR wird aufgrund des Fehlens von ClpC nicht abgebaut).

Wie in Tabelle 14 zu sehen ist, wurde mit keiner der getesteten Promotorregionen ein eindeutiger blau-weiß-Unterschied erhalten. Am besten eignen sich die Plasmide pWKO-P<sub>ptrB</sub>-lacZ und pWKO-P<sub>clpP</sub>-lacZ, weil hier ein blau-hellblau bzw. ein weiß-hellblau Unterschied vorlag.

**Tabelle 14:** Färbung der Kolonien bei Anwesenheit der verschiedenen pWKO-lacZ-Konstrukte in den Stämmen  $\Delta clgR/pXMJ19-clgR$  und  $\Delta clgR \Delta clpC/pXMJ19-clgR$ .

	$\Delta clgR/pXMJ19-clgR$	$\Delta clgR \Delta clpC/pXMJ19-clgR$
pWKO-P <sub>clpC</sub> -lacZ	Kolonien werden nach 4 Tagen hellblau	Kolonien werden nach ca. zwei Tagen blau
pWKO-P <sub>clpP</sub> -lacZ	Kolonien bleiben weiß	Kolonien werden erst nach ca. einer Woche (30°C, später 4°C) innen leicht hellblau
pWKO-P <sub>hflX</sub> -lacZ	Kolonien werden nach einem Tag blau	Kolonien werden direkt dunkelblau
pWKO-P <sub>NCgl0748</sub> -lacZ	Kolonien werden nach einem Tag blau	Kolonien werden direkt dunkelblau
pWKO-P <sub>ptrB</sub> -lacZ	Kolonien bleiben weiß	Kolonien werden nach mehreren Tagen hellblau

Die Mutagenese von *clgR* erfolgte mit dem Diversify PCR Random Mutagenesis-Kit der Firma Clontech, der eine PCR-basierte Zufallsmutagenese ermöglicht. Zunächst wurde *clgR* mit den Primern SC-*clgR*-fw2/SC-*clgR*-rv amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde dann als Template in die Mutagenese-PCR mit den gleichen Oligonukleotiden eingesetzt. Die mutagenisierten *clgR*-Gene (*clgR*\*) wurden mittels der *Bam*HI/*Sac*I-Schnittstellen in den Vektor pEKEx3 kloniert und damit *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Zweimal je 200-250 der resultierenden Spectinomycin-resistenten Klone wurden von den Agarplatten ab gespült und eine Plasmid-Präparation aus diesen Zellen durchgeführt. Die beiden resultierenden Plasmid-Pools von pEKEx3-*clgR*\*, die eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen in *clgR* enthalten sollten, wurde separat in den Stamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *clgR*/pWK0-P<sub>ptrB</sub>-lacZ transferiert und die Transformanten auf X-Gal-haltigen LB-Platten mit Kanamycin und Spektinomycin ausplattiert. Aus je 10 blauen Klonen aus jedem Plasmid-Pool wurden die Plasmide isoliert, in *E. coli* DH5 $\alpha$  transferiert und die Transformanten auf LB-Platten mit Spektinomycin selektioniert. Dies sollte zum Verlust des Plasmids pWK0-P<sub>ptrB</sub>-lacZ führen. Die aus *E. coli* DH5 $\alpha$  isolierten pEKEx3-*clgR*\*-Plasmide wurden zur Kontrolle mit *Nco*I/*Pvu*I verdaut. Die dabei erwarteten Fragmentgrößen waren 6444 und 2204 Basenpaare. Von den 20 untersuchten Plasmiden zeigten nur sechs das erwartete Bandenmuster (Abb. 27). Diese Plasmide (Nr. 2, 4, 8, 9 und 10 aus Plasmid-Pool 1 und No. 13 aus Plasmid-Pool 2) wurden erneut in *C. glutamicum*  $\Delta$ *clgR* pWK0-P<sub>ptrB</sub>-lacZ transferiert. Bei einer Mutation im Degradations-Signal sollten nun alle Kolonien blau werden. Dies war bei den pEKEx3-*clgR*\*- Plasmiden No. 4, 9, 10 und 13 der Fall. Zur Identifizierung der vorliegenden Mutation wurden die *clgR*-Gene in diesen Plasmiden sequenziert.



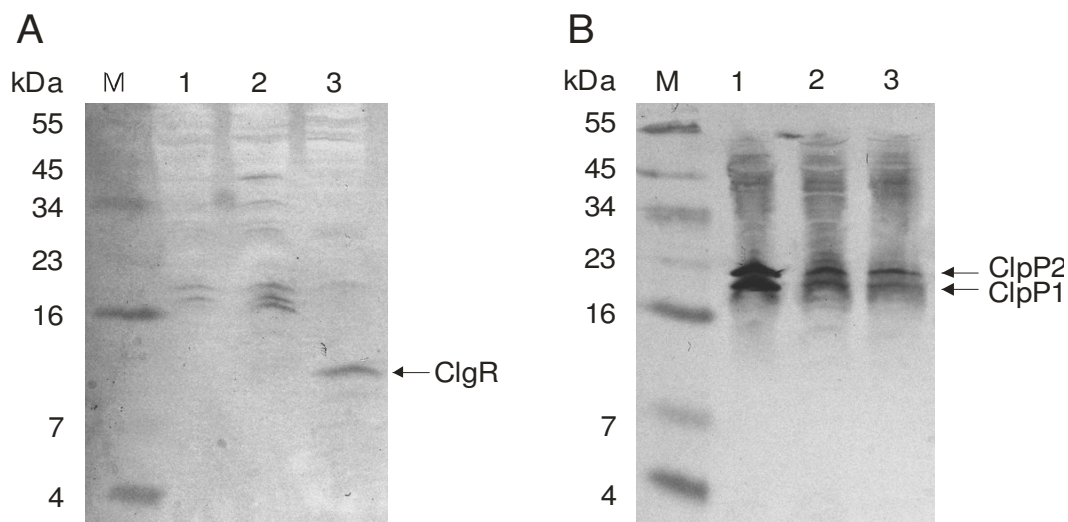
**Abb. 27:** Kontroll-Restriktion von pEKEx3-*clgR*\* mit *Nco*I/*Pvu*I. Es wurden jeweils 10 verschiedene Plasmide aus Präparationen von Ansatz 1 (1-10) bzw. Ansatz 2 (11-20) untersucht. Die Größe der Fragmente sollte bei 6444 und 2204 bp liegen.





lag ein Austausch von Thymin an Position 218 zu Cytosin vor, so dass sich das CTT-Codon (Leu73) zu CCT (Pro) veränderte. Mit dem entwickelten Screeningsystem war es somit möglich, Leu-73 als für die Degradation essentielle Aminosäure zu identifizieren.

Zur Überprüfung, ob die eingeführten Mutationen tatsächlich zu einer Stabilisierung von ClgR führen, wurden die ClpP1-, ClpP2- und ClgR-Mengen in den *C. glutamicum*-Stämmen  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR$ ,  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR\Delta 61-107$  und  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR-L73P$  durch Western-Blot-Analyse verglichen. Sowohl in *C. glutamicum*  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR$  als auch in  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR\Delta 61-107$  war kein ClgR nachweisbar (Abb. 29A). Die Tatsache, dass ClgR $\Delta 61-107$  nicht nachweisbar war, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein Teil der ClgR-Sequenz, die für die Herstellung des ClgR-Antiserum verwendet wurde, in diesem Mutein fehlt. Somit war eine Detektion von ClgR $\Delta 61-107$  mit dem vorliegenden Antiserum anscheinend nicht möglich. Für ClgR-L73P konnte dagegen gezeigt werden, dass die vorliegende Mutation zu einer Stabilisierung von ClgR führt.



**Abb. 29:** Westernblot-Analyse zur Quantifizierung von ClgR, ClpP1 und ClpP2 in den *C. glutamicum*-Stämmen  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR$  (1),  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR\Delta 61-107$  (2) und  $\Delta clgR/pEKEx3-clgR-L73P$  (3). Je 20  $\mu$ g Rohextrakt wurden in einem 16%igen SDS-Gel getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Detektion erfolgte mit polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen ClpP1 und ClpP2 (gleichzeitige Detektion) sowie ClgR (Peptid-Antiserum) und einem Anti-Kaninchen-IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat. M: SeeBlue® Pre-Stained Standard (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Weil ClgR $\Delta 61-107$  durch Western-Blot-Analyse mit Anti-ClgR-Antiserum nicht nachweisbar war, sollte die Stabilisierung dieses ClgR-Derivats indirekt über die Mengen an ClpP1 und ClpP2 gezeigt werden. Da es sich bei ClgR um einen Transkriptionsaktivator des *clpP1P2*-Operons handelt, sollte eine Stabilisierung zu einer erhöhten *clpP1P2*-Expression und somit zu größeren Mengen von ClpP1 und ClpP2 führen. Überraschenderweise ergaben die Westernblot-

Analysen mit den ClpP1- und ClpP2-Antikörpern jedoch, dass bei Überproduktion sowohl von ClgR $\Delta$ 61-107 als auch von ClgR-L73P die ClpP1- und ClpP2-Mengen noch geringer waren als bei der Überproduktion von nicht-mutagenisiertem ClgR, welches unter diesen Bedingungen abgebaut wird (Abb. 29B).

#### 4. Untersuchungen zum Stimulus der Aktivierung von ClgR

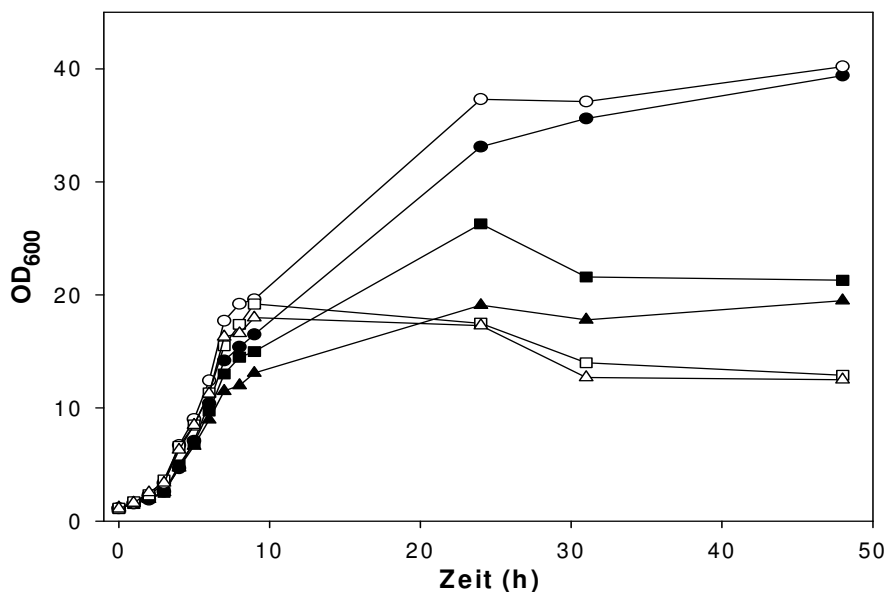
Nachdem gezeigt worden war, dass ClgR ein Transkriptionsaktivator von *clpC*, *clpP1P2* und weiteren Gene ist, stellte sich die Frage nach dem Stimulus der Aktivierung von ClgR. Die Expression der *clp*-Gene wird in vielen Bakterien in Folge verschiedener Stressfaktoren aktiviert. In *C. glutamicum* konnte bereits gezeigt werden, dass die *clpP1P2*- und *clpC*-Genexpression nach einem Hitzeschock erhöht ist. Die Hitzeschockantwort wird jedoch durch die ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^H$  und  $\sigma^E$  ausgelöst und ist somit ClgR unabhängig (Schweitzer, 2004). Es wurde auch bereits untersucht, ob die *clpP1P2*- und *clpC*-Genexpression in Folge anderer Stressfaktoren erhöht ist. Ein solcher Effekt konnte jedoch weder bei osmotischem Stress (1 M NaCl) noch bei oxidativem Stress (20 mM Wasserstoffperoxid) noch durch Behandlung mit Ethanol (2% v/v) oder Puromycin (100  $\mu$ g/ml) beobachtet werden. Zudem war auch das Wachstumsverhalten der  $\Delta$ *clgR*-Mutante in Gegenwart aller getesteten Stressfaktoren identisch zu dem des Wildtyp (Engels *et al.*, 2004b).

##### 4.1 Induktion der SOS-Antwort mit Mitomycin C

Bei der Bestimmung des ClgR-Regulons fiel auf, dass in Gegenwart von ClgR auch die Expression einiger Gene erhöht war, die an der DNA-Rekombination und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Der Einfluss DNA-schädigender Agentien auf *C. glutamicum* wurde bisher noch nicht untersucht. Es ist denkbar, dass ClgR z. B. in Folge von UV-Stress stabilisiert wird und es dann auch zu einer verstärkten *clpC*- und *clpP1P2*-Genexpression kommt. Für die Induktion der DNA-Reparatur-Antwort wird häufig Mitomycin C eingesetzt. Mitomycin C ist ein Antibiotikum mit allgemeiner cytotoxischer Aktivität, das an Desoxyguanosin binden und komplementäre DNA-Stränge kovalent verknüpfen kann. Aus *M. tuberculosis* u. a. Bakterien ist bekannt, dass der Repressor LexA zusammen mit RecA an der Regulation der SOS-Antwort beteiligt ist. In *M. tuberculosis* gibt es aber auch noch eine LexA- und RecA-unabhängige Geninduktion als Antwort auf DNA-Schäden, für die der verantwortliche Regulator bislang noch nicht bekannt ist. Z. B. war die Expression von *uvrA*, die nach DNA-Schäden induziert ist, auch in einer  $\Delta$ *recA*-Mutante erhöht war (Rand *et al.*, 2003).

#### 4.1.1 Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* ATCC 13032 und $\Delta clgR$ in Gegenwart verschiedener Mitomycin-Konzentrationen

Um herauszufinden, ob ClgR in *C. glutamicum* an der SOS-Antwort beteiligt ist, wurden zunächst Wachstumsversuche in Gegenwart verschiedener Mitomycin C-Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurde LB-Medium mit 4 % Glucose mit *C. glutamicum* ATCC13032 bzw.  $\Delta clgR$  angeimpft und bei 30°C kultiviert. Nach zwei Stunden wurde Mitomycin C in einer Endkonzentration von 0,2 bzw. 0,4  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt und einer Vergleichskultur kein Mitomycin. In den ersten 8 Stunden wuchsen beide Stämme unabhängig von der Mitomycinkonzentration gleich. Bei einer  $OD_{600}$  von knapp unter 20 stellte die  $\Delta clgR$ -Mutante in Gegenwart von Mitomycin das Wachstum ein. Nach 24 h fiel die  $OD_{600}$  dann deutlich auf ca. 12 (bei 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. 15 (bei 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) ab. Der Wildtyp wuchs auch nach 8 h in Gegenwart von Mitomycin noch weiter. Nach 24 h blieb die  $OD_{600}$  in Anwesenheit von 0,4  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin bei ca. 22 und mit 0,2  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin fiel sie von knapp 30 auf 25 ab. Die  $\Delta clgR$ -Mutante zeigte somit in Anwesenheit von Mitomycin C ein anderes Wachstumsverhalten als der Wildtyp.

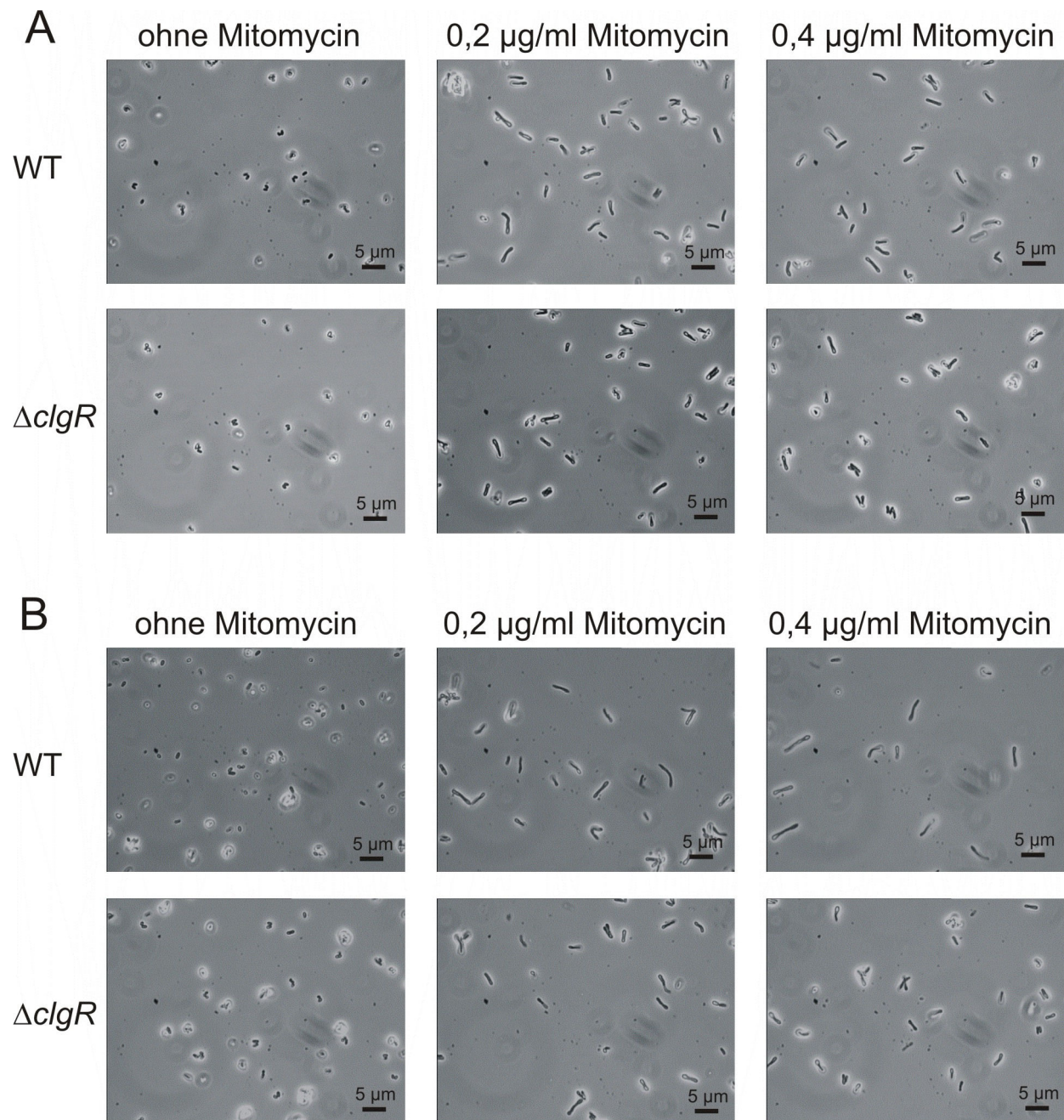


**Abb. 30:** Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (geschlossene Symbole) und  $\Delta clgR$ -Mutante (offene Symbole) in LB/4%-Glucose-Medium ohne Mitomycin (●,○), mit 0,2  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin (■,□) und mit 0,4  $\mu\text{g/ml}$  Mitomycin (▲,△).

#### 4.1.2 Vergleich der Zellmorphologie von *C. glutamicum* ATCC13032 und $\Delta clgR$ nach Zugabe von Mitomycin C

Um herauszufinden, ob sich auch die Zellmorphologie von *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clgR$  nach Zugabe von Mitomycin C unterscheidet, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen





**Abb. 31:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clgR$  in Abwesenheit bzw. Anwesenheit verschiedener Mitomycin-Konzentrationen. Die Zellen wurden bei 30°C in LB-Medium mit 4 % Glucose kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase nach 6 h (A) und der stationären Phase (B, nach 26 h) verglichen. Die Photos wurden bei einer Gesamtvergrößerung von 1000 mit einem Leica-Mikroskop DM-LB (Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen, das mit einer CellCam Video Kamera (PHASE, Lübeck) ausgestattet war.

von Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (nach 6 h) und in der stationären Phase (nach 26 h) gemacht (Abb. 31). In Abwesenheit von Mitomycin C sahen die Zellen von Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante zu beiden Zeitpunkten gleich aus. In Gegenwart von Mitomycin C waren alle Zellen extrem verlängert, unabhängig von der eingesetzten Mitomycin-Konzentration. Zudem erschienen sie an den Enden aufgequollen und durchsichtig. Länge und Form der Zellen von

Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante waren in der exponentiellen Phase gleich. In der stationären Phase zeigten sich leichte Unterschiede. Während die Zellen des Wildtyps in Anwesenheit von Mitomycin C noch länger waren als in der exponentiellen Phase, waren die Zellen der  $\Delta clgR$ -Mutante in exponentieller und stationärer Phase etwa gleich lang.

#### **4.1.3 Einfluss von Mitomycin auf die globale Genexpression von *C. glutamicum* 13032 und $\Delta clgR$ -Mutante**

Aufgrund des phänotypischen Unterschieds zwischen *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clgR$ -Mutante bei Wachstum in Gegenwart von Mitomycin C, besteht die Möglichkeit, dass ClgR an der Regulation der SOS-Antwort beteiligt ist. Um die Bedeutung von ClgR für die DNA-Reparatur genauer zu untersuchen, wurden die Transkriptome von *C. glutamicum* ATCC13032 vor und zwei Stunden nach Zugabe von Mitomycin miteinander verglichen. Parallel wurde das gleiche Experiment mit  $\Delta clgR$ -Mutante durchgeführt. Bei einer Beteiligung von ClgR an der SOS-Antwort sollte die Expression der daran beteiligten Gene im Wildtyp nach Mitomycin-Zugabe erhöht sein, während dies in der  $\Delta clgR$ -Mutante nicht der Fall wäre. Die Zugabe von Mitomycin führte zu drastischen Veränderungen in der Zelle. Hinzu kommt, dass die mRNA-Mengen zu zwei verschiedenen Zeiten (vor und 2 h nach Zugabe von Mitomycin C) miteinander verglichen wurden. Obwohl darauf geachtet wurde, dass die Kulturen sich zu beiden Zeitpunkten in der exponentiellen Phase befanden, konnte ein geringfügiger Wachstumseffekt nicht ausgeschlossen werden. In Tabelle 15 wurden die relativen mRNA-Spiegel der Gene zusammengefasst, bei denen eine Regulation durch ClgR vermutet wurde. Neben den Werten für die Gene des putativen ClgR-Regulons wurden auch die für *ruvC* und *ruvA* mit in die Tabelle aufgenommen, weil diese in *M. tuberculosis* RecA/LexA-unabhängig reguliert werden.

Von den ausgewählten Genen zeigte lediglich *recN* im Wildtyp in Gegenwart von Mitomycin C einen deutlich höheren mRNA-Spiegel als die  $\Delta clgR$ -Mutante. Die Gene *recA*, *uvrA*, *ruvC* und *ruvA* zeigten im Wildtyp nach Mitomycin C-Behandlung einen nur geringfügig höheren mRNA-Spiegel als die  $\Delta clgR$ -Mutante, während es bei den *clp*-Genen eher umgekehrt war. Demnach führte die Mitomycin-Behandlung nicht zu einer Aktivierung des gesamten ClgR-Regulon.

**Tabelle 15:** Relativer mRNA-Spiegel der Gene des ClgR-Regulons sowie *ruvC* und *ruvA* vor und nach Zugabe von 0,4 µg/ml Mitomycin C zu den Stämmen *C. glutamicum* ATCC13032 und  $\Delta clgR$ . Die mRNA wurde unmittelbar vor Mitomycin-Zugabe bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 2 und zwei Stunden später isoliert. Dargestellt ist das mRNA-Verhältnis 2 h nach Mitomycin-Zugabe/vor Mitomycin-Zugabe.

Gen	Wildtyp +/- Mitomycin	$\Delta clgR$ -Mutante +/- Mitom.
<i>NCgl0240</i>	1,1	1,0
<i>recR (NCgl0241)</i>	0,9	0,8
<i>recN</i>	5,3	1,8
<i>recA</i>	2,7	2,3
<i>uvrA</i>	2,1	1,5
<i>clpP1</i>	0,9	1,7
<i>clpP2</i>	0,9	1,4
<i>clpC</i>	1,1	1,4
<i>clgR</i>	1,0	0,9
<i>ruvC</i>	2,0	1,3
<i>ruvA</i>	2,2	1,8

## V DISKUSSION

### 1. ClgR, ein Regulator der *clp*-Genexpression in Actinomyceten

Über die Regulation der *clp*-Gene in Actinomyceten gab es zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Informationen. *Streptomyces lividans* besitzt fünf *clp*-Gene, die in zwei bicistronischen Operons und einem monocistronischen Gen organisiert sind. Die Expression des *clpP3P4*-Operons wird durch den Transkriptionsaktivator PopR positiv reguliert (Viala *et al.*, 2000). Das *popR*-Gen liegt stromabwärts vom *clpP4*-Gen in entgegengesetzter Orientierung. Die Aktivität von PopR wird durch regulierte Proteolyse durch die Clp-Protease kontrolliert, wobei bisher nicht bekannt ist, welche Bedingungen zu einer Stabilisierung von PopR und somit zur Transkriptionsaktivierung des *clpP3P4*-Operons führen (Viala and Mazodier, 2002).

Das über DNA-Affinitätschromatographie mit der *clpP1P2*-Promotorregion aus der *C. glutamicum*  $\Delta clpC$ -Mutante angereicherte Protein ClgR (*clp* gene regulator) weist bezüglich der Primärsequenz deutliche Ähnlichkeit zu PopR auf (47% Aminosäure-Sequenzidentität, Abb. 27). Ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Signaltransduktionskette, die ClgR, *clpP1P2* und ClpC verbindet. In Gegenwart von ClgR waren die Transkriptmengen von *clpP1P2* und *clpC* erhöht und in Abwesenheit erniedrig. Demnach handelt es sich bei ClgR, wie auch bei PopR, um einen Transkriptionsaktivator. Während PopR allerdings die Transkription des *clpP3P4*-Operons in Abwesenheit von funktionalem ClpP1 bzw. ClpP2 aktiviert und keinen Einfluss auf die *clpC*- bzw. *clpP1P2*-Expression hat, ist ClgR ein Aktivator von *clpC* und dem *clpP1P2*-Operon in *C. glutamicum*. Daneben wurde der Frage nachgegangen, welches Sequenzmotiv ClgR erkennt. Ein dem PopR-Bindemotiv in der *clpP3P4*-Promotorregion von *S. lividans* entsprechendes palindromisches Motiv (TCTGCC-N3-GGCAGA) konnte vor *clpP1P2* und *clpC* von *C. glutamicum* nicht gefunden werden. Mittels DNase-I-Footprint-Analysen wurde gezeigt, dass ClgR stromaufwärts von beiden Genen das Motiv RWWCGCT-N3-RGCGWAC erkennt. Diese Sequenz hat eine partiell palindromische Struktur, was darauf hindeutet, dass ClgR als Dimer an die DNA bindet.

Zur Untersuchung der Konservierung der Regulation der *clpC*- und *clpP1P2*-Expression in *C. glutamicum* und anderen Actinomyceten durch ClgR wurden die relevanten Genomsequenzen bezüglich Anwesenheit und Position von *clgR* und ClgR-Bindestellen verglichen. Mit Ausnahme des *M. leprae*-Genoms konnten *clgR*-ähnliche Gene in allen vorliegenden Actinomyceten-Genomen in konservierter genomischer Lokalisation stromabwärts von *ftsK* und *pgsA3*

nachgewiesen werden (Abb. 10). Lediglich die Art und Anzahl der zwischen *ftsK*, *pgsA3* und *clgR* liegenden Gene variierte leicht. Anhand eines Aminosäure-Alignments von ClgR-Proteinen verschiedener Actinomyceten wird deutlich, dass diese sich insbesondere in ihrer DNA-bindenden Region ähneln (Abb. 28). Die C- und N-Termini zeigen keine konservierten Bereiche mit Ausnahme einer Anhäufung kurzkettiger, hydrophober Aminosäuren, die an den C-Termini einiger Proteine auf ein konserviertes Prolin folgen.

Nucleotid-Sequenzanalysen der DNA-Regionen vor *clpP1P2* und *clpC* belegen, dass die in *C. glutamicum* identifizierte ClgR-Bindestelle auch in allen sequenzierten *Mycobacterium*-Arten, *Streptomyces coelicolor* und *Thermobifida fusca* präsent ist (Abb. 11). Das zentrale CGC-N5-GCG-Motiv ist bis auf eine Ausnahme vollständig konserviert. Diese Ausnahme bildet *M. leprae*, in dessen Genom auch kein *clgR*-Gen vorhanden ist. Es ist deshalb davon auszugehen, dass es dort durch den fehlenden Selektionsdruck zu Veränderungen in dem ClgR-Bindemotiv kommen konnte.

Die Anwesenheit und genomische Lage *clgR*-homologer Gene und die Konservierung der ClgR-Bindestellen vor *clpC* und *clpP1P2* in den genannten Actinomyceten legen eine Funktion von ClgR als Aktivator der *clpC*- und *clpP1P2*-Genexpression in diesen Spezies nahe. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das *clgR*-Gen aus *M. tuberculosis* in *C. glutamicum*  $\Delta clgR$   $\Delta clpC$  überproduziert. In *C. glutamicum* ist bei einer Überproduktion von ClgR (aus *C. glutamicum*) die ClpP1 und ClpP2-Menge deutlich erhöht. Der gleiche Effekt war auch bei Überproduktion von ClgR aus *M. tuberculosis* zu beobachten. Bei einem Vergleich der Proteome waren die ClpP1- und ClpP2-Mengen in *C. glutamicum*  $\Delta clpC$   $\Delta clgR$  nach Überproduktion von ClgR aus *M. tuberculosis* ca. 10-fach höher als in einem Vergleichsstamm ohne überproduziertes ClgR (S. Schaffer, persönliche Mitteilung). Offensichtlich kann ClgR aus *M. tuberculosis* das Protein aus *C. glutamicum* ersetzen und dessen Funktion bei der Aktivierung der *clpP1P2*-Genexpression übernehmen. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass in den Actinomyceten, die ClgR besitzen, dieses Protein als Aktivator der *clpC*- und *clpP1P2*-Genexpression fungiert. Kürzlich konnte dies auch für ClgR aus *Streptomyces* direkt gezeigt werden (Bellier and Mazodier, 2004). ClgR erkennt hier ein GTTCGC-N5-GCG-Motiv vor *clpC*, *lon* und dem *clpP1P2*-Operon. Die Bedeutung der Regulation von *lon* durch ClgR in *Streptomyces* ist noch nicht geklärt. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird die Expression von *lon* durch die Bindung des Transkriptionsrepressors HspR reprimiert (Sobczyk *et al.*, 2002). In *C. glutamicum* gibt es kein *lon*-homologes Gen. In *Streptomyces* bindet ClgR auch ein degeneriertes Bindemotiv (GTTAC-N5-GC) vor dem *clgR*-Gen. Das deutet auf eine

positive Autoregulation von ClgR hin, wobei die Aktivität von ClgR in *Streptomyces* hauptsächlich auf Stabilitätsebene durch konditionalen Abbau durch die Clp-Protease reguliert wird. Stromaufwärts von *clgR* aus *C. glutamicum* konnte kein entsprechendes Bindemotiv gefunden werden, weshalb eine Autoregulation unwahrscheinlich ist. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass vor *clgR* in *C. glutamicum* ein putativer  $\sigma^H$ -abhängiger Promotor und der Operator des Transkriptionsrepressors HspR liegen (Engels *et al.*, 2004b). Neben einer schwachen Regulation auf Transkriptionsebene wird ClgR in *C. glutamicum* hauptsächlich auf der Ebene der Stabilität reguliert.

## 2. Das ClgR-Regulon

### 2.1 Identifikation der Mitglieder des ClgR-Regulons

Die bioinformatische Untersuchung des *C. glutamicum*-Genoms auf das Vorkommen eines WCGC-N5-GCGW-Motivs ergab 714 Treffer. Die entsprechenden Sequenzen lagen sowohl in kodierenden als auch nicht-kodierenden Bereichen und waren für eine Einzelauswertung zu zahlreich. Ein anderer Ansatz, um putative Mitglieder des ClgR-Regulons zu identifizieren, war ein genomweiter Transkriptomvergleich von *C. glutamicum*  $\Delta clpC$  (ClgR vorhanden) und  $\Delta clpC \Delta clgR$  (ClgR nicht vorhanden). Bei Genen, deren mRNA-Spiegel in Gegenwart des Transkriptionsaktivators ClgR erhöht war, könnte es sich um putative Mitglieder des ClgR-Regulons handeln. Insgesamt zeigten 17 Gene einen mehr als 2-fach erhöhten mRNA-Spiegel in der  $\Delta clpC$ -Mutante im Vergleich zu der Doppelmutante (Tab. 7). Neben den sieben Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, konnten fast alle anderen Gene in zwei funktionelle Klassen eingeteilt werden, nämlich eine für Proteine, die an proteolytischen Prozessen beteiligt sind, und eine zweite für Proteine, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind.

Für die Gene *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX* und *NCgl0240* konnte bestätigt werden, dass der mRNA-Spiegel in Gegenwart von ClgR erhöht ist und ClgR *in vitro* an die Promotor-Regionen dieser Gene bindet. Neben der Reinigung von ClgR aus Rohextrakten der  $\Delta clpC$ -Mutante wurden mit den regulatorischen Regionen vor *ptrB* und *NCgl0240* auch aus Wildtyp-Rohextrakten Proteine (NCgl2886 bzw. CglIR) spezifisch gereinigt, nämlich NCgl2886 (MarR-ähnlicher Transkriptionsregulator) mit dem *ptrB*-Promotorfragment und CglIR (Endonuklease) mit dem *NCgl0240*-Promotorfragment (Abb. 14). Die Tatsache, dass sowohl NCgl2886 als auch CglIR ausschließlich aus Wildtyp-Rohextrakten angereichert werden konnten, kann verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass CglIM, NCgl2886 und ClgR ähnliche

DNA-Bereiche erkennen, wodurch eine gleichzeitige Bindung von ClgR und den anderen Proteinen ausgeschlossen wäre. Geht man davon aus, dass die Endonuklease CglIR die gleiche Bindungsstelle hat wie die Methylase CglIM (Schäfer *et al.*, 1997), so erscheint diese Hypothese als unwahrscheinlich, da zwar eine CglIM-Bindungsstelle auf dem PCR-Produkt existiert, diese aber ca. 160 bp von der ClgR-Bindestelle entfernt liegt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch die Anreicherung defekter Proteine und konditionaler Substrate der ClpCP-Protease in der  $\Delta clpC$ -Mutante die Proteine NCgl2886 und CglIR inaktiviert bzw. ihre Bindungsaktivitäten gehemmt werden. Bei Erklärungsversuchen zur CglIR-Bindung sollte berücksichtigt werden, dass das für die entsprechende DNA-Methylase (CglIM) kodierende Gen im DNA-Mikroarray-Vergleich  $\Delta clpC$  vs.  $\Delta clpC \Delta clgR$  einen erhöhten mRNA-Gehalt im  $\Delta clpC$ -Stamm zeigte.

Die Gene *recR*, *recN* und *uvrA* zeigten in den DNA-Mikroarray-Versuchen einen erhöhten mRNA-Spiegel in Gegenwart von ClgR, jedoch konnte eine direkte Bindung von ClgR an die entsprechenden „upstream“-Bereiche nicht nachgewiesen werden. Bei *recR* erscheint eine Cotranskription mit dem stromaufwärts lokalisierten Gen *NCgl0240* wahrscheinlich. Beide Gene liegen nah hintereinander (104 intergenische Nukleotide) und haben die gleiche Orientierung. Diese genetische Organisation ist sowohl in Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien konserviert und eine Cotranskription beider Gene konnte in *E. coli* bereits gezeigt werden (Alonso *et al.*, 1990; Pelaez *et al.*, 2001). In *E. coli* bilden das *NCgl0240*-homologe Gen *ybaB* und *recR* ein tricistronisches Operon mit *dnaX*, das stromaufwärts von *ybaB* liegt und eine Untereinheit der DNA-Polymerase III kodiert (Yeung *et al.*, 1990). Diese genetische Organisation ist auch in *C. glutamicum* konserviert, der mRNA-Spiegel von *dnaX* ist jedoch unabhängig von der Gegenwart von ClgR. Die Funktion des *NCgl0240*-Proteins ist bislang unbekannt. Das zu *NCgl0240* homologe Protein HI0442 aus *Haemophilus influenzae* wurde bereits kristallisiert (Lim *et al.*, 2003). Es enthält eine neuartige Faltung, wovon sich bisher aber keine Hinweise auf die Funktion ableiten ließen. Eine Funktion als Enzym oder DNA-bindendes Protein erscheint jedoch unwahrscheinlich.

Bei einem Vergleich der ClgR-Bindestellen vor *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX* und *NCgl0240* konnte in allen Bereichen eine unvollständig palindromische Sequenz, ähnlich zu der vor *clpC* und dem *clpPIP2*-Operon, nachgewiesen werden. Ein Alignment aller Bindestellen ist in Abb. 32 zu sehen. Daraus konnte das erweiterte Consensus-Motiv WNNWCGCYNANRGCGWWS abgeleitet werden. Ein ähnliches Motiv ist stromaufwärts der Gene *recN*, *NCgl1357*, *NCgl854*, *NCgl2505*, *recR*, *elaA*, *cglIM*, *NCgl1322* und *uvrA*, deren mRNA-Spiegel in den DNA-Mikroarray-Experimenten mehr als 2-fach erhöht war, nicht vorhanden. Zudem konnte in



DNase-I-Footprinting-Versuchen kein durch ClgR geschützter Bereich vor *NCgl0747*, *recR*, *recN* und *uvrA* detektiert werden. Folglich ist davon auszugehen, dass die Expression dieser Gene nicht direkt durch ClgR kontrolliert wird.

<i>clpP1P2</i>	-58	TGAAAACGCTGATAGCCAACAG	-37
<i>clpC</i>	-140	GGTGTTCGCTACAGCCCTACAG	-119
<i>NCgl0748</i>	-66	TGTGTTCGCTTACAGCCCTTGTT	-45
<i>hflX</i>	-65	CTTGATCGCTCACGCCCTTGCC	-44
<i>ptrB</i>	-61	GAATGTCCCAATGCCAACAC	-40
<i>NCgl0240</i>	-69	TTTGTAAGCCGAGAGCCAACCT	-48

**WNNWCGCYNANRGCGWWS**

**Abb. 32:** Alignment der ClgR-Bindestellen vor *clpP1P2*, *clpC*, *NCgl0748*, *hflX*, *ptrB* und *NCgl0240* in *C. glutamicum*. Die Zahlen geben die Position relativ zum ermittelten Transkriptionsstart an.

Bei den DNase I-Footprint-Experimenten ist eine unterschiedliche Affinität von ClgR zu den verschiedenen ClgR-Bindestellen aufgefallen. Während ein erster Schutz der Sonde vor DNase I-Verdau bei *clpC* (2,2 nM Sonde) bereits bei einer ClgR-Konzentration von 22 - 44 nM zu sehen war, mussten für den gleichen Effekt bei *clpP1P2* (1,4 bzw. 2,2 nM Sonde) 220 – 440 nM ClgR eingesetzt werden. Eine ähnlich genaue Abschätzung ist für die Bindestellen vor *hflX*, *ptrB*, *NCgl0748* und *NCgl0240* nicht möglich, weil bei den entsprechenden Versuchen nicht so viele unterschiedliche ClgR-Konzentrationen eingesetzt wurden. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass die Bindestellen vor *clpC*, *hflX*, *NCgl0748* und *NCgl0240* bereits bei einem 20 – 40-fachen ClgR-Überschuss vor DNase I-Verdau geschützt sind, während dies bei den Bindestellen vor *ptrB* und *clpP1P2* erst bei einem etwa 200-fachen Überschuss der Fall ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Sequenz der Bindestelle und der Affinität lässt sich jedoch nicht feststellen.

Neben den in den DNA-Mikroarray-Versuchen identifizierten putativen ClgR-Zielgenen wurde auch das gesamte *C. glutamicum*-Genom mit der Bioinformatik-Software ERGO (Integrated Genomics Inc., Chicago, USA) unter Erlaubnis einer abweichenden Base auf das Vorkommen des Konsensus-Motivs WNNWCGCYNANRGCGWWS hin untersucht. Dabei wurden 118 Treffer gefunden. Mit Ausnahme von 9 Treffern lagen alle Motive innerhalb kodierender Bereiche. Neben den 6 bekannten ClgR-Bindestellen lag die Sequenz einmal zwischen den konvergent orientierten Genen *NCgl0791* und *NCgl0792*, die für eine rRNA-Methylase bzw. ein hypothetisches Protein kodieren und in einem zweiten Fall 1135 Nukleotide stromaufwärts von *NCgl2463*. *NCgl2463* kodiert für einen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Dicarboxylat-Symporter und kann somit nicht



mit Proteolyse oder DNA-Reparatur in Verbindung gebracht werden. Eine weitere putative ClgR-Bindestelle liegt 6 bp vor dem Translationsstart des Gens *NCgl1932* für die Methionin-Amino-peptidase und 32 bp stromabwärts von *NCgl1933*, das für ein Penicillin-bindendes Protein kodiert. Da die Bindestelle vor *NCgl1932* divergent orientiert ist und zudem der mRNA-Spiegel in den DNA-Microarray-Experimenten mit 0,85 nahezu unverändert war, erscheint auch eine Regulation von *NCgl1932* durch ClgR unwahrscheinlich. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse besteht das ClgR-Regulon, das heißt die Gruppe der von ClgR direkt regulierten Gene, aus acht Genen, nämlich *clpC*, *clpP1P2*, *ptrB*, *hflX*, *NCgl0748* und *NCgl0240-recR*.

## 2.2 Charakterisierung von NCgl0748 und HflX

Aufgrund der aus *E. coli* vorliegenden Daten über homologe Proteine von PtrB und RecR können Rückschlüsse über deren Funktion in *C. glutamicum* gezogen werden. PtrB weist 37% Aminosäure-Sequenzidentität zur Protease II aus *E. coli* auf. Diese wird der Familie der Prolyl-Oligopeptidasen zugeordnet, zu der zahlreiche Peptidasen mit katalytischer Aktivität ähnlich der Trypsin-Familie der Serin-Proteasen gehören (Kanatani *et al.*, 1991). RecR ist für die homologe Rekombination und DNA-Reparatur notwendig und wird häufig mit einem stromaufwärts liegenden Gen cotranskribiert (Pelaez *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu ist die Funktion von HflX und NCgl0748 noch völlig ungeklärt. In *E. coli* ist HflX Teil eines multicistronischen Operons, das auch die Gene *hflK* und *hflC* umfasst und nach einem Hitzeschock induziert wird (Tsui *et al.*, 1996). Über HflX liegen lediglich bioinformatische Informationen über Sequenzähnlichkeiten zu einer GTP-bindenden Domäne vor. Bei HflK und HflC handelt es sich um integrale Membranproteine, die zur SPFH-Proteinfamilie gehören und die Aktivität der ATP-abhängigen Protease FtsH modulieren. Dabei können sie FtsH z. B. von der Degradation von Membranproteinen wie SecY zum Abbau cytosolischer Proteine wie  $\sigma^{32}$  umschalten (Kihara *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1997). Wie die Aktivität von HflK und HflX *in vivo* moduliert wird, damit die Degradation membranassoziierter und cytosolischer Proteine gesteuert werden kann, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise könnte HflX in diesem Zusammenhang eine Funktion zukommen. Es wäre denkbar, dass HflX als putatives cytosolisches Protein an der Regulation der Degradation cytosolischer Proteine durch FtsH beteiligt ist und dazu mit FtsH bzw. HflC/K interagiert. *C. glutamicum* besitzt ebenfalls Gene, die für FtsH und HflC kodieren, diese bilden jedoch kein Operon mit HflX. Es wird kein *hflK*-homologes Gen kodiert.

Bei einer Reinigung von HflX mit einem C-terminalen StrepTag-II mittels StrepTactin-Sepharose-Affinitätschromatographie wurden aus der löslichen Zellfraktion keine weiteren Proteine spezifisch mitgereinigt. Eine Deletion von *hflX* in *C. glutamicum* hatte keinen Einfluss

auf Wachstumsverhalten und Zellmorphologie und auch ein Proteomvergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta hflX$ -Mutante lieferte keine eindeutigen Hinweise auf die Funktion von HflX. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass HflX, das keine vorhergesagten Transmembranhelices enthält, sowohl in der löslichen Fraktion als auch in der Membranfraktion vorkommt. Die Assoziation mit der Cytoplasmamembran könnte durch Interaktion mit membranintegralen Proteinen erfolgen, wie z.B. FtsH oder HflC. Das unterstützt die Hypothese, dass HflX über Interaktion mit HflC oder FtsH indirekt auch an der Proteolyse beteiligt ist. Eine Reinigung von HflX mit einem C-terminalem StrepTag-II aus der Membranfraktion lieferte keine ausreichenden Proteinmengen, so dass eine direkte Identifikation von Interaktionspartnern von HflX nicht möglich war.

Über die Funktion von NCgl0748 können mit bioinformatischen Methoden keine Rückschlüsse gezogen werden. Anhand von Sequenzanalysen war davon auszugehen, dass es sich bei NCgl0748 um ein cytosolisches Protein handelt. Das konnte anhand von Western-Blot-Analysen auch bestätigt werden. Eine phänotypische Charakterisierung einer  $\Delta NCgl0748$ -Mutante ergab, dass die Wachstumsrate in der exponentiellen Phase mit  $0,29 \text{ h}^{-1}$  niedriger war als im Wildtyp ( $0,4 \text{ h}^{-1}$ ) und dass die Zellen ca. 20% länger waren. Diese Ergebnisse zeigen eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch das Fehlen von NCgl0748. Eine vergleichende Proteomanalyse von Wildtyp und  $\Delta NCgl0748$ -Mutante ergab keine eindeutigen Hinweise auf die Funktion von NCgl0748. Deshalb wurden durch genomweite Transkriptomanalyse die mRNA-Mengen aller Gene in den Stämmen *C. glutamicum*  $\Delta NCgl0748$  und Wildtyp nach Wachstum in LB-Medium miteinander verglichen. Dabei wiesen auffällig viele am Stickstoff-Stoffwechsel beteiligten Gene in der  $\Delta NCgl0748$ -Mutante eine sehr stark erhöhte mRNA-Menge auf. Für *C. glutamicum* ist bekannt, dass AmtR als Masterregulator fungiert und die Transkription zahlreicher Gene bei Stickstoff-Überschuss reprimiert (Burkovski, 2003). AmtR wird durch GlnK und GlnD kontrolliert (Strösser *et al.*, 2004). Das PII-Signaltransduktionsprotein GlnK wird bei Stickstoffmangel verstärkt synthetisiert, bildet Trimere und wird durch GlnD adenyliert. Das adenylierte GlnK interagiert mit AmtR und es kommt zur Expression der bei Stickstoffmangel induzierten Gene. Bei Stickstoff-Überschuss wird GlnK durch GlnD deadenyliert, kann nicht mehr mit AmtR interagieren und die Transkription der Stickstoff-abhängig kontrollierten Gene wird reprimiert. Unadenyliertes GlnK bindet wahrscheinlich an den Ammoniumtransporter AmtB und verhindert so eine weitere Stickstoff-Aufnahme. Die membranassoziierte Lokalisation von GlnK führt zudem zu einer schnellen Proteolyse durch FtsH und ClpCP bzw. ClpXP. Entsprechend scheint die Proteolyse auch für die Regulation des Stickstoff-Stoffwechsels von

Bedeutung zu sein. In der  $\Delta NCgl0748$ -Mutante war bei Kultivierung in LB-Medium neben den Genen, die für die Urease und akzessorische Proteine kodieren, auch der mRNA-Gehalt von Aminotransferasen, Amid-bindenden Proteinen und Aminosäure- und Ammonium-Transportern, inklusive des *amtB-glnK-glnD*-Operons, erhöht. Bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium, dessen Stickstoffgehalt mit 469 mM deutlich über dem von LB-Medium liegt, war der mRNA-Spiegel der bei Stickstoff-Mangel induzierten Gene in der  $\Delta NCgl0748$ -Mutante nicht erhöht. Das gleiche Ergebnis wurde auch nach Kultivierung in LB-Medium mit zusätzlich 1% Ammoniumsulfat erhalten. Es kann deshalb ausgeschlossen werden, dass NCgl0748 direkt an der Auslösung der Stickstoff-Mangel-Antwort beteiligt ist. Wäre das der Fall, müsste der beobachtete Effekt unabhängig vom Medium sein. Vielmehr scheint die  $\Delta NCgl0748$ -Mutante entweder einen höheren Stickstoff-Bedarf als der Wildtyp zu haben, wodurch in LB-Medium N-Mangelbedingungen früher als beim Wildtyp eintreten, oder aber die Stickstoff-Aufnahme bzw. die Stickstoff-Regulation sind so verändert, dass die Induktion der Stickstoff-Mangelgene bei einer höheren N-Konzentration als im Wildtyp ausgelöst wird. Eine Unterscheidung zwischen beiden Hypothesen wäre durch Analyse des Stickstoffgehalts der Zellen und im Kulturüberstand möglich. Bei einem erhöhten Stickstoffverbrauch der  $\Delta NCgl0748$ -Mutante, wäre der N-Gehalt im Kulturüberstand niedriger als im Wildtyp, während bei einer verschobenen Schwelle zur Auslösung der N-Mangel-Antwort der Stickstoff-Gehalt im Überstand in beiden Kulturen gleich wäre. Eine mögliche mechanistische Erklärung für die zweite Hypothese wäre, dass NCgl0748 an der Proteolyse von GlnK beteiligt ist. NCgl0748 könnte z. B. mit deadenyliertem GlnK interagieren und es der Proteolyse zuführen. Bei Abwesenheit von NCgl0748 würde GlnK länger an den Ammoniumtransporter AmtB gebunden bleiben, wodurch die Aufnahme von Ammonium vermindert wäre. Das könnte dann zu einer Auslösung der unter Stickstoff-Mangel induzierten Gene führen.

### 3. Transkriptionsaktivierung durch ClgR

Bei den DNase-I-Footprint-Analysen hat sich gezeigt, dass die ClgR-Bindestelle an verschiedenen Positionen bezogen auf den Transkriptionsstart lokalisiert sein kann (siehe Abb. 32). In den meisten Fällen befindet sich die ClgR-Bindestelle zwischen Position -41 und -67. Die einzige Ausnahme stellt *clpC* dar, wo sich die Bindestelle zwischen Position -123 und -141 relativ zum distalen Transkriptionsstart erstreckt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei ClgR aus *Streptomyces* gemacht (Bellier and Mazodier, 2004). Dort überlappt die ClgR-Bindestelle vor *lon* mit dem -35-Element, während sie bei *clpP1* und *clgR* zwischen Position -46

und -69 und vor *clpC* zwischen Position -145 und -171 liegt. In *C. glutamicum* wurde mittels Primer-Extension untersucht, ob noch ein weiterer Transkriptionsstart von *clpC* existiert, der näher an der ClgR-Bindestelle liegt. Da dies nicht gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Bindung von ClgR an verschiedenen Positionen zu einer Transkriptionsaktivierung führen kann. Eine entsprechend flexible Art der Transkriptionsaktivierung wurde auch bereits für Klasse 1 CAP-abhängige Promotoren beschrieben, wo die Bindestelle für CAP an unterschiedlichen Entfernungen (-61 bis -91) bezogen auf den Transkriptionsstart vorliegen kann. Dabei wird ein Kontakt zwischen CAP und der C-terminalen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ CTD), die über einen flexiblen Arm mit der N-terminalen Domäne verbunden ist, hergestellt (Busby and Ebright, 1999; Rhodius and Busby, 1998). Inwiefern auch eine Bindestelle um Position -120 bis -150 noch transkriptionsaktivierend wirkt und ein direkter Kontakt zwischen Aktivator und  $\alpha$ CTD hergestellt werden kann, lässt sich nicht eindeutig sagen. Möglicherweise werden für die ClgR-abhängige Transkriptionsaktivierung von *clpC* auch noch weitere Proteine benötigt, die z. B. an der Einführung einer Biegung der DNA zwischen ClgR-Bindestelle und RNA-Polymerase beteiligt sind. Allerdings wurden bei der Affinitätschromatographie mit den verschiedenen ClgR-Zielpromotoren keine Hinweise darauf gefunden. Für IcIR, einen Repressor des *aceBAK*-Operons aus *E. coli*, wird postuliert, dass auch nach Bindung von IcIR an eine Position zwischen -99 und -125 ein Kontakt mit  $\alpha$ CTD hergestellt werden kann. Entsprechend erscheint es auch möglich, dass ClgR bei Bindung an die Promotorregion von *clpC* direkt ohne Biegung der DNA mit der C-terminalen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit der RNA-Polymerase interagieren kann.

## 4. Die Regulation der ClgR-Aktivität

### 4.1 Posttranslationale Regulation von ClgR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ClgR ein Transkriptionsaktivator der *clp*-Genexpression ist, stellt sich die Frage, wie die Aktivität von ClgR reguliert wird. Über DNA-Affinitätschromatographie mit den Promotorregionen von *clpPIP2* und *clpC* konnte ClgR nur aus Rohextrakten von *C. glutamicum*  $\Delta$ *clpC* und nicht aus dem Wildtyp angereichert werden. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze, z. B. dass die Synthese von ClgR auf der Ebene der Transkription oder der mRNA-Stabilität reguliert wird. Andere Erklärungsmöglichkeiten wären eine Veränderung der Affinität von ClgR zu der DNA-Bindestelle oder eine erhöhte ClgR-Halbwertszeit. In DNA-Mikroarray-Versuchen und durch quantitative RT-PCR konnte gezeigt

werden, dass der *clgR*-mRNA-Gehalt in einem  $\Delta clpC$ -Hintergrund nur 1,5-fach bzw. zweifach erhöht war. Eine 1,5-fach bzw. zweifach erhöhte mRNA-Menge kann nicht dafür verantwortlich sein, dass eine Anreicherung von ClgR nur aus Rohextrakten der  $\Delta clpC$ -Mutante möglich ist. Daher muss ClgR hauptsächlich auf der Ebene der Translation bzw. posttranslational, z. B. durch Degradation, reguliert werden.

Die aus *E. coli* und *B. subtilis* bereits gut untersuchten Regulatoren der *clp*-Gene,  $\sigma^{32}$  und CtsR, werden durch konditionale Proteolyse reguliert. Diese ist abhängig von Adapterproteinen, welche die Regulatoren binden bzw. modifizieren können und so die Degradation steuern. Zur Untersuchung der Stabilität von ClgR aus *C. glutamicum* wurde eine Affinitätsreinigung mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei konnte ClgR mit einem C-terminalen StrepTag-II nur aus einem Stamm ohne funktionales ClpC gereinigt werden. Dieses Ergebnis spricht für eine Regulation von ClgR auf der Ebene der Stabilität, und zwar durch eine ClpC-vermittelte Proteolyse. Das bestätigt auch der Proteomvergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clpC$ -Mutante nach Silberfärbung. ClgR konnte dabei nur in der  $\Delta clpC$ -Mutante und nicht im Wildtyp nachgewiesen werden.

Nach Überproduktion war ClgR in *C. glutamicum*  $\Delta clpC$   $\Delta clgR$  (mit pXMJ19-*clgR*) an drei verschiedenen Positionen mit ähnlicher Masse, aber unterschiedlichem isoelektrischen Punkt im 2D-Gel nachweisbar. Die theoretische Masse von ClgR liegt bei 11,3 kDa und der theoretische isoelektrische Punkt bei 5,4. Die Masse der mittels Peptidmassenfingerprintanalyse als ClgR identifizierten Proteinspots lag zwischen 8 und 10 kDa und die isoelektrischen Punkte der Spots bei 4,72, 4,89 bzw. 4,94. Die Abweichungen von theoretischer Masse bzw. isoelektrischem Punkt deuten auf eine Modifikation, z. B. durch Acetylierung, Phosphorylierung oder Prozessierung hin. Der in der  $\Delta clpC$ -Mutante nachweisbare ClgR-Spot entspricht dem Proteinspot, der nach Überproduktion von ClgR die größte Masse und einen  $pI_{obs.}$  von 4,89 hatte. Bei genauer Betrachtung der Aminosäuresequenz von ClgR fällt auf, dass ClgR innerhalb der *Corynebacteriaceae* am N-Terminus einen aus 20 Aminosäureresten bestehenden „Schwanz“ besitzt, der in den meisten anderen Organismen nicht vorkommt (siehe Abb. 27). Die theoretische Masse von ClgR ohne diese N-terminalen Aminosäuren liegt bei ca. 9,2 kDa. Diese Masse stimmt ungefähr mit den bei den Proteomanalysen ermittelten Massen von ClgR aus *C. glutamicum*  $\Delta clpC$  überein. DNA-Sequenzanalysen geben keinen Hinweis auf ein alternatives Startcodon, das zu einem kleineren ClgR führen würde. Möglicherweise wird ClgR durch Abspaltung einiger N-terminaler Aminosäuren prozessiert, wobei dies unabhängig von ClpC erfolgt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass bei der

Peptidmassenfingerprintanalyse immer nur Fragmente ab Aminosäure 19 nachweisbar waren. Das würde auch bei einer Modifikation des N-Terminus durch Acetylierung/Phosphorylierung zutreffen. Es muß jedoch beachtet werden, dass es nicht möglich war, ClgR mit einem N-terminalen StrepTag-II in den gleichen Mengen wie ClgR mit einem C-terminalen StrepTag-II aus *C. glutamicum* zu reinigen. Bei einer Abspaltung des N-Terminus (mit StrepTag-II) können nur nicht prozessierte Proteine mit Streptactin-Sepharose gereinigt werden. Ein direkter Nachweis, dass ClgR am N-Terminus prozessiert wird, lässt sich jedoch nur über eine Sequenzierung des N-Terminus erbringen. Da eine Abspaltung der ersten 18 Aminosäuren nicht zu einer Absenkung des isoelektrischen Punktes auf 4,72-4,94 führt, scheinen noch weitere Modifikationen vorzuliegen. Konkretere Aussagen über die Art der Modifikation bzw. Prozessierung sind anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der direkte Nachweis von ClgR unter physiologischen Bedingungen in der  $\Delta clpC$ -Mutante die Abhängigkeit der ClgR-Stabilisierung von der Abwesenheit von ClpC zeigt. Wahrscheinlich ist ClgR ein Substrat der ClpCP-Protease und wird im Wildtyp durch diese abgebaut, während es in Abwesenheit von ClpC zu einer Stabilisierung von ClgR kommt.

Um die Abhängigkeit der ClgR-Degradation von den beiden alternativen ClpP-Proteinen zu untersuchen, wurde die Stabilität von ClgR in An- bzw. Abwesenheit von ClpP überprüft. Da ClpP1 und ClpP2 für die Zelle essentiell sind und die entsprechenden Gene weder zusammen noch einzeln deletiert werden können (Engels *et al.*, 2004a), wurde die Anwesenheit von ClgR mit einem Anti-ClgR-Antiserum in einer konditionalen *clpP1P2*-Mutante untersucht, wobei parallel auch die ClpP1- und ClpP2-Mengen mittels Western-Blot analysiert wurden. ClgR war dabei nur in Abwesenheit von ClpP1 und ClpP2 nachweisbar. Dieses Ergebnis legt eine Degradation von ClgR durch die ClpCP-Protease nahe. Die Frage, ob ClgR durch ClpCP1 oder ClpCP2 oder beide Komplexe degradiert wird, kann nur mit Hilfe eines *in vitro*-Systems mit gereinigten Komponenten geklärt werden.

Bisher gibt es keine Hinweise auf akzessorische Proteine, die an der Degradation von ClgR beteiligt sind. Weder nach DNA-Affinitätschromatographie aus *C. glutamicum*  $\Delta clpC$  noch nach Reinigung von ClgR mit C-terminalem StrepTag-II aus *C. glutamicum*  $\Delta clpC$   $\Delta clgR$  wurde ein anderes Protein spezifisch mit ClgR co-gereinigt. Lediglich nach heterologer Überexpression und Reinigung von ClgR-C aus *E. coli* BL21(DE3) wurde das 70 kDa Protein DnaK co-gereinigt. Von dem molekularen Chaperon DnaK ist bekannt, dass es bei der Faltung neusynthetisierter und denaturierter Proteine hilft und auch an der Degradation von Proteinen beteiligt ist (Bukau and Horwich, 1998; Hartl, 1996).  $\sigma^{32}$ , ein Aktivator der *clp*-Genexpression in *E. coli*, wird von DnaK

gebunden und dem proteolytischen Abbau zugeführt (Gamer *et al.*, 1996). In *S. coelicolor* fungiert DnaK als Co-Repressor von HspR, einem Regulator des *dnaK*-Operons (Bucca *et al.*, 2000). Die genannten Beispiele und die starke Konservierung von DnaK legten nach der Co-Reinigung von DnaK mit ClgR-C aus *E. coli* auch einen Einfluss auf die Funktionalität von ClgR in *C. glutamicum* nahe. Das konnte bei der Reinigung von ClgR-C aus *C. glutamicum*  $\Delta clpC$   $\Delta clgR$  pEKExI-clgR-C nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass ClgR mit DnaK oder anderen Proteinen interagiert. Bei einer Regulation analog zu der von  $\sigma^{32}$  aus *E. coli*, könnte DnaK durch die Akkumulation defekter Proteine und konditionaler ClpCP-Substrate in *C. glutamicum*  $\Delta clpC$  von ClgR „wegtitriert“ werden. Auch bei möglichen anderen akzessorischen Proteinen ist nicht auszuschließen, dass sie nur unter Wildtyp-Bedingungen mit ClgR interagieren und es der Degradation zuführen. Da ClgR bisher nur aus *C. glutamicum*  $\Delta clpC$  gereinigt werden konnte, würde das auch eine fehlende Co-Reinigung akzessorischer Proteine erklären. Eine Möglichkeit akzessorische Proteine aus Wildtyp-Rohextrakten zu identifizieren wäre eine kovalente Bindung von ClgR an eine Affinitäts-Säule, die dann mit Wildtyp-Rohextrakten inkubiert wird. Nach Elution spezifisch an ClgR gebundener Proteine könnten somit putative Interaktionspartner von ClgR identifiziert werden.

## 4.2 Das Degradationssignal von ClgR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ClgR das Substrat der ClpCP-Protease ist, stellte sich die Frage, welches Sequenzmotiv für die Degradation von ClgR essentiell ist. Viele solcher Erkennungssequenzen befinden sich am N- bzw. C-Terminus von Proteinen. Schon eine einzige N-terminale Aminosäure kann die Stabilität eines Proteins entscheidend beeinflussen (Varshavsky, 1996). In der Regel sind jedoch mehrere Aminosäuren an den Enden eines Proteins für die Stabilität entscheidend. Bei RepA, einem Substrat von ClpAP, liegt die Erkennungssequenz zwischen Aminosäure 1 und 15 (Hoskins *et al.*, 2000a) und beim Lambda-O-Protein, einem Substrat von ClpXP, innerhalb der ersten 18 Aminosäuren (Gonciarz-Swiatek *et al.*, 1999). Eines der bekanntesten Erkennungsmotive ist das SsrA-Tag mit der Sequenz Leu-Ala-Ala-COOH. Dieses wird Proteinen, die aus zerbrochener oder unvollständiger mRNA hervorgehen, cotranslational am C-Terminus angefügt (Gottesman *et al.*, 1998). Durch Sequenzanalyse von verschiedenen Clp-Substraten konnten Flynn *et al.* (Flynn *et al.*, 2003) fünf häufig vorkommende Motive identifizieren. Zwei davon liegen am C-Terminus der Proteine und haben Ähnlichkeit zu dem Leu-Ala-Ala-Motiv des SsrA-Tag bzw. dem Erkennungsmotiv des Phagenproteins MuA (Arg-Arg-Lys-Lys-Ala-Ile-COOH). Die drei anderen sind am N-Terminus

lokalisiert und zeichnen sich durch die Sequenzen polar-T/Ø-Ø-basisch-Ø, NH<sub>2</sub>-Met-basisch-Ø-Ø-Ø-X5-Ø oder Ø-X-polar-X-polar-X-basisch-polar aus, wobei Ø für hydrophob steht. In der Aminosäuresequenz von ClgR konnten keine Übereinstimmungen zu den bekannten Motiven gefunden werden. Für PopR aus *S. coelicolor*, das eine hohe Sequenzähnlichkeit zu ClgR aufweist, wurde bereits gezeigt, dass zwei C-terminale Alaninreste (ähnlich dem SsrA-Tag) für die Degradation essentiell sind. Ein Austausch der beiden Alanin-Reste gegen zwei Aspartat-Reste führte zu einer Stabilisierung von PopR (Viala and Mazodier, 2002). Auch bei ClgR aus *S. coelicolor* wird vermutet, dass zwei C-terminale Alanin-Reste an der Degradation beteiligt sind. Ein Austausch der beiden Alanin-Reste gegen Aspartat führte zu einer verstärkten Expression von ClpP1, ClpP2 und ClpC und es wird deshalb von einer Stabilisierung von ClgR ausgegangen (Bellier and Mazodier, 2004). Während der DNA-bindende Teil von PopR und ClgR innerhalb der Actinomyceten konserviert ist, gibt es deutliche Unterschiede im Bereich des C- bzw. N-Terminus. Innerhalb der *Corynebacteriaceae* ist der N-Terminus deutlich länger als bei den meisten anderen Actinomyceten. Diese haben jedoch einen im Vergleich zu *Corynebacterium* verlängerten C-Terminus, der mit Val-Ala oder Ala-Ala endet, einer Sequenz, die bei PopR von *S. lividans* als Degradationsmotiv dient. Da ClgR aus *C. glutamicum* am C-Terminus kein ähnliches Sequenzmotiv besitzt, aber auch ein Substrat der ClpCP-Protease ist, muss es noch ein weiteres, bisher unbekanntes Sequenzmotiv geben, das von der Clp-Protease erkannt wird. Zur Identifikation des Degradationssignals wurde ein Screeningsystem entwickelt. Das Prinzip des Screeningsystems beruht darauf, dass ClgR bei einer Mutation im Degradationssignal nicht mehr von der ClpCP-Protease erkannt und somit stabilisiert wird. Eine Stabilisierung von ClgR wurde durch Transkriptionsaktivierung des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens *lacZ*, das auf einem Plasmid unter der Kontrolle des ClgR-abhängigen *ptrB*-Promotors vorlag, analysiert.

Bisher konnten zwei Mutationen identifiziert werden, die auch nach Retransformation der gereinigten mutagenisierten Plasmide in *C. glutamicum*  $\Delta clgR$  pWK0-P<sub>ptrB</sub>-*lacZ* zu einer Blaufärbung führten. Aufgrund der ersten Mutation, die zu einem verkürzten ClgR-Mutein (ClgR $\Delta$ 61-107) führt, ist davon auszugehen, dass das Degradationssignal im C-Terminus lokalisiert ist. Für das ClgR-L73P-Mutein konnte eine Stabilisierung direkt gezeigt werden. Da in ClgR $\Delta$ 61-107 acht der 15 Aminosäuren, die zur Herstellung des ClgR-Peptid-Antiserums genutzt wurden fehlen, wurden alternativ zu einem direkten Nachweis die ClpP1- und ClpP2-Mengen in dem Stamm mit diesem Mutein mittels Western-Blot analysiert. Völlig unerwartet waren jedoch die ClpP1- und ClpP2-Mengen im Kontrollstamm mit Wildtyp-ClgR deutlich höher. Das gleiche



Resultat wurde auch in dem Stamm mit dem ClgR-L73P-Mutein beobachtet. Das bedeutet, dass trotz der Stabilisierung von ClgR-L73P die Transkriptionsaktivierung des *clpP1P2*-Promotors geringer ist als die durch die geringen Konzentrationen an Wildtyp-ClgR verursachte. Die Aktivität von Wildtyp-ClgR und den beiden Muteinen scheint sich also für den *ptrB*-Promotor und den *clpP1P2*-Promotor drastisch zu unterscheiden. Der Austausch Leu73 → Pro könnte die Struktur des Proteins deutlich verändert haben, da Prolin häufig einen „Knick“ in der Sekundärstruktur bewirkt. Eine damit einhergehende Veränderung der Protein-DNA-Anordnung könnte z. B. eine Transkriptionsaktivierung von *clpP1P2* verhindern, während eine Transkriptionsaktivierung von *ptrB* noch möglich ist. Dabei ist auch zu beachten, dass die Bindestelle von ClgR vor *clpP1P2* 3 bp näher am Transkriptionsstart liegt als bei *ptrB*. Somit könnte die veränderte ClgR-Struktur z. B. die Bindung der RNA-Polymerase erschweren. Um herauszufinden, ob die ClgR-Muteine die Transkription nur in geringerem Maße aktivieren als natives ClgR oder die konstitutive Expression von *clpP1P2* sogar behindern, wurden auch die ClpP1 und ClpP2-Mengen in einem Kontrollstamm, der kein ClgR kodierte, sondern nur einen pEKEx3-Leervektor enthielt, untersucht. Dabei lagen die ClpP1- und ClpP2-Mengen über denen der Stämme mit stabilisiertem ClgR (J. Schweitzer, persönliche Mitteilung). Demnach führt eine Akkumulation der untersuchten ClgR-Muteine nicht zu einer Transkriptionsaktivierung von *clpP1P2*, sondern scheint vielmehr noch die konstitutive Expression zu erschweren.

Mit dem vorliegenden Screeningsystem ist es nur möglich Mutationen zu identifizieren, die zu einer Stabilisierung von ClgR führen und gleichzeitig die Transkription von *lacZ* mit dem *ptrB*-Promotor aktivieren. Da nicht auszuschließen ist, dass manche Mutationen zwar zu einer Stabilisierung von ClgR führen, aber gleichzeitig eine Transkriptionsaktivierung ausgehend von dem *ptrB*-Promotor verhindern (s. o. *clpP1P2*-Promotor), wäre es sinnvoll, das Screening auch mit anderen ClgR-abhängigen Promotoren durchzuführen. Für die Entwicklung des Screeningsystems wurden verschiedene ClgR-abhängige Promotoren vor das *lacZ*-Gen kloniert und getestet (Tab. 14). Die Affinität von ClgR zu den Bindestellen in den Promotorregionen von *clpC*, *hflX* und *NCgl0748* war so hoch, dass bereits nicht-mutagenisiertes ClgR zu einer Blaufärbung der Kolonien führte. Demnach muss der durch die Degradation sehr niedrige ClgR-Spiegel in diesen Zellen ausreichen, um eine Transkription des *lacZ*-Reportergens zu ermöglichen. Die entsprechenden Promotorregionen eignen sich daher nicht für dieses Screeningsystem. Da die Affinität von ClgR zur Bindestelle vor *clpP1P2* noch geringer ist als bei *ptrB*, führte eine Überexpression von ClgR unter den beschriebenen Bedingungen nicht zu einer deutlichen Blaufärbung der Kolonien. Eine Möglichkeit, den *clpP1P2*-Promotor dennoch als

Promotor für die  $\beta$ -Galaktosidase zu verwenden, besteht im Einsatz eines sensitiveren Substrates für die  $\beta$ -Galaktosidase (z. B. Chemilumineszenz-Substrat). Alternativ zu dem entwickelten Screeningsystem könnte der für die Degradation von ClgR entscheidende Sequenzbereich auch durch Fusion von verschiedenen ClgR-Sequenzbereichen (z. B. unterschiedlich langen 3'-Sequenzen) mit einem Reporter gen und der Untersuchung der Stabilität dieses Reporterproteins, identifiziert werden.

Mit Leu73 konnte eine Aminosäure identifiziert werden, deren Austausch zu Prolin zu einer Stabilisierung von ClgR führt. Im Vergleich zu den bisher bekannten Degradationsmotiven liegt diese Aminosäure relativ weit vom C-Terminus entfernt. In *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass Degradationsmotive, die normalerweise am C- bzw. N-Terminus eines Proteins lokalisiert sind, auch im Inneren der Primärsequenz liegend den Abbau des Proteins bewirken können (Hoskins *et al.*, 2002). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass interne Degradationsmotive auch in anderen Proteinen vorkommen. Auffällig ist auch, dass Leu73 in den ClgR-Proteinen anderer Actinomyceten, wie z. B. *S. coelicolor*, wo von einem C-terminalen Ala-Ala-Motiv ausgegangen wird, konserviert ist. Möglicherweise dient Leu73 hier als interne, sekundäre Erkennungsstelle.

## 5. Stimulus der Stabilisierung von ClgR

Bisher ist nicht geklärt, welche Bedingungen *in vivo* zu einer Stabilisierung von ClgR führen. Die Expression der *clp*-Gene in anderen Bakterien wird häufig in Folge verschiedener Stressfaktoren wie Hitzeschock, osmotischem Stress, Ethanol-Stress und Puromycin-Behandlung aktiviert (Gerth *et al.*, 1998). Auch in *C. glutamicum* ist die *clpPIP2*- und *clpC*-Genexpression nach einem Hitzeschock erhöht, dies erfolgt jedoch ClgR-unabhängig durch die ECF-Sigmafaktoren  $\sigma^H$  und  $\sigma^E$  (Schweitzer, 2004). Mitglieder des ClgR-Regulons sind sowohl an der Proteolyse als auch an der DNA-Reparatur/-Rekombination beteiligt. Es gibt Stressbedingungen, bei denen sowohl DNA-Reparatur als auch Proteolyse benötigt werden. Durch UV-Licht kann es zur verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen kommen, die sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren schädigen. Eine genomweite Transkriptomanalyse nach UV-Bestrahlung von *E. coli* zeigte erhöhte mRNA-Mengen von Genen, die an der DNA-Reparatur (*lexA*, *recA*, *recD*, *recN*, *uvrB*) und an Proteolyse (*ptrB*, *clpP*, *hflX*) beteiligt sind (Quillardet *et al.*, 2003). In *B. subtilis* führt oxidativer Stress, ausgelöst durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid, zu einer verstärkten Expression von Genen, die zum CtsR- (*clpC*-Operon, *clpP* und *clpE*) und LexA-Regulon (*lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*) gehören (Mostertz *et al.*, 2004). Entsprechend könnte

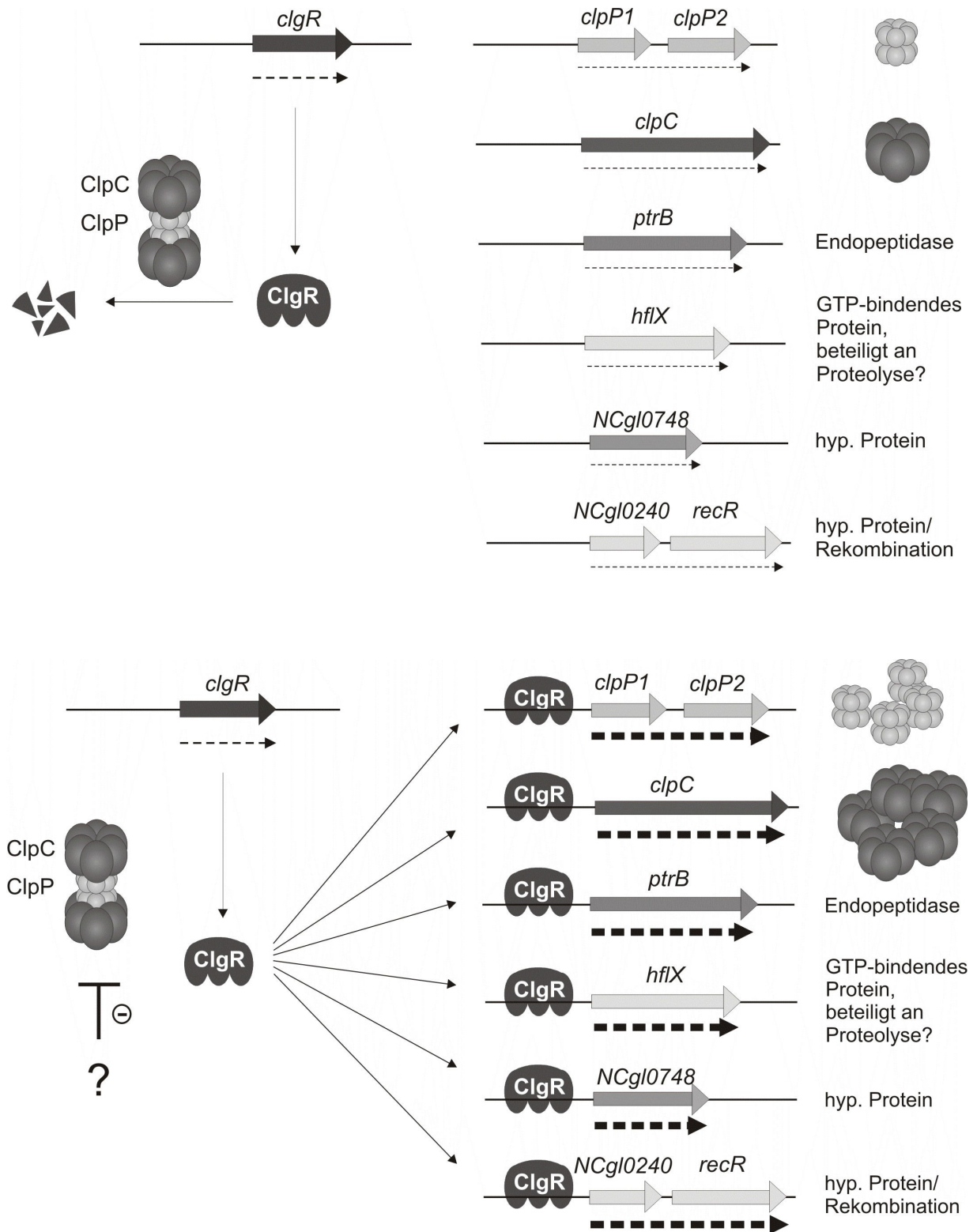
eine koordinierte Kontrolle von Genen, die an DNA-Reparatur und Proteolyse beteiligt sind, durch einen gemeinsamen Regulator wünschenswert sein. Die Zugabe von 20 mM Wasserstoffperoxid führte nicht zu einer verstärkten Expression der *clp*-Gene in *C. glutamicum* (Engels *et al.*, 2004b). Aufgrund einer sehr aktiven Katalase in *C. glutamicum* ist diese Konzentration jedoch möglicherweise zu gering, um oxidativen Stress auszulösen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Versuchsreihe mit Mitomycin C durchgeführt, das häufig für die Induktion der DNA-Reparatur-Antwort eingesetzt wird. Mitomycin C ist ein Antibiotikum mit allgemeiner cytotoxischer Aktivität, das an Desoxyguanosin binden und komplementäre DNA-Stränge kovalent verknüpfen kann. Beim Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante in Gegenwart verschiedener Mitomycin-Konzentrationen zeigte die  $\Delta clgR$ -Mutante zum ersten Mal einen im Vergleich zum Wildtyp veränderten Phänotyp. Während das Wachstum beider Stämme in der exponentiellen Phase gleich verlief, trat die  $\Delta clgR$ -Mutante in Gegenwart von Mitomycin früher und sehr abrupt in die stationäre Phase ein. In Gegenwart von Mitomycin waren die Zellen beider Stämme deutlich verlängert und erschienen an den Enden aufgequollen. Auch bezüglich der Zellmorphologie wurden in der stationären Phase Unterschiede deutlich. Die Wildtyp-Zellen waren noch länger als die Zellen der  $\Delta clgR$ -Mutante. Die beobachteten phänotypischen Unterschiede zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante deuteten auf eine Beteiligung von ClgR an der Regulation der SOS-Antwort hin. Deshalb wurden die Transkriptome von *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante jeweils vor und zwei Stunden nach Mitomycin-Zugabe miteinander verglichen. Bei einer Beteiligung von ClgR an der SOS-Antwort sollten die mRNA-Spiegel der daran beteiligten Gene im Wildtyp erhöht und in der  $\Delta clgR$ -Mutante unverändert bzw. bei dualer Kontrolle in geringerem Maße verändert sein. Aus *M. tuberculosis* und anderen Organismen ist bekannt, dass der Repressor LexA zusammen mit RecA an der Regulation der SOS-Antwort beteiligt ist. Daneben gibt es in *M. tuberculosis* auch eine LexA/RecA-unabhängige Geninduktion, für die der verantwortliche Regulator bislang noch nicht identifiziert werden konnte. Zu den LexA/RecA-unabhängig induzierten Genen gehören unter anderem auch *uvrA* und *ruvC* (Rand *et al.*, 2003). Während der mRNA-Spiegel von den Mitgliedern des ClgR-Regulons (*clpP1P2*, *clpC*, *NCgl0240-recR*) in *C. glutamicum* Wildtyp +/- Mitomycin und  $\Delta clgR$ -Mutante +/- Mitomycin gleich war, lag er bei *recA*, *uvrA*, *ruvC* und *ruvA* in der  $\Delta clgR$ -Mutante geringfügig niedriger als im Wildtyp. Lediglich bei *recN* war ein deutlicher Unterschied erkennbar. Da bei den durch ClgR regulierten Genen keine Induktion nach Mitomycin-Zugabe erkennbar war, erscheint eine Stabilisierung von ClgR unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich. Hinzu kommt, dass eine direkte Regulation von *recN*, *recA* und

*uvrA* durch ClgR zuvor nicht gezeigt werden konnte. Inwiefern ClgR indirekt, über die Regulation eines anderen Regulators, an der SOS-Antwort beteiligt ist, muss in Zukunft noch genauer untersucht werden. Dabei ist zu beachten, dass die phänotypischen Unterschiede zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante nach Mitomycin-Behandlung erst in der stationären Phase erkennbar waren und der vorliegende Transkriptomvergleich auf mRNA beruht, die kurz vor und zwei Stunden nach Mitomycin-Zugabe und somit in der exponentiellen Phase, isoliert wurde. Eventuell wäre ein direkter Vergleich von Wildtyp und  $\Delta clgR$ -Mutante in der stationären Phase sinnvoll. Zudem sollte über den Einsatz anderer Agentien, die durch oxidativen Stress DNA und Proteine schädigen, nachgedacht werden, da Mitomycin eine direkte Schädigung der DNA bewirkt.

## 6. Ausblick

In der Einleitung wurden bereits die Mechanismen der Regulation der *clp*-Gene in Enterobakterien und Gram-positiven Bakterien vorgestellt. Während in *E. coli* der Hitzeschock-Sigmafaktor  $\sigma^{32}$  die Transkription der Stress-Gene, darunter auch *clpX* und *clpP*, aktiviert (Yura *et al.*, 1993), wird in *B. subtilis* und anderen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt die *clp*-Genexpression unter normalen Bedingungen durch den negativen Regulator CtsR reprimiert (Derre *et al.*, 1999; Krüger and Hecker, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ClgR die Expression von *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX*, *clpC* und der *clpP1P2*- und *NCgl0240-recR*-Operons in *C. glutamicum* kontrolliert (Abb. 33) und somit an der Regulation von Genen beteiligt ist, deren Produkte in die unterschiedlichen physiologischen Prozesse Proteolyse und DNA-Reparatur/Rekombination involviert sind. Möglicherweise kodiert eines der bisher noch nicht funktionell charakterisierten ClgR-Zielgene einen Transkriptionsregulator, der seinerseits die Expression von *recN* und *uvrA* kontrolliert. Das würde eine hierarchische Kontrolle der Expression mit ClgR als Masterregulator bedeuten. Bisher gibt es jedoch keine bioinformatischen Hinweise, dass es sich bei einem der ClgR-Targets um einen Transkriptionsregulator handelt.

ClgR wird, wie auch  $\sigma^{32}$  und CtsR, hauptsächlich auf Stabilitätsebene durch konditionalen Abbau reguliert. Ungeklärt ist bislang jedoch, welche Bedingungen zu einer Stabilisierung von ClgR führen und wie die Konditionalität von ClgR vermittelt wird. Bedingt durch die Funktion der Mitglieder des ClgR-Regulons, die neben Proteolyse auch an der DNA-Reparatur/Rekombination beteiligt sind, erscheint eine ClgR-abhängige Regulation bei oxidativem Stress bzw. Schädigung der DNA möglich. Von  $\sigma^{32}$  und CtsR ist bekannt, dass die



**Abb. 33:** Modell zur ClgR-abhängigen Regulation von *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX*, *clpC* und der *clpP1P2*- und *NCgl0240-recR*-Operons in *C. glutamicum*. A. Unter normalen Bedingungen (nicht-Stress-Bedingungen) wird *clgR* transkribiert, das ClgR-Protein unterliegt jedoch einem sehr effektiven Abbau durch die ClpCP-Protease. Bisher ist nicht bekannt, ob noch weitere Proteine an der Degradation beteiligt sind. B. In Folge eines bisher noch unbekanntes Stimulus (möglicherweise oxidativer Stress bzw. Schädigung der DNA) kommt es zur Stabilisierung von ClgR. ClgR bindet an die Promotorregionen von *NCgl0748*, *ptrB*, *hflX*, *clpC* und der *clpP1P2*- und *NCgl0240-recR*-Operons und aktiviert die Transkription von Genen, deren Produkte an den verschiedenen Prozessen wie Proteolyse und DNA-Reparatur beteiligt sind.

Konditionalität der Degradation abhängig von weiteren Proteinen ist, welche die Regulatoren entweder direkt dem Abbau zuführen oder dafür markieren. Neben der weiteren Untersuchung des Degradationssignals sollte ein Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten deshalb auch in der Identifizierung putativer akzessorischer Proteine, die möglicherweise am konditionalen Abbau von ClgR beteiligt sind, liegen.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K. and Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol*, **13**, 279-301.
- Alonso, J.C., Shirahige, K. and Ogasawara, N. (1990) Molecular cloning, genetic characterization and DNA sequence analysis of the *recM* region of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6771-6777.
- Ansaldi, M. and Dubnau, D. (2004) Diversifying selection at the *Bacillus* quorum-sensing locus and determinants of modification specificity during synthesis of the ComX pheromone. *J Bacteriol*, **186**, 15-21.
- Arsene, F., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, **55**, 3-9.
- 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.
- Bellier, A. and Mazodier, P. (2004) ClgR, a novel regulator of *clp* and *lon* expression in *Streptomyces*. *J Bacteriol*, **186**, 3238-3248.
- Biran, D., Gur, E., Gollan, L. and Ron, E.Z. (2000) Control of methionine biosynthesis in *Escherichia coli* by proteolysis. *Mol Microbiol*, **37**, 1436-1443.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bucca, G., Brassington, A.M., Schonfeld, H.J. and Smith, C.P. (2000) The HspR regulon of *Streptomyces coelicolor*: a role for the DnaK chaperone as a transcriptional co-repressor. *Mol Microbiol*, **38**, 1093-1103.
- Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- Burkovski, A. (2003) Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 617-628.
- Busby, S. and Ebright, R.H. (1999) Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*, **293**, 199-213.
- Chuang, S.E., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Daniels, D.L. and Blattner, F.R. (1993) Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslTS/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*. *Gene*, **134**, 1-6.
- Chung, C.H., Yoo, S.J., Seol, J.H. and Kang, M.S. (1997) Characterization of energy-dependent proteases in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*, **241**, 613-616.
- Cremer, J., Eggeling, L. and Sahm, H. (1990) Cloning of the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet*, **220**, 478-480.

- Derre, I., Rapoport, G. and Msadek, T. (1999) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, **31**, 117-131.
- Derre, I., Rapoport, G. and Msadek, T. (2000) The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol Microbiol*, **38**, 335-347.
- Dougan, D.A., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K. and Bukau, B. (2002a) AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett*, **529**, 6-10.
- Dougan, D.A., Reid, B.G., Horwich, A.L. and Bukau, B. (2002b) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell*, **9**, 673-683.
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W. and Sahm, H. (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene*, **102**, 93-98.
- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Ludtke, K.U. and Sahm, H. (1994) Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology*, **140** ( Pt 8), 1817-1828.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-14868.
- Engels, S., Ludwig, C., Mack, C., Bott, M. and Schaffer, S. (2004a) The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, (in revision).
- Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M. and Schaffer, S. (2004b) *clpC* and *clpPIP2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. *Mol Microbiol*, **52**, 285-302.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell*, **11**, 671-683.
- Fountoulakis, M. and 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.
- Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J.S., Rudiger, S., Schonfeld, H.J., Schirra, C., Bujard, H. and Bukau, B. (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *Embo J*, **15**, 607-617.
- Gerth, U., Kruger, E., Derre, I., Msadek, T. and Hecker, M. (1998) Stress induction of the *Bacillus subtilis* *clpP* gene encoding a homologue of the proteolytic component of the Clp protease and the involvement of ClpP and ClpX in stress tolerance. *Mol Microbiol*, **28**, 787-802.
- Gonciarz-Swiatek, M., Wawrzynow, A., Um, S.J., Learn, B.A., McMacken, R., Kelley, W.L., Georgopoulos, C., Sliemers, O. and Zylicz, M. (1999) Recognition, targeting, and hydrolysis of the lambda O replication protein by the ClpP/ClpX protease. *J Biol Chem*, **274**, 13999-14005.



- Gonzalez, M., Rasulova, F., Maurizi, M.R. and Woodgate, R. (2000) Subunit-specific degradation of the UmuD/D' heterodimer by the ClpXP protease: the role of trans recognition in UmuD' stability. *Embo J*, **19**, 5251-5258.
- Gottesman, S., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (1997) Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell*, **91**, 435-438.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. and Sauer, R.T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev*, **12**, 1338-1347.
- Hamoen, L.W., Eshuis, H., Jongbloed, J., Venema, G. and van Sinderen, D. (1995) A small gene, designated *comS*, located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **15**, 55-63.
- Hanahan. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In M., G.D. (ed.), *DNA-cloning*. IRL-Press, Oxford/Washington DC, Vol. 1, pp. 109-135.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- Hoskins, J.R., Kim, S.Y. and Wickner, S. (2000a) Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J Biol Chem*, **275**, 35361-35367.
- Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (2000b) Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8892-8897.
- Hoskins, J.R., Yanagihara, K., Mizuuchi, K. and Wickner, S. (2002) ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11037-11042.
- Hwang, B.J., Park, W.J., Chung, C.H. and Goldberg, A.L. (1987) *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 5550-5554.
- Ikeda, M. and Nakagawa, S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **62**, 99-109.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Jakoby, M., Ngoutou-Nkili, C.E. and Burkovski, A. (1999) Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol Techniques*, **13**, 437-441.
- Jenal, U. and Fuchs, T. (1998) An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J*, **17**, 5658-5669.
- Jenal, U. and Hengge-Aronis, R. (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 163-172.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahn, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I. and Tauch,

- A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol*, **104**, 5-25.
- Kanatani, A., Masuda, T., Shimoda, T., Misoka, F., Lin, X.S., Yoshimoto, T. and Tsuru, D. (1991) Protease II from *Escherichia coli*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. *J Biochem (Tokyo)*, **110**, 315-320.
- Keiler, K.C., Waller, P.R. and Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, **271**, 990-993.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O. and 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.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1996) A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *Embo J*, **15**, 6122-6131.
- Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. (1997) Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5544-5549.
- Kim, Y.I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T. and Baker, T.A. (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol*, **8**, 230-233.
- Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation: I. Produktion of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, **3**, 193-205.
- Kock, H., Gerth, U. and Hecker, M. (2004) MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **51**, 1087-1102.
- Krüger, E. and Hecker, M. (1998) The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol*, **180**, 6681-6688.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H. and Hecker, M. (2001) Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *Embo J*, **20**, 852-863.
- Levchenko, I., Yamauchi, M. and Baker, T.A. (1997) ClpX and MuB interact with overlapping regions of Mu transposase: implications for control of the transposition pathway. *Genes Dev*, **11**, 1561-1572.
- Liebl, W. (1991) The genus *Corynebacterium*-nonmedical. In Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (ed.), *The prokaryotes*. Springer, New York, 1157-1171.

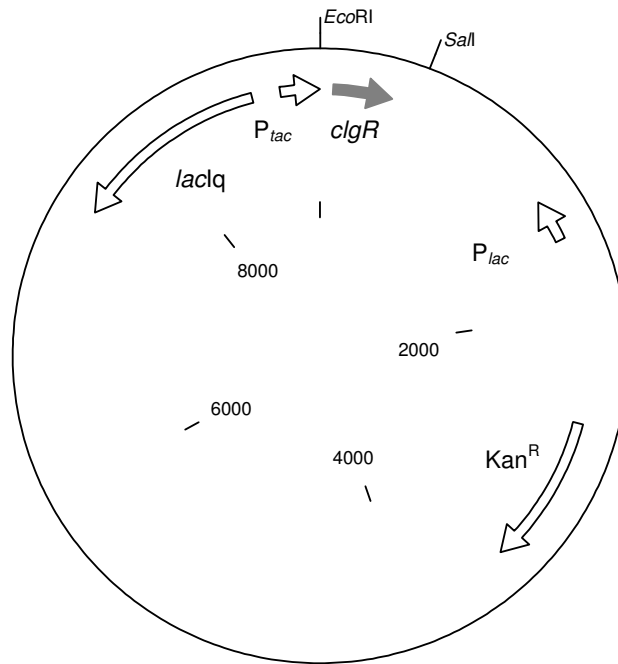
- Lim, K., Tempczyk, A., Parsons, J.F., Bonander, N., Toedt, J., Kelman, Z., Howard, A., Eisenstein, E. and Herzberg, O. (2003) Crystal structure of YbaB from *Haemophilus influenzae* (HI0442), a protein of unknown function coexpressed with the recombinational DNA repair protein RecR. *Proteins*, **50**, 375-379.
- Link, A.J., Phillips, D. and 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.
- Magnuson, R., Solomon, J. and Grossman, A.D. (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, **77**, 207-216.
- Makovets, S., Doronina, V.A. and Murray, N.E. (1999) Regulation of endonuclease activity by proteolysis prevents breakage of unmodified bacterial chromosomes by type I restriction enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9757-9762.
- Maurizi, M.R., Singh, S.K., Thompson, M.W., Kessel, M. and Ginsburg, A. (1998) Molecular properties of ClpAP protease of *Escherichia coli*: ATP-dependent association of ClpA and ClpP. *Biochemistry*, **37**, 7778-7786.
- Mostertz, J., Scharf, C., Hecker, M. and Homuth, G. (2004) Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology*, **150**, 497-512.
- Muffler, A., Bettermann, S., Haushalter, M., Horlein, A., Neveling, U., Schramm, M. and Sorgenfrei, O. (2002) Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J Biotechnol*, **98**, 255-268.
- Muffler, A., Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (1996) The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Embo J*, **15**, 1333-1339.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Nagy, I., Tamura, T., Vanderleyden, J., Baumeister, W. and De Mot, R. (1998) The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, **180**, 5448-5453.
- Niebisch, A. and Bott, M. (2001) Molecular analysis of the cytochrome bc1-aa3 branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome c1. *Arch Microbiol*, **175**, 282-294.
- Pelaez, A.I., Ribas-Aparicio, R.M., Gomez, A. and Rodicio, M.R. (2001) Structural and functional characterization of the *recR* gene of *Streptomyces*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 663-672.
- Quillardet, P., Rouffaud, M.A. and Bouige, P. (2003) DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **154**, 559-572.
- Rand, L., Hinds, J., Springer, B., Sander, P., Buxton, R.S. and Davis, E.O. (2003) The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. *Mol Microbiol*, **50**, 1031-1042.

- Reinscheid, D.J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B.J. and Sahm, H. (1994) Stable Expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and Its Effects on the Carbon Flux to Threonine and Related Amino Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 126-132.
- Rhodijs, V.A. and Busby, S.J. (1998) Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 152-159.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Santos, D. and De Almeida, D.F. (1975) Isolation and characterization of a new temperature-sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **124**, 1502-1507.
- Schäfer, A., Tauch, A., Droste, N., Pühler, A. and Kalinowski, J. (1997) The *Corynebacterium glutamicum* *cglIIM* gene encoding a 5-cytosine methyltransferase enzyme confers a specific DNA methylation pattern in an McrBC-deficient *Escherichia coli* strain. *Gene*, **203**, 95-101.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, **145**, 69-73.
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V.D., Dongmann, G., Gunther, K., Nickolaus, M., Hermann, T. and Bott, M. (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis*, **22**, 4404-4422.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci*, **21**, 289-296.
- Schlosser, T., Schmidt, G. and Stahmann, K.P. (2001) Transcriptional regulation of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Microbiology*, **147**, 3377-3386.
- Schweitzer, J.E. (2004) Untersuchungen zur *in vitro*-Aktivität der *Corynebacterium glutamicum* ClpCP-Protease und zur Expression ihrer Strukturgene. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.
- Shalon, D., Smith, S.J. and Brown, P.O. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, **6**, 639-645.
- Skerra, A. and Schmidt, T.G. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol*, **326**, 271-304.

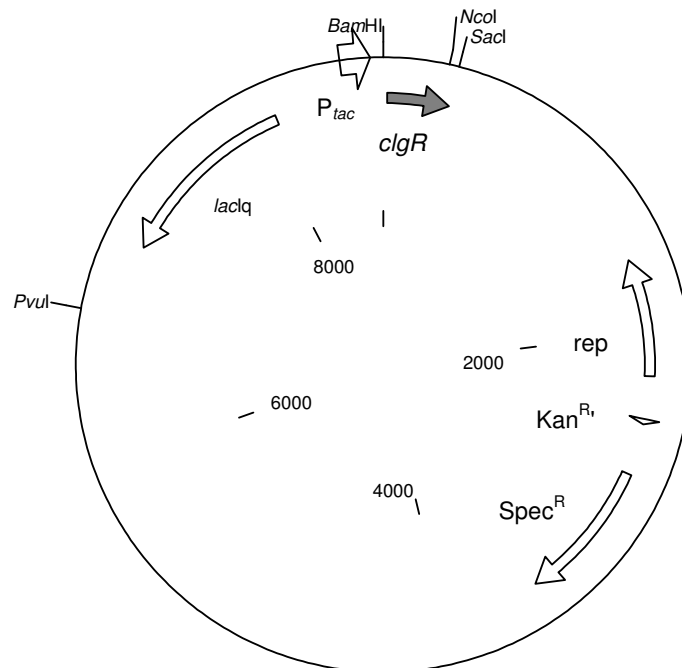
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Sobczyk, A., Bellier, A., Viala, J. and Mazodier, P. (2002) The *lon* gene, encoding an ATP-dependent protease, is a novel member of the HAIR/HspR stress-response regulon in actinomycetes. *Microbiology*, **148**, 1931-1937.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol*, **47**, 479-491.
- Stephani, K., Weichart, D. and Hengge, R. (2003) Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **49**, 1605-1614.
- Straus, D.B., Walter, W.A. and Gross, C.A. (1989) The activity of sigma 32 is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **3**, 2003-2010.
- Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R. and Burkovski, A. (2004) Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04247.x.
- Stüdemann, A., Noirclerc-Savoye, M., Klauck, E., Becker, G., Schneider, D. and Hengge, R. (2003) Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX. *Embo J*, **22**, 4111-4120.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. and Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol*, **40**, 397-413.
- Towbin, H., Staehelin, T. and 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.
- Tsai, J.W. and Alley, M.R. (2001) Proteolysis of the *Caulobacter* McpA chemoreceptor is cell cycle regulated by a ClpX-dependent pathway. *J Bacteriol*, **183**, 5001-5007.
- Tsui, H.C., Feng, G. and Winkler, M.E. (1996) Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotropic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered sigma32-specific promoters during heat shock. *J Bacteriol*, **178**, 5719-5731.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J. and Dubnau, D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *Embo J*, **17**, 6730-6738.
- Turgay, K., Hamoen, L.W., Venema, G. and Dubnau, D. (1997) Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, **11**, 119-128.

- van der Rest, M.E., Lange, C. and 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.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12142-12149.
- Viala, J. and Mazodier, P. (2002) ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol*, **44**, 633-643.
- Viala, J., Rapoport, G. and Mazodier, P. (2000) The *clpP* multigenic family in *Streptomyces lividans*: conditional expression of the *clpP3 clpP4* operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol Microbiol*, **38**, 602-612.
- Wang, J., Hartling, J.A. and Flanagan, J.M. (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell*, **91**, 447-456.
- Wendisch, V.F. (2003) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol*, **104**, 273-285.
- Yeung, T., Mullin, D.A., Chen, K.S., Craig, E.A., Bardwell, J.C. and Walker, J.R. (1990) Sequence and expression of the *Escherichia coli recR* locus. *J Bacteriol*, **172**, 6042-6047.
- Yura, T., Nagai, H. and Mori, H. (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **47**, 321-350.
- Zhou, Y., Gottesman, S., Hoskins, J.R., Maurizi, M.R. and Wickner, S. (2001) The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev*, **15**, 627-637.
- Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A. and 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.

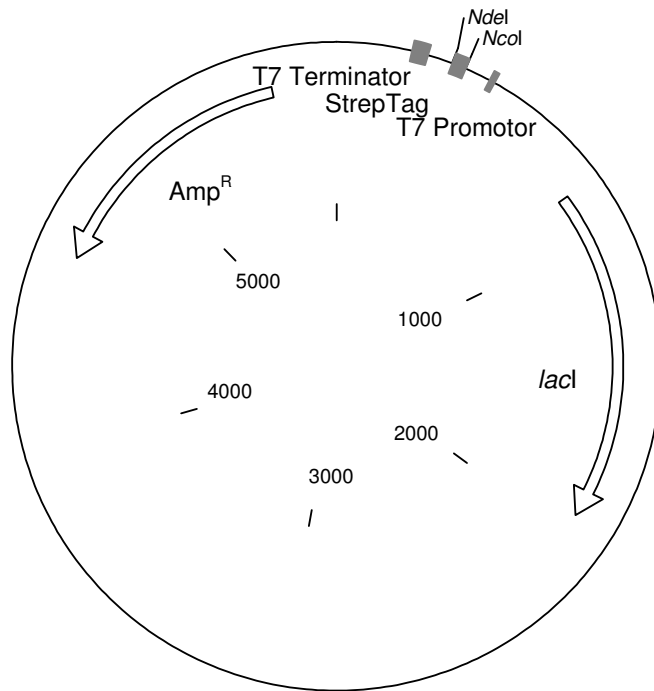
## Anhang



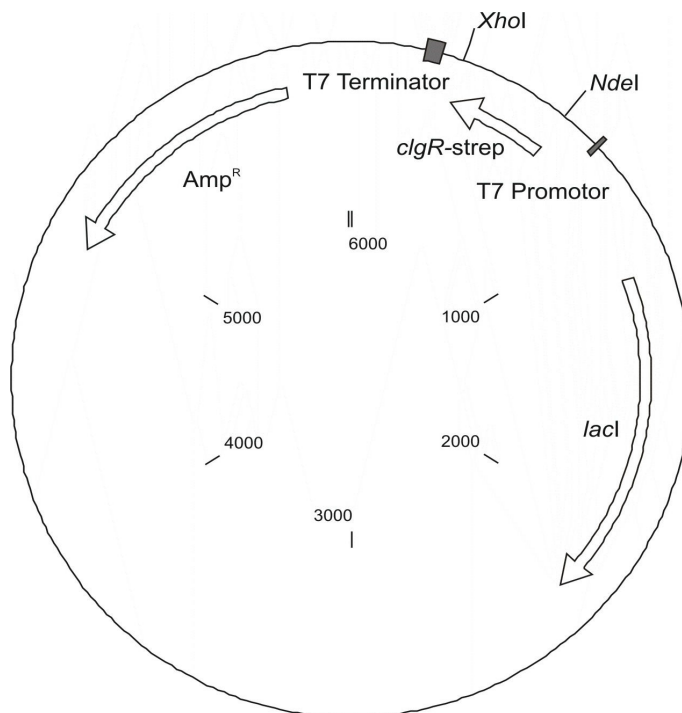
**Abb. 34:** Plasmid pEKEx1-clgR-C bzw. pEKEx1-clgR-N mit einem 0,5-kb-PCR-Fragment in den *EcoRI/SalI*-Schnittstellen, welches das *clgR*-Gen von *C. glutamicum* mit einer StrepTag-II-codierenden Sequenz am 3'-Ende (C) bzw. 5'-Ende (N) enthält. Das Fragment wurde mit den Primern pEK-popR-fw und pEK-popR-rv von pET24b-clgR-C für (C) bzw. pET16b-clgR-N (N) amplifiziert.



**Abb. 35:** Plasmid pEKEx3-clgR mit einem 0,3-kb-Mutagenese-PCR-Fragment (SC-clgR-fw2/SC-clgR-rv) in den *BamHI/SacI*-Schnittstellen, welches das *clgR*-Gen von *C. glutamicum* nach Mutagenese mit dem Difersify™ PCR Random Mutagenesis Kit enthält.

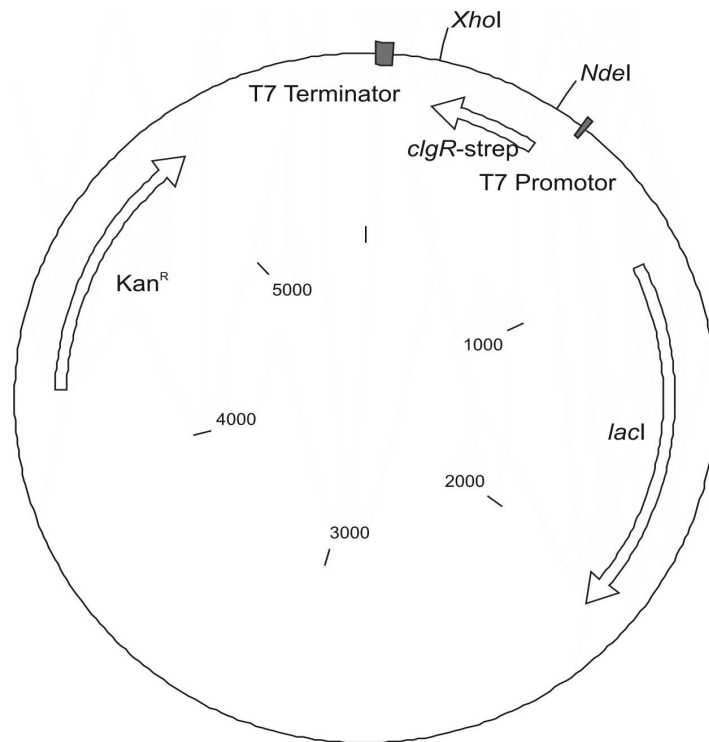


**Abb. 36:** Plasmid pET16b-StrepTag mit der StrepTag-II kodierenden Sequenz (Primer StreptagII-fw/StreptagII-rv) in den *NcoI/NdeI*-Schnittstellen.

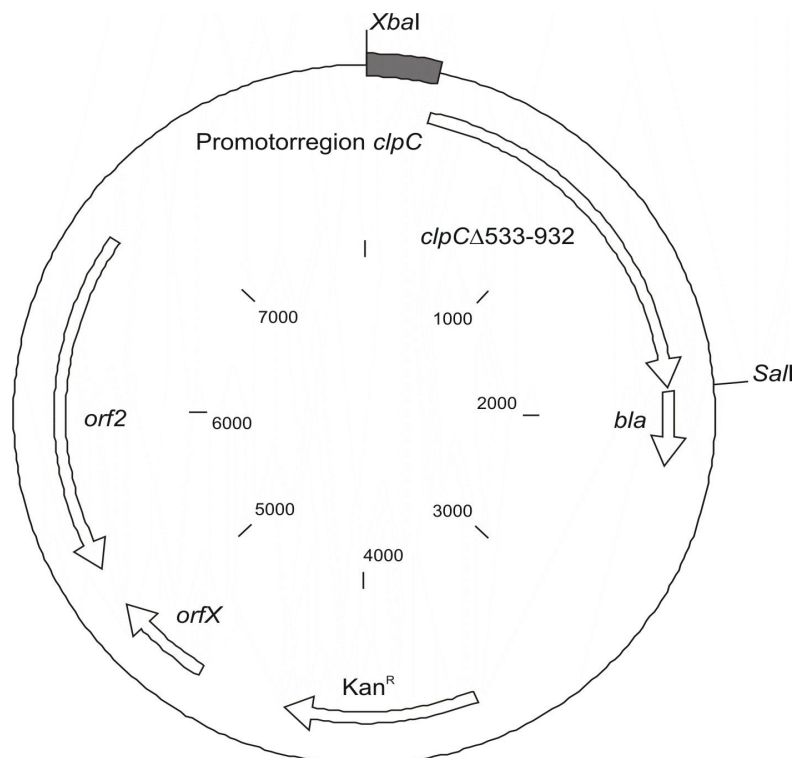


**Abb. 37:** Plasmid pET16b-clgR-N mit einem 0,3-kb-PCR-Fragment von *clgR* (OE-PopR-fw/OE-PopR-NT-rv) in den *NdeI/XhoI*-Schnittstellen zur Überproduktion von ClgR mit einem N-terminalen StrepTagII

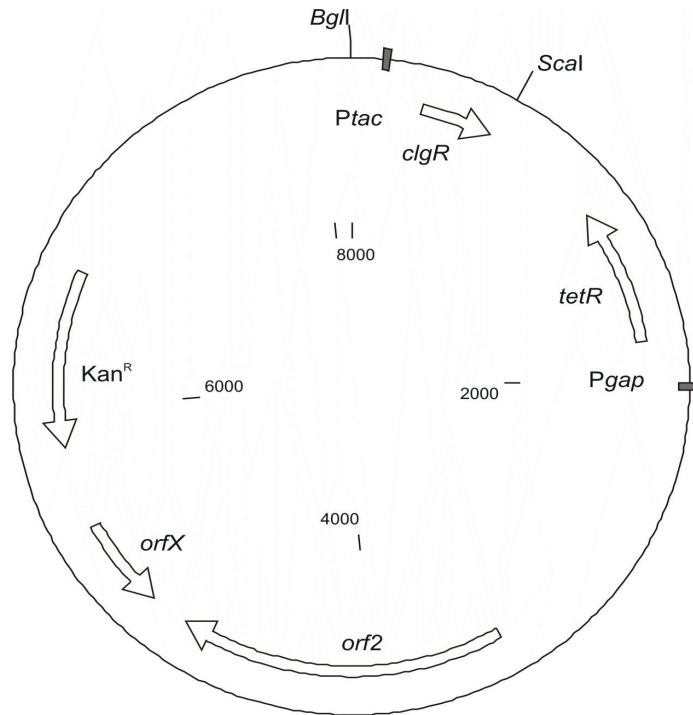




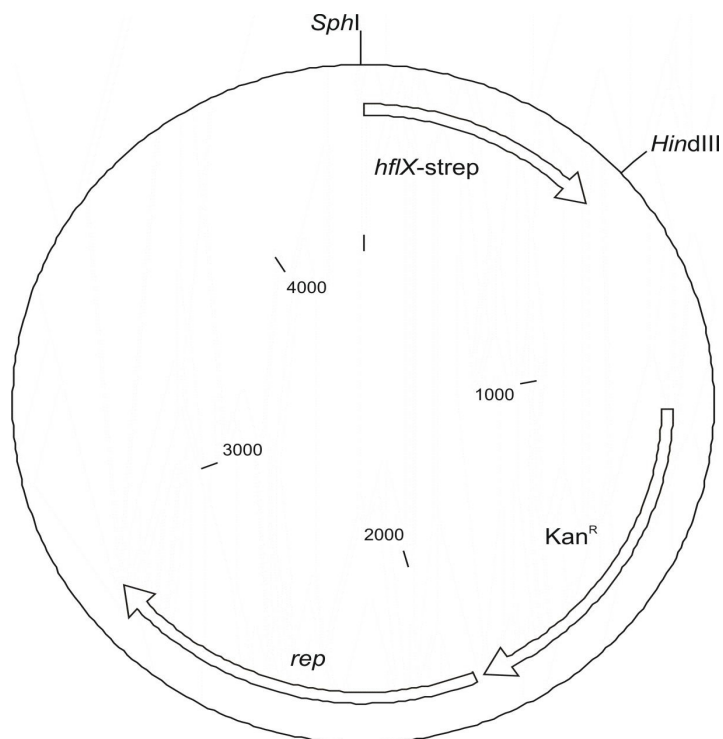
**Abb. 38:** Plasmid pET24b-clgR-C mit einem 0,3-kb-PCR-Fragment von *clgR* (OE-PopR-fw/OE-PopR-NT-rv) in den *NdeI/XhoI*-Schnittstellen zur Überproduktion von ClgR mit einem C-terminalen StrepTagII.



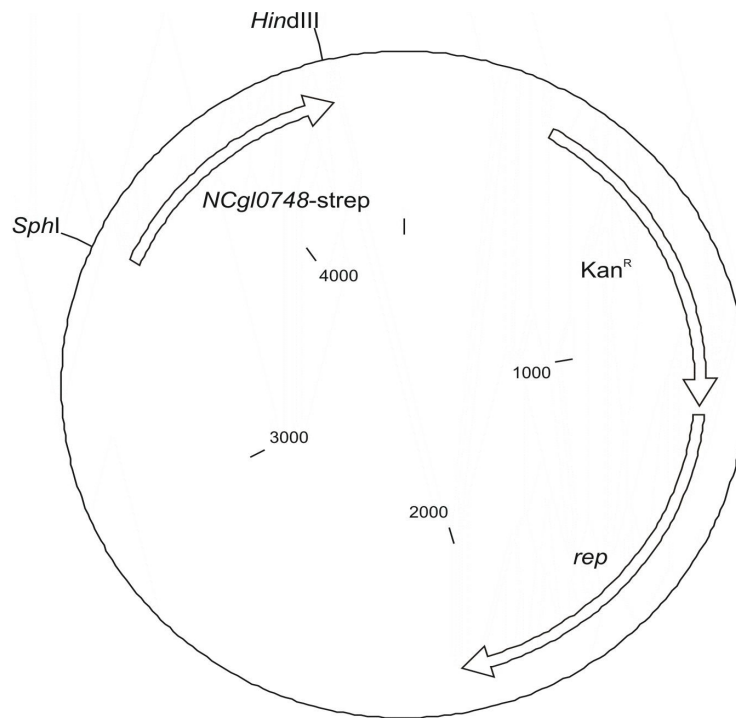
**Abb. 39:** Plasmid pJC1-clpCΔ533-932 mit einem 1,9-kb-PCR-Fragment 3 in den *XbaI/SalI*-Schnittstellen, welches die regulatorische Region von *clpC* und *clpC*Δ533-932 enthält. Das Fragment wurde mit den Primern *clpC*-HOE-fw2 und OE-*clpC*-rv3 amplifiziert.



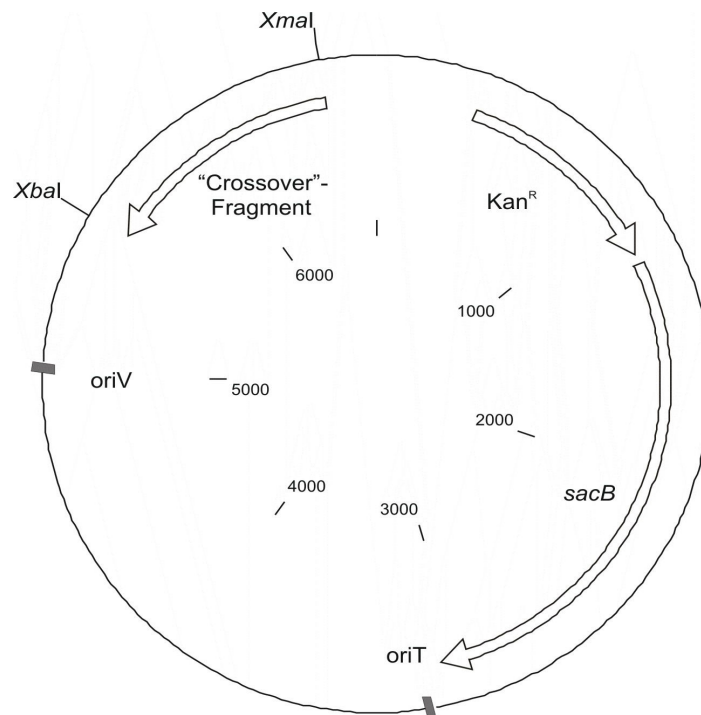
**Abb. 40:** Plasmid pJC1-P<sub>gap</sub>-tetR-P<sub>tac</sub>-clgR ist ein pJC1-P<sub>gap</sub>-tetR-Derivat mit einem 0,7-kb-Fragment in den *Scal/BglI*-Schnittstellen, welches P<sub>tac</sub> und *clgR* enthält. Das Fragment wurde mit den Primern 873/874 von pXMJ19-clgR amplifiziert.



**Abb. 41:** Plasmid pK18-hflX-strep mit einem 0,6-kb-PCR-Fragment (Primer Strep-hflX-fw/Strep-hflX-rv) in den *SphI/HindIII*-Schnittstellen, welches das 3'-Ende von *hflX* mit einer StrepTag-II kodierenden Sequenz am 3'-Ende enthält.



**Abb. 42:** Plasmid pK18-NCgl0748-strep mit einem 0,6-kb-PCR-Fragment (Primer Strep-orf1309-fw/Strep-orf1309-rv) in den *SphI/HindIII*-Schnittstellen, welches das 3'-Ende von *NCgl0748* mit einer StrepTag-II kodierenden Sequenz am 3'-Ende enthält.



**Abb. 43:** Plasmid pK19ms- $\Delta$ hflX (bzw. pK19ms- $\Delta$ NCgl0748) mit einem 0,9-kb-(1,1-kb)-„Crossover“-PCR-Fragment in den *XbaI/XmaI*-Schnittstellen, das die flankierenden Bereiche von *hflX* (*NCgl0748*) umfasst.

**Tabelle 10:** Transkriptomvergleich von *C. glutamicum*  $\Delta$ NCgI0748 und Wildtyp nach Anzucht in LB-Medium mit 4% Glucose. Die Tabelle zeigt alle Gene, deren mRNA-Spiegel in den Vergleichenen *C. glutamicum*  $\Delta$ NCgI0748/Wildtyp in mindestens zwei Experimenten 2-fach und mehr verändert war. Es sind jeweils die Mittelwerte der Mediane ( $\emptyset$ ) mit der zugehörigen Standardabweichung (SD), die Ergebnisse des Student's T-Test (p-Wert) und die putative Funktion, angegeben.

ORF	NCBI	Annotation	Exp.1	Exp.2	Exp.3	$\emptyset$	SD	p-Wert
122	NCgI2657	Phosphat-Acetyltransferase	0,63	0,43	0,42	0,49	0,11	0,015
194	NCgI2714	Hypothetisches Protein Rv2393 <i>M. tuberculosis</i>	0,44	0,46	0,34	0,41	0,07	0,006
195	NCgI2715	Sulfat-Adenylyltransferase, lange Kette	0,48	0,31	0,21	0,33	0,13	0,020
196	NCgI2716	Sulfat-Adenylyltransferase, kurze Kette		0,20	0,27	0,23	0,06	0,037
197	NCgI2717	3-Phosphoadenosin 5-Phosphosulfat Reduktase <i>cysH</i>	0,20	0,14	0,09	0,14	0,05	0,007
198	NCgI2718	Hypothetisches Protein	0,25	0,16	0,16	0,19	0,05	0,004
199	NCgI2718	Nitrit Reduktase <i>nirA</i>	0,25	0,23	0,13	0,20	0,07	0,008
200	NCgI2719	Ferredoxin/Ferredoxin-NADP Reduktase	0,31	0,26	0,20	0,26	0,06	0,005
281	NCgI2787	Dimethylanilin-Monooxygenase	0,45	0,64	0,58	0,56	0,10	0,015
394	3177635-3177090	IS1628 Transposase TnpB (putativer frameshift)	0,53		0,46	0,49	0,05	0,033
830	NCgI0359	Succinat Dehydrogenase C oder D <i>sdhCD</i>	0,46	0,62	0,43	0,50	0,11	0,013
831	NCgI0360	Succinat Dehydrogenase A <i>sdhA</i>	0,46	0,66	0,42	0,51	0,13	0,020
886	436432-436641	Hypothetisches Protein SCE68.25c	0,26	0,38	0,39	0,34	0,07	0,007
909	NCgI0414	Uroporphyrinogen-III Synthase <i>hemD</i>	0,34	0,67	0,48	0,49	0,17	0,033
965	NCgI0460	Ribosomales Protein L1	0,52	0,42	0,64	0,53	0,11	0,016
974	NCgI0467	Unbekannter ORF	0,58	0,37	0,63	0,53	0,14	0,029
976	NCgI0468	50s Ribosomales Protein L10	0,37	0,18	0,58	0,37	0,20	0,045
988	NCgI0476	30S Ribosomales Protein S12 <i>rpsL</i>	0,41	0,46	0,56	0,47	0,07	0,007
989	NCgI0477	30S Ribosomales Protein S7	0,38	0,25	0,59	0,41	0,18	0,032
993	NCgI0494	Ribosomales Protein L16	0,43	0,37	0,76	0,52	0,21	0,045
994	NCgI0495	Ribosomales Protein L29	0,39	0,25	0,60	0,41	0,17	0,033
1000	NCgI0500	Ribosomales Protein L24	0,40	0,38	0,66	0,48	0,16	0,025
1011	NCgI0510	Methyl-Coenzyme M-Reduktase Komponente A2	0,38	0,66	0,69	0,58	0,17	0,049
1012	NCgI0511	Hypothetisches Protein YbaF	0,43	0,63	0,53	0,53	0,10	0,015

Fortsetzung Tabelle 10

ORF	NCBI	Annotation	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Ø	SD	p-Wert
1020	NCgI0517	50s Ribosomales Protein L18	0,38	0,32	0,73	0,48	0,22	0,045
1044	NCgI0536	Translations Initiations Faktor IF-1	0,37	0,38	0,49	0,41	0,07	0,005
1045	NCgI0537	Unbekannter ORF	0,40	0,29	0,50	0,40	0,10	0,013
1046	NCgI0537	30s Ribosomales Protein S13	0,34	0,23	0,46	0,34	0,11	0,015
1047	NCgI0538	30s Ribosomales Protein S11	0,55	0,38	0,54	0,49	0,09	0,013
1048	NCgI0539	30s Ribosomales Protein S4	0,49	0,36	0,58	0,47	0,11	0,016
1069	NCgI0556	Ribosomales Protein L13 <i>rplM</i>	0,57	0,52	0,41	0,50	0,08	0,010
1136	NCgI0610	Lipoprotein-28 Vorläufer	0,61	0,75	0,41	0,59	0,17	0,045
1154	NCgI0625	O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase <i>metY</i>	0,59	0,56	0,33	0,49	0,14	0,030
1155	NCgI0626	Unbekannter ORF	0,21	0,23	0,11	0,18	0,07	0,010
1309	NCgI0748	Hypothetisches Protein Rv3195 <i>M. tuberculosis</i>	0,32	0,29	0,08	0,23	0,13	0,036
1313	NCgI0752	Hypothetisches Membranprotein <i>M. tuberculosis</i>	0,49	0,44	0,25	0,39	0,12	0,021
1329	840431- 840210	Hypothetisches Protein	0,25	0,33	0,36	0,31	0,06	0,004
1332	841149- 841325	Hypothetisches Protein	0,41	0,44	0,63	0,49	0,12	0,016
1381	NCgI0798	Integrales Membranprotein <i>S. coelicolor</i>	0,46	0,38	0,54	0,46	0,08	0,008
1386	NCgI0802	Fettsäure-Synthase	0,59	0,27	0,37	0,41	0,17	0,028
1388	NCgI0802	Fettsäure-Synthase	0,56	0,34	0,41	0,44	0,11	0,015
1420	NCgI0833	Ribosomales Protein L33	0,41	0,36	0,59	0,45	0,12	0,016
1582	NCgI0962	Lactam verwertendes Protein <i>lamB</i>	0,58	0,45	0,38	0,47	0,10	0,013
1584	1059853- 1060128	Unbekannter ORF	0,53		0,47	0,50	0,05	0,028
1585	NCgI0965	Transkriptionsregulator der GntR-Familie	0,65	0,54	0,39	0,52	0,13	0,025
1679	NCgI1053	GTPase <i>bipA</i>	0,49	0,74	0,49	0,57	0,14	0,028
2072	NCgI1901	Ribosomales Protein S15 <i>rpsO</i>	0,44	0,57	0,63	0,55	0,10	0,015
2087	NCgI1912	Antiterminations Faktor <i>nusA</i>	0,47	0,59	0,57	0,54	0,06	0,006
2168	2165352	Unbekannter ORF	0,33	0,47	0,54	0,45	0,11	0,015

Fortsetzung Tabelle 10

ORF	NCBI	Annotation	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Ø	SD	p-Wert
	1610192-							
2406	1609842	Hypothetisches Protein	0,52	0,34	0,58	0,48	0,12	0,021
2411	NCg11472	Methylmalonyl-CoA Mutase <i>mutA</i>	0,71	0,45	0,54	0,57	0,13	0,025
2513	NCg11548	Carbamoyl-Phosphat Synthase kurze Kette	0,51	0,43	0,67	0,54	0,12	0,020
2567	NCg11391	Hypothetisches Protein	0,48	0,79	0,50	0,59	0,17	0,039
2648	NCg11324	Translations Initiations Faktor IF-3	0,37	0,52	0,46	0,45	0,08	0,008
2687	NCg11296	Hypothetisches Protein	0,60	0,44	0,58	0,54	0,09	0,012
2792	NCg11223	Acetolactat Synthase <i>ilvN</i>	0,51	0,39	0,66	0,52	0,13	0,024
2850	NCg12504	Hypothetisches Protein	0,32	0,19	0,56	0,35	0,19	0,036
2965	NCg12350	Oligopeptidtransport-ATP-bindendes Protein <i>appF</i>	0,52	0,49	0,28	0,43	0,13	0,023
2966	NCg12350	Oligopeptidtransport-ATP-bindendes Protein <i>oppD</i>	0,54	0,74	0,40	0,56	0,17	0,041
2968	NCg12351	Dipeptidtransport-System Permease <i>dppC</i>	0,51	0,37	0,25	0,38	0,13	0,021
2969	NCg12352	Nickel-Transport-System Permease <i>nikB</i>	0,65	0,45	0,28	0,46	0,18	0,038
2978	NCg12360	Cystathionin Gamma-Synthase <i>metB</i>	0,47	0,52	0,41	0,47	0,05	0,004
2998	NCg12373	L-Arabinose Transportprotein <i>araQ</i>	0,44	0,46	0,46	0,45	0,01	0,004
2999	NCg12374	Maltose-Transportprotein <i>amyD</i>	0,42	0,39	0,61	0,47	0,12	0,016
3002	NCg12376	Unbekannter ORF	0,44	0,43	0,53	0,47	0,06	0,004
3004	NCg12377	ABC-Typ Zucker-Transporter ATP-bindende Komponente <i>msiK</i>	0,32	0,47	0,38	0,39	0,08	0,007
3072	NCg12261	Ribosomales Protein S20 <i>rpsT</i>	0,47	0,66	0,42	0,52	0,12	0,018
3073	NCg12290	Hypothetisches Protein	0,47		0,53	0,50	0,04	0,028
3191	NCg12170	Hypothetisches Protein RP367 <i>Rickettsia prowazekii</i>	0,44	0,47	0,48	0,46	0,02	0,000
3250	NCg11705	Stress-sensitives Restriktions-System-Protein 2 <i>clgIIR</i>	0,53		0,50	0,51	0,02	0,008
3289	NCg12993	50s Ribosomales Protein L34 <i>rpmH</i>	0,39	0,69	0,44	0,51	0,16	0,028
3510	NCg12409	Hypothetisches Protein	0,43	0,60	0,68	0,57	0,13	0,026
3511	NCg12409	Fettsäure-Synthase	0,34	0,42	0,47	0,41	0,07	0,006
3530	NCg10027	ABC Transporter	0,52		0,49	0,50	0,02	0,007
3552	NCg10485	Acetyl-CoA Hydrolase <i>aarC</i>	0,46	0,55	0,58	0,53	0,06	0,006
3553	NCg10487	Ribosomales Protein L3 <i>rplC</i>	0,31	0,23	0,46	0,33	0,11	0,015

Fortsetzung Tabelle 10

ORF	NCBI	Annotation	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Ø	SD	p-Wert
3554	NCgI0488	Ribosomales Protein L4 <i>rplD</i>	0,26	0,22	0,48	0,32	0,14	0,019
3555	NCgI0490	Ribosomales Protein L2 <i>rplB</i>	0,30	0,24	0,57	0,37	0,18	0,028
3618	NCgI1625	Hypothetisches Protein	0,60	0,75	0,40	0,58	0,18	0,048
3697	NCgI2294	Oligopeptid-bindendes Protein <i>oppA</i>	0,35		0,45	0,40	0,08	0,047
3744	NCgI2562	Häm-bindender Lipoprotein-Vorläufer <i>hbpA</i>	0,43	0,33	0,45	0,41	0,06	0,005
3746	NCgI2564	Oligopeptid-Transporter <i>oppD</i>	0,27	0,17	0,54	0,33	0,19	0,035
	188104-							
3771	188256	O-Methyl-Transferase <i>mdmC</i>	0,51	0,42	0,78	0,57	0,18	0,042
3775	NCgI0489	Ribosomales Protein L23 <i>rplW</i>	0,24	0,16	0,44	0,28	0,14	0,022
3776	NCgI0486	Ribosomales ProteinS10 <i>rpsJ</i>	0,25	0,19	0,45	0,30	0,14	0,020
3778	NCgI0492	Ribosomales Protein L22 <i>rplV</i>	0,27	0,19	0,60	0,36	0,22	0,039
67003	NCgI2563	AX067003.fas .0.81	0,46	0,51	0,56	0,51	0,05	0,003
67057	NCgI2562	AX067057.fas .0.85	0,29	0,21	0,43	0,31	0,11	0,014
67061	NCgI2562	AX067061.fas .0.87	0,47	0,50	0,53	0,50	0,03	0,001
16	NCgI2582	L-2,3-Butanediol-Dehydrogenase	2,27	1,76	2,10	2,04	0,26	0,005
227	NCgI2740	Flavohämoglobin	2,83	2,33	2,35	2,50	0,28	0,002
306	NCgI2810	L-Lactat-Dehydrogenase	1,90	3,00	3,58	2,82	0,85	0,016
313	NCgI2817	L-Lactat-Dehydrogenase <i>lldA</i>	1,97	1,79	2,67	2,15	0,47	0,012
454	NCgI0074	Virginiamycin S Resistenz-Protein	4,69	14,35	13,55	10,86	5,36	0,012
455	NCgI0075	Creatinin-Deaminase	7,21	14,79	9,89	10,63	3,84	0,004
466	NCgI0083	Urease Gamma Untereinheit <i>ureA</i>	7,40	5,23	7,92	6,85	1,43	0,002
467	NCgI0084	Urease Beta Untereinheit <i>ureB</i>	9,38		10,73	10,05	0,95	0,009
468	NCgI0085	Urease Alpha Untereinheit <i>ureC</i>	12,60		11,85	12,23	0,53	0,002
470	NCgI0087	Urease-Akzessorisches-Protein <i>ureF</i>	8,41	6,58	8,13	7,71	0,98	0,001
471	NCgI0088	Urease-Akzessorisches-Protein <i>ureG</i>	2,30	2,37	4,16	2,94	1,05	0,016
472	NCgI0089	Urease-Akzessorisches-Protein <i>ureD</i>	3,43	3,45	3,12	3,33	0,19	0,000
575	NCgI0182	Glutamin 2-Oxoglutarat Aminotransferase <i>gltD</i>	20,40	13,78	13,24	15,81	3,98	0,001

Fortsetzung Tabelle 10

ORF	NCBI	Annotation	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Ø	SD	p-Wert
576	201580-201341	Unbekannter ORF	2,56		3,36	2,96	0,57	0,039
748	NCg10308	Hypothetisches Protein <i>uu033 Ureaplasma urealyticum</i>	2,32	2,36	2,16	2,28	0,10	0,000
927	NCg10430	Arsen-Resistenz-Operon Repressor <i>arsR</i>	1,79	2,22	1,84	1,95	0,23	0,004
1170	NCg10637	Eisen-Transporter <i>irp1C</i>	2,04	2,19	2,54	2,26	0,26	0,003
1239	NCg10691	Hypothetisches Protein <i>ywjB</i>	2,37	2,72	1,86	2,31	0,43	0,008
1244	NCg10696	Hypothetisches Protein	1,49	2,11	2,94	2,18	0,73	0,030
1249	NCg10700	RNA Helicase	2,72	3,13	1,68	2,51	0,75	0,020
1250	NCg10701	Hypothetisches Protein	2,63	3,15	2,14	2,64	0,51	0,006
1346	NCg10773	Vibriobactin-verwendendes Protein <i>viuB</i>	2,58	1,54	3,13	2,42	0,81	0,028
1347	NCg10774	Eisen(III) Dicitrat-Transport-Permease	2,24	1,61	3,36	2,40	0,89	0,029
1498	NCg10893	Amid-Harnstoff bindendes Protein <i>fmdD</i>	10,74	8,82	35,34	18,30	14,79	0,012
1500	NCg10895	Leucin-Transporter <i>livM</i>	14,81	10,66	11,91	12,46	2,13	0,001
1501	NCg10896	Transporter verzweigtetiger Aminosäuren <i>livG</i>	5,69	3,82	6,45	5,32	1,36	0,004
2173	NCg11981	[PII]-Uridilyltransferase <i>glnD</i>	6,32	3,88	10,38	6,86	3,28	0,011
2175	NCg11982	PII-Signaltransduktionsprotein PH <i>glnK</i>	5,78	6,61	9,71	7,36	2,07	0,003
2176	NCg11983	Ammoniumtransporter <i>amtB</i>	4,14	3,57	9,96	5,89	3,53	0,017
2233	NCg12027	Hypothetisches Protein Rv2622 <i>M. tuberculosis</i>	2,42	1,74	2,36	2,17	0,38	0,009
2476	NCg11518	Transposase	2,08	3,78	3,83	3,23	0,99	0,014
2477	2697307-2697044	Hypothetisches Protein	5,22	6,64	13,51	8,45	4,44	0,009
2478	NCg11519	Sarcosin-Oxidase	14,01	8,91	26,69	16,54	9,15	0,007
2480	NCg11521	Ammoniumtransporter <i>amt</i>	14,81	22,90	60,77	32,82	24,53	0,008
2703	NCg11289	RhsE	3,73		2,74	3,23	0,71	0,041
2705	NCg11288	Hypothetisches Protein	2,17		2,21	2,19	0,03	0,000
2754	1366244-1366474	Hypothetisches Protein	8,13	4,48	5,78	6,13	1,85	0,004



Fortsetzung Tabelle 10

ORF	NCBI	Annotation	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Ø	SD	p-Wert
2907	2695813-2697213	Tansposase <i>tpaA</i>	1,59	3,90	4,04	3,17	1,37	0,035
2919	NCg12451	Hypothetisches Protein MTH1674 <i>M. thermoautotrophicum</i>	7,32	6,61	3,86	5,93	1,83	0,006
2920	NCg12450	Hypothetisches Protein APE2147 <i>Aeropyrum pernix</i>	17,16	16,80	14,75	16,24	1,30	0,000
2935	NCg12327	ClpP2	1,79	1,33	2,69	1,94	0,69	0,044
3347	NCg11646	Hypothetisches Protein	4,68	1,92	3,55	3,38	1,39	0,023
3472	NCg12439	Nichthäm-Ferritin <i>fm</i>	1,81	1,74	2,35	1,97	0,33	0,009
3700	NCg12297	Malate-Dehydrogenase <i>mdh</i>	3,17	2,69	3,05	2,97	0,25	0,001
64895	NCg12297	AX064895.fas .0.102	3,94	2,55	3,64	3,37	0,73	0,006

**Tabelle 13:** Transkriptomvergleich von *C. glutamicum*  $\Delta$ NCgl0748 und *C. glutamicum* Wildtyp nach Anzucht in LB-Medium mit 4% Glucose und 1% Ammoniumsulfat. Die Tabelle zeigt alle Gene, deren mRNA-Spiegel in dem Vergleich *C. glutamicum*  $\Delta$ NCgl0748/Wildtyp 2-fach und mehr verändert war. Es sind der relative mRNA-Spiegel und die putative Funktion angegeben.

ORF	NCGL	Annotation	mRNA-Spiegel
227	NCgl2740	Flavohämoglobin	5,00
306	NCgl2810	L-Lactat-Dehydrogenase	2,17
312	NCgl2816	Shikimate-Transporter <i>shiA</i>	2,71
313	NCgl2817	L-Lactat-Dehydrogenase <i>lldA</i>	2,83
1168	NCgl0635	ViuB	2,01
1169	NCgl0636	Eisen-Transporter <i>irp1D</i>	2,36
1170	NCgl0637	Eisen-Transporter <i>irp1C</i>	3,46
1171	NCgl0638	Eisen-Transporter <i>irp1B</i>	2,20
1240	NCgl0692	Hypothetisches Protein SCJ9A.21 <i>S. coelicolor</i>	2,16
1242	NCgl0694	Trehalose/Maltose-Transporter <i>malG</i>	3,17
1243	NCgl0695	Trehalose/Maltose-Transporter <i>malF</i>	2,83
1244	NCgl0696	Hypothetisches Protein	2,53
1247	NCgl0699	Hypothetisches Protein TcsEorf2 <i>L. lactis</i>	2,03
1249	NCgl0700	RNA Helicase	2,50
1250	NCgl0701	Hypothetisches Protein	3,00
1293	NCgl0734	Transkriptionsaktivator <i>whiB1</i>	2,02
1451	NCgl0856	Glycin-BetaineTransporter <i>betP</i>	2,13
1468	NCgl0870	Cadmium-Resistenz Protein <i>cadD</i>	2,51
1574	NCgl0956	Hypothetisches Protein	2,03
1860	NCgl1204	ABC Transporter <i>rbsA</i>	2,19
1864	NCgl1208	Acetyltransferase	2,20
1925	NCgl2936	Hypothetisches Protein Rv1217c <i>M. tuberculosis</i>	2,08
1963	NCgl1816	Integrase	3,12
2435	NCgl1489	Unbekannter ORF	2,12
2479	NCgl1520	Ornithin-Cyclodecarboxylase	2,49
	1366474-		
2754	1366244	Hypothetisches Protein	2,35
2825	NCgl2523	Transkriptions Regulator <i>ydcC</i>	2,79
2826	NCgl2522	Resistenz-Protein <i>qacA</i>	2,40
2830	NCgl2519	Transkriptions Regulator <i>tipA</i>	2,26
		Hypothetisches Protein MTH1674 <i>M.</i>	
2919	NCgl2451	<i>thermoautotrophicum</i>	3,98
2920	NCgl2450	Hypothetisches Protein APE2147 <i>A. pernix</i>	6,53
3308	NCgl0014	Hypothetisches Protein	2,06
3459	NCgl2971	NAD(P)H abhängige Quinon-Oxidoreductase <i>qor</i>	2,34
3507	NCgl2411	Lipoprotein D Vorläufer <i>nlpD</i>	2,34
3642	NCgl1720	Hypothetisches Protein <i>tolB</i>	2,14
3700	NCgl2297	Malat-Dehydrogenase <i>mdh</i>	2,25
3769	NCgl0174	O-Methyl-Transferase <i>mdmC</i>	4,37
64895	NCgl2297	AX064895.fas .0.102	2,32
189	NCgl2709	Alkohol-Dehydrogenase	0,50
194	NCgl2714	Hypothetisches Protein Rv2393 <i>M. tuberculosis</i>	0,34
195	NCgl2715	Sulfat-Adenylyltransferase große Kette	0,38

Fortsetzung Tabelle 13

ORF	NCGL	Annotation	mRNA-Spiegel
196	NCgl2716	Sulfat-Adenylyltransferase kleine Kette <i>cysD</i> 3-Phosphoadenosin 5-Phosphosulfat Reduktase	0,35
197	NCgl2717	<i>cysH</i>	0,21
198	NCgl2718	Hypothetisches Protein	0,22
199	NCgl2718	Nitrit-Reduktase <i>nirA</i>	0,22
200	NCgl2719	Ferredoxin/Ferredoxin-NADP Reduktase	0,24
207	NCgl2726	Hypothetisches Protein <i>yfIP</i>	0,31
225	NCgl2737	Membranprotein SCE20.08c <i>S. coelicolor</i>	0,48
281	NCgl2787	Dimethylanilin-Monooxygenase	0,32
1155	NCgl0626	Unbekannter ORF	0,14
1156	NCgl0626	Kohlenstoff-Speicherprotein <i>cstA</i>	0,27
1309	NCgl0748	Hypothetisches Protein Rv3195 <i>M. tuberculosis</i>	0,14
1313	NCgl0752	Hypothetisches Protein	0,31
1381	NCgl0798	Hypothetisches Protein	0,19
1382	NCgl0799	Natrium:Solute Symporter	0,33
1386	NCgl0802	Fettsäuresynthase	0,29
1388	NCgl0802	Fettsäuresynthase	0,40
1505	NCgl0900	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase <i>gap2</i>	0,50
1584	1060128	Unbekannter ORF	0,29
1888	NCgl2904	malic enzyme <i>mez</i>	0,44
2041	NCgl1876	Glutamat-Bindeprotein <i>gluB</i>	0,42
2042	NCgl1877	Glutamat-Transport (Permease) <i>gluC</i>	0,37
2092	NCgl1915	Oligopeptid-bindendes Protein <i>oppA</i>	0,17
2093	NCgl1915	Oligopeptid-bindendes Protein <i>oppA</i>	0,12
2094	NCgl1916	Oligopeptid-bindendes Protein <i>oppB</i>	0,28
2096	NCgl1918	Oligopeptid-bindendes Protein <i>oppD</i>	0,46
2632	NCgl1337	Esterase <i>estA</i>	0,49
2881	NCgl2480	Succinyl-CoA: Acetat Coenzyme A Transferase <i>cat</i>	0,46
2970	NCgl2353	Oligopeptid ABC Transporter <i>appA</i>	0,45
3191	NCgl2170	Hypothetisches Protein RP367 <i>R. prowazekii</i>	0,36
3359	NCgl1656	Hypothetisches Protein	0,43
3618	NCgl1625	Hypothetisches Protein	0,39
3619	NCgl1626	Hypothetisches Protein AAD39626.2 <i>P. pentosaceus</i>	0,48
3620	NCgl1626	Flavoprotein <i>dfp</i>	0,50
3744	NCgl2562	Häm-bindender Lipoprotein Vorläufer <i>hbpA</i>	0,41
3746	NCgl2564	Oligopeptid-bindendes Protein <i>oppD</i>	0,36
3792	NCgl2112	Cytochrom-c Oxidase Untereinheit III <i>ctaE</i>	0,49
67057	NCgl2562	AX067057.fas .0.85	0,27
67061	NCgl2562	AX067061.fas .0.87	0,45

