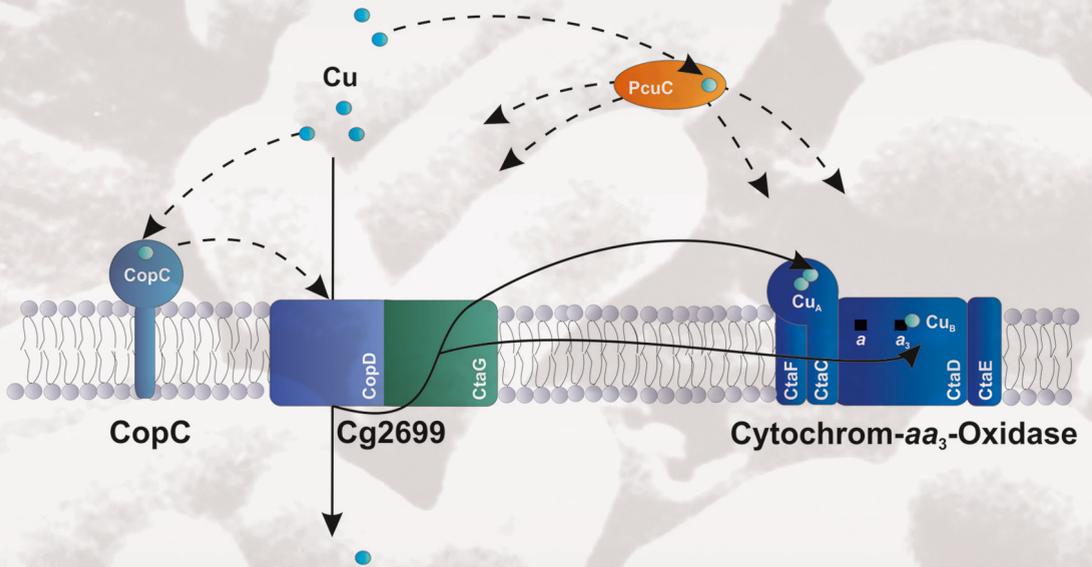


# Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*

Xenia Schuplezow



Gesundheit / Health  
Band / Volume 80  
ISBN 978-3-95806-085-2





Forschungszentrum Jülich GmbH  
Institut für Bio-und Geowissenschaften  
Biotechnologie (IBG-1)

# Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*

Xenia Schuplezow

Schriften des Forschungszentrums Jülich  
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 80

---

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-95806-085-2

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.  
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der  
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten  
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber  
und Vertrieb:           Forschungszentrum Jülich GmbH  
                              Zentralbibliothek, Verlag  
                              52425 Jülich  
                              Tel.:   +49 2461 61-5368  
                              Fax:    +49 2461 61-6103  
                              E-Mail: [zb-publikation@fz-juelich.de](mailto:zb-publikation@fz-juelich.de)  
                              [www.fz-juelich.de/zb](http://www.fz-juelich.de/zb)

Umschlaggestaltung:   Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck:                    Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright:              Forschungszentrum Jülich 2015

Schriften des Forschungszentrums Jülich  
Reihe Gesundheit / Health, Band / Volume 80

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2015)

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-95806-085-2

Vollständig frei verfügbar über das Publikationsportal des Forschungszentrums Jülich (JuSER)  
unter [www.fz-juelich.de/zb/openaccess](http://www.fz-juelich.de/zb/openaccess).

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder  
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder  
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

## Inhaltsverzeichnis:

<b>Abstract</b> .....	1
<b>Zusammenfassung</b> .....	3
<b>Einleitung</b> .....	5
1 Rolle von Kupfer in biologischen Systemen.....	5
2 Regulation der Kupfer-Homöostase in Bakterien.....	5
3 Kupfer-Homöostase in <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	6
3.1 Das Zweikomponentensystem CopSR .....	7
3.1.1 Die Sensorkinase CopS.....	8
3.2 Die Atmungskette in <i>C. glutamicum</i> .....	10
4 Ziele der Arbeit .....	11
<b>Material und Methoden</b> .....	12
1 Material .....	12
1.1 Bakterienstämme .....	12
1.2 Plasmide .....	12
1.3 Oligonukleotide .....	17
1.4 Medien.....	19
1.4.1 Nährmedien.....	19
1.4.2 Puffer und Stammlösungen.....	20
2 Methoden .....	21
2.1 Stammhaltung von Bakterienstämmen.....	21
2.2 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> .....	21
2.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	22
2.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen .....	23
2.5 Bestimmung der Glucosekonzentration mittels HPLC .....	23
2.6 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.7 Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	24
2.8 DNA-Techniken.....	24
2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA .....	24
2.8.2 Isolierung von RNA .....	25
2.8.3 Reinigung von PCR-Produkten.....	25
2.8.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
2.8.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	26
2.8.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	26

2.8.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	26
2.8.8	Restriktionsverdau.....	27
2.8.9	Ligation .....	27
2.8.10	DNA-Sequenzanalyse.....	27
2.8.11	Klonierung mittels In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit .....	28
2.8.12	Ortsgerichtete Mutagenese .....	28
2.8.13	Plasmidkonstruktion.....	29
2.8.13.1	Konstruktion von pET-Derivaten .....	29
2.8.13.2	Konstruktion von pEKEx2- und pVWEx2-Derivaten .....	30
2.8.13.3	Konstruktion von pK19 <i>mobsacB</i> -Deletionsplasmiden .....	31
2.8.14	Konstruktion der Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems .....	32
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.9.1	Zellaufschluss.....	32
2.9.2	Solubilisierung von Membranproteinen .....	33
2.9.3	Bestimmung von Proteinkonzentration .....	33
	Bradford-Methode: .....	33
	UV-Absorption: .....	33
2.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.9.5	Westernblot-Analyse .....	35
2.9.6	Ni-NTA-Affinitätschromatographie .....	35
2.9.7	Strep-Tactin-Chromatographie.....	36
2.9.8	TEV-Protease-Verdau .....	36
2.9.9	Größenausschlusschromatographie.....	37
2.9.10	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinlösungen.....	37
2.9.11	Proteinidentifizierung mittels MALDI-ToF-MS Analyse .....	38
2.9.12	Bestimmung der Proteinstabilität von CtaD <sub>St</sub> .....	39
2.10	DNA-Microarray-Technologie.....	39
2.10.1	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden .....	40
2.10.2	Prähybridisierung .....	40
2.10.3	Hybridisierung .....	41
2.10.4	Posthybridisierung.....	41
2.10.5	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	41
2.10.6	Normierung und statistische Analyse von DNA-Microarray-Daten .....	42
2.10.7	Archivierung von DNA-Microarray-Daten .....	43
2.11	Analyse von Cytochromspektren.....	43

2.12	Fluoreszenzmikroskopie .....	43
2.13	Röntgenstrukturanalyse der Sensorkinase CopS.....	44
2.13.1	Proteinkristallisation.....	44
	Microbatch: .....	44
	Evaporationsmethode: .....	45
	<i>Lipidic sponge phase</i> :.....	45
	Verwendung der Lipopeptid-Detergenzien:.....	46
2.13.2	Messung der Röntgenbeugungsmuster von Proteinkristallen.....	46
2.14	Festkörper-NMR mit rekonstituierter Sensorkinase-CopS.....	47
2.14.1	Rekonstitution von N <sub>GHM</sub> CopS <sub>206</sub> in <i>E. coli</i> -Liposomen .....	47
2.14.2	Bestimmung von DDM-Konzentration .....	48
2.14.3	Saccharose-Dichtegradient.....	49
2.14.4	Festkörper-NMR-Spektroskopie .....	49
	<b>Ergebnisse</b> .....	51
1.	Strukturelle Untersuchungen der Sensorkinase CopS.....	51
1.1	Kristallisation von CopS für Röntgenstrukturanalyse .....	51
1.1.1	Kristallisation von N <sub>GHM</sub> CopS .....	51
1.1.2	Kristallisation verschiedener CopS-Derivate .....	54
1.2	Festkörper-NMR mit der Sensorkinase CopS .....	57
1.2.1	Probenvorbereitung für Festkörper-NMR.....	57
1.2.2	Suche nach einem geeigneten C-terminal verkürzten CopS-Derivat .....	58
1.2.3	Überproduktion, Reinigung und TEV-Verdau von NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>206</sub> .....	59
1.2.4	Rekonstitution von N <sub>GHM</sub> CopS <sub>206</sub> für Festkörper-NMR .....	62
2.	Funktionelle Untersuchungen zu Kupfer-Mangel in <i>C. glutamicum</i> .....	65
2.2	Auswirkungen der Kupfer-limitierenden Bedingungen auf <i>C. glutamicum</i> WT .....	65
2.3	Charakterisierung von ausgewählten Genen aus dem Kupfer-Mangel-Stimulon von <i>C. glutamicum</i> .....	68
2.3.1	Wachstumsverhalten der Δcg2699-Deletionsmutante .....	71
2.3.2	Transkriptomvergleich Δcg2699-Deletionsmutante vs. WT.....	73
2.3.3	Cytochromspektren der Δcg2699-Deletionsmutante .....	74
2.3.4	Nachweis von CtaD <sub>st</sub> in ΔctaDΔcg2699/pJC1-CtaD <sub>st</sub> .....	75
2.3.5	Ko-Reinigungsexperimente mit CtaD <sub>st</sub> und QcrB <sub>st</sub> .....	77
2.3.6	Vorbereitungen für FRET zum Nachweis einer Interaktion zwischen CtaD und Cg2699 .....	79
2.3.7	Charakterisierung der ΔcopC-Deletionsmutante .....	80
	<b>Diskussion</b> .....	83

1.	Strukturelle Untersuchungen der Sensorkinase CopS.....	83
2.	Bedeutung von Kupfer-Mangel für <i>C. glutamicum</i> .....	86
2.1	Evidenzen für eine duale Funktion von Cg2699 beim Kupfer-Import und -Einbau.....	88
2.2	Beteiligung der Proteine CopC und PcuC an der Kupfer-Homöostase in <i>C. glutamicum</i> .....	92
2.3	Möglicher Mechanismus des Kupfer-Imports und der Kupfer-Insertion in die Cytochrom- <i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase .....	94
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	96
	<b>Anhang</b> .....	107
1.	Initiale Kristallisationsbedingungen für N <sub>GHM</sub> CopS.....	107
2.	Transkriptomvergleiche <i>C. glutamicum</i> WT unter Kupfer-Mangel vs. WT und $\Delta$ cg2699 vs. WT .....	107
3.	Wachstum der $\Delta$ cg2699-Mutante bei leichtem Kupfer-Überschuss.....	112
4.	Sequenzvergleiche.....	113

## Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
Δ	delta
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge oder Bakteriophage Lambda
φ	Projektionswinkel (°)
μ	Wachstumsrate oder mikro ( $10^{-6}$ )
Ω	Ohm
A	Ampere oder Adenin
Å	Angström ( $10^{-10}$ m)
aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AU	Absorption Unit(s)
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpare
bidest.	bidestilliert
C	Cytosin
c	centi ( $10^{-2}$ )
ca.	circa
Da	Dalton
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Farad
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
G	Guanin
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
k	kilo ( $10^3$ )
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
l	Liter
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar (mol/l) oder Mega ( $10^6$ )
max.	maximal(e)
min.	minimal(e)
min	Minuten
MCS	Multiple Cloning Site
MWCO	Molecular Weight Cut Off
n	nano ( $10^{-9}$ )
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optische Dichte
p	piko ( $10^{-12}$ )

Pa	Pascal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
ssNMR	solid-state NMR
t	Zeit (s)
T	Tesla oder Thymin
Tab.	Tabelle
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	Unit (1 Unit = 1 µmol/min)
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
vs.	<i>versus</i>
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalztes Wasser
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

### Drei- und Ein-Buchstabencode der Aminosäuren

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

## Abstract

Copper is an important trace element for many organisms, but toxic at elevated concentrations. This thesis covered three issues of copper homeostasis in *Corynebacterium glutamicum*, a Gram-positive soil bacterium serving as a model organism in microbial biotechnology. The first subject aimed at the structure determination of the sensor kinase CopS. CopS is a membrane-bound histidine kinase with two transmembrane helices and part of the two-component signal transduction system CopSR, which is required for sensing elevated copper concentrations and activating transcription of a set of genes involved in the copper stress response. It is assumed that CopS senses the extracellular copper concentration via a very short extracytoplasmic domain located between the two transmembrane helices. Two different approaches were pursued for CopS structure elucidation. On the one hand, the complete CopS protein was overproduced in *Escherichia coli*, purified and crystallized. However, the crystals showed inner asymmetry and therefore could not be used for X-ray structure determination. On the other hand, attempts were made to apply solid-state NMR for structure determination. As the complete CopS was too large for this approach, a series of 14 C-terminally shortened CopS derivatives were constructed and tested with respect to overproduction and purification. One of the variants turned out to be suitable for further analysis, termed N<sub>G<sub>HM</sub></sub>CopS<sub>206</sub>. The methods for overproduction, purification, and reconstitution into proteoliposomes of this derivative were carefully optimized to achieve the maximal protein yield. The solid-state NMR measurement of the resulting proteoliposomes showed that the mobility of the sample was too high and only the amino acids of the two transmembrane helices were detectable.

The second subject of this thesis dealt with the definition of the copper starvation stimulon of *C. glutamicum*. For this purpose, a transcriptome comparison was performed with wild-type cells cultivated under copper starvation and copper sufficiency. Of the 46 genes with a more than 2-fold altered mRNA level ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ) under copper starvation, 25 and 21 genes showed increased and decreased expression, respectively. The *cydABDC* genes encoding cytochrome *bd* oxidase and a functionally related ABC-type exporter showed the strongest increased mRNA levels, whereas the *ctaE-qcrAB* genes encoding subunits of the cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* supercomplex showed decreased mRNA levels. This indicated a switch from a copper-dependent to a copper-independent terminal oxidase.

Cytochrome *aa<sub>3</sub>* oxidase is currently the only known copper-dependent protein of *C. glutamicum* and contains two copper centres, Cu<sub>A</sub> in subunit II (CtaC) and Cu<sub>B</sub> in subunit I (CtaD). Bioinformatic analysis indicated that some of the genes with an elevated mRNA level under copper starvation might be involved in targeting copper ions to Cu<sub>A</sub> or Cu<sub>B</sub>. Two of these were studied in

more detail in the third part of this thesis. The Cg2699 protein is an integral membrane protein with 16 putative transmembrane helices. Based on its composition of an N-terminal CopD domain and a C-terminal CtaG domain, Cg2699 might be a bifunctional protein acting as copper importer and as assembly protein for the Cu<sub>A</sub> or Cu<sub>B</sub> centre. The properties of a  $\Delta$ cg2699 deletion mutant strongly supported this assumption: (i) its growth behaviour on BHI agar plates resembled that of a  $\Delta$ ctaD deletion mutant lacking subunit I of cytochrome *aa*<sub>3</sub> oxidase; (ii) its global gene expression under copper sufficiency was comparable to that of the wild type under copper starvation; (iii) it showed a higher resistance against elevated copper concentrations than the wild type; (iv) the assembly of cytochrome *aa*<sub>3</sub> oxidase and of the cytochrome *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub> supercomplex was disturbed, as shown by the failure to co-purify the corresponding subunits. Cg1881 is a periplasmic protein anchored to the membrane by a C-terminal transmembrane helix. It shows similarity to CopC, a blue copper protein that sequesters one copper ion per protein molecule. Like the  $\Delta$ cg2699 mutant, a  $\Delta$ copC mutant grew slowly on BHI agar plates, was more resistant towards elevated copper concentrations, and was disturbed in the assembly of the cytochrome *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub> supercomplex. In contrast to the  $\Delta$ cg2699 mutant, the  $\Delta$ copC mutant showed no growth defect in copper-sufficient glucose minimal medium. These characteristics support a role of CopC as a copper chaperone required for assembly of a functional cytochrome *aa*<sub>3</sub> oxidase, possibly by targeting copper to Cg2699 or to the periplasmic Cu<sub>A</sub> centre in subunit II.

## Zusammenfassung

Kupfer ist für viele Organismen ein wichtiges Spurenelement, jedoch wirkt es bei erhöhten Konzentrationen toxisch. In dieser Arbeit wurden drei Aspekte der Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*, einem Gram-positiven Bakterium, welches als Modelorganismus in der mikrobiellen Biotechnologie fungiert, untersucht. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Strukturaufklärung der Sensorkinase CopS erfolgen. CopS ist eine membrangebundene Histidinkinase mit zwei Transmembranhelices. Als Teil des Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems CopSR ist CopS für die Erkennung erhöhter Kupferkonzentrationen und die Transkriptionsaktivierung einer Reihe von Genen verantwortlich, die an der Kupfer-Stress-Antwort beteiligt sind. Es wird angenommen, dass CopS Kupfer-Ionen über eine sehr kurze extrazytoplasmatische Domäne detektiert, die zwischen den beiden Transmembranhelices liegt. Zwei unterschiedliche Ansätze wurden für die Strukturaufklärung von CopS verfolgt. Zum einen wurde das komplette CopS Protein in *Escherichia coli* überproduziert, aufgereinigt und kristallisiert. Die Kristalle zeigten jedoch eine innere Asymmetrie und konnten daher nicht für eine Röntgenstrukturanalyse verwendet werden. Zum anderen wurden Versuche unternommen, die Proteinstruktur mittels Festkörper-NMR aufzuklären. Da das vollständige CopS-Protein für diesen Ansatz zu groß war, wurde eine Reihe von 14 C-terminal verkürzten CopS-Derivaten konstruiert und bezüglich der Möglichkeit zur Überproduktion und Aufreinigung getestet. Es stellte sich heraus, dass ein Konstrukt, genannt N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub>, für weitere Analysen geeignet war. Die Methoden für die Überproduktion, Aufreinigung und Rekonstitution in Proteoliposomen wurden für dieses Derivat sorgfältig optimiert, um eine maximale Proteinausbeute zu erlangen. Die Festkörper-NMR-Messungen der resultierenden Proteoliposomen zeigten, dass die Mobilität der Probe zu hoch war und nur die Aminosäuren der beiden Transmembranhelices detektiert werden konnten.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Bestimmung des Kupfer-Mangel-Stimulons in *C. glutamicum*. Zu diesem Zweck wurde ein Transkriptomvergleich zwischen dem *C. glutamicum* Wildtyp unter Kupfer-Mangel-Bedingungen und dem Wildtyp bei regulären Kupferkonzentrationen durchgeführt. Insgesamt wiesen 46 Gene einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Spiegel ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) bei Kupfer-Mangel auf, davon zeigten 25 Gene eine erhöhte und 21 Gene eine verringerte Expression. Die Gene *cydABDC*, die für die Cytochrom-*bd*-Oxidase und einen funktionell dazugehörigen ABC-Typ-Exporter kodieren, zeigten die am stärksten erhöhten mRNA-Spiegel, wohingegen die *ctaE-qcrAB*-Gene, kodierend für Untereinheiten des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes, verringerte mRNA-Spiegel zeigten. Dies deutet auf einen Wechsel von der Kupfer-abhängigen zur Kupfer-unabhängigen terminalen Oxidase.

Die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase ist derzeit das einzige bekannte Kupfer-abhängige Protein in *C. glutamicum*. Es enthält zwei Kupfer-Zentren, Cu<sub>A</sub> in der Untereinheit II (CtaC) und Cu<sub>B</sub> in der Untereinheit I (CtaD). Bioinformatische Analysen zeigten, dass manche Gene mit einem veränderten mRNA-Spiegel unter Kupfer-Mangel für Proteine kodieren, die an der Bereitstellung von Kupfer-Ionen zu Cu<sub>A</sub> oder Cu<sub>B</sub> beteiligt sein könnten. Zwei dieser Gene wurden im dritten Teil der Arbeit näher untersucht. Das Cg2699-Protein ist ein integrales Membranprotein mit 16 Transmembranhelices. Aufgrund seiner Zusammensetzung aus einer N-terminalen CopD-Domäne und einer C-terminalen CtaG-Domäne könnte Cg2699 eine doppelte Funktion als Kupfer-Importer und Assemblierungsprotein für das Cu<sub>A</sub>- oder Cu<sub>B</sub>-Zentrum ausüben. Die Eigenschaften einer Δcg2699-Deletionsmutante unterstützten diese Annahme stark: (i) das Wachstumsverhalten auf BHI-Agarplatten ähnelte dem der ΔctaD-Deletionsmutante, der die Untereinheit I der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase fehlt; (ii) die globale Genexpression unter regulären Kupferkonzentrationen war vergleichbar mit der des Wildtyps bei Kupfer-Mangel; (iii) die Δcg2699-Mutante zeigte eine bessere Resistenz gegenüber erhöhten Kupferkonzentrationen als der Wildtyp; (iv) die Bildung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase und des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes war gestört, was anhand der erfolglosen Ko-Reinigungsversuche entsprechender Untereinheiten gezeigt werden konnte. Cg1881 ist ein periplasmatisches Protein, das in der Membran mit einer C-terminalen Transmembranhelix verankert ist. Das Protein zeigt Ähnlichkeiten zu CopC, einem blauen Kupferprotein, welches pro Proteinmolekül ein Kupfer-Ion bindet. Ähnlich wie die Δcg2699-Mutante wuchs die ΔcopC-Deletionsmutante langsam auf BHI-Agarplatten, war resistenter gegenüber erhöhten Kupferkonzentrationen und wies eine fehlerhafte Assemblierung des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes auf. Im Gegensatz zur Δcg2699-Mutante zeigte die ΔcopC-Mutante keinen Wachstumsdefekt in Glucose-Minimalmedium mit regulärer Kupferkonzentration. Diese Eigenschaften unterstützen die Rolle von CopC als Kupfer-Chaperon, welches für die Assemblierung eines stabilen Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes benötigt wird, indem es möglicherweise Kupfer-Ionen zu Cg2699 oder zum periplasmatischen Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Untereinheit II transportiert.

## Einleitung

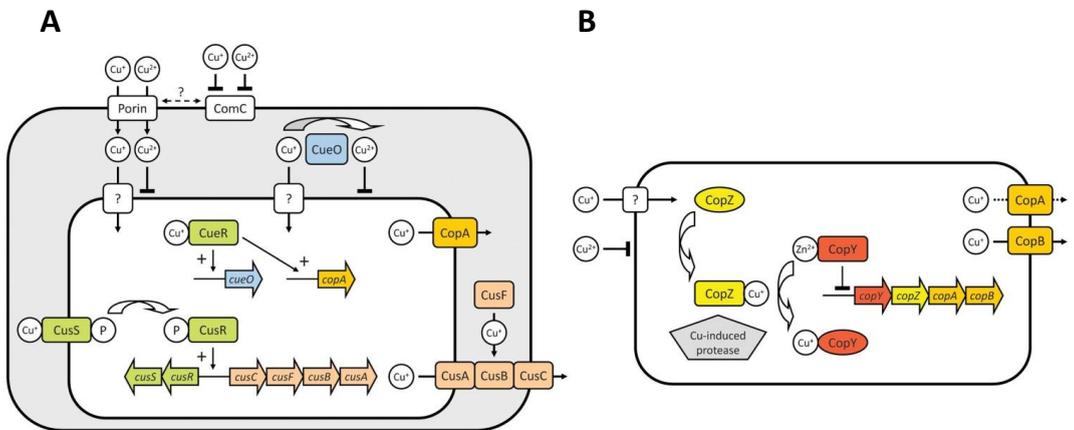
### 1 Rolle von Kupfer in biologischen Systemen

Die Bedeutung von Kupfer für Zellen ist zweiseitig. Einerseits ist Kupfer wegen der Möglichkeit, zwischen den Oxidationsstufen  $\text{Cu}^+$  und  $\text{Cu}^{2+}$  zu wechseln, ein essentieller Kofaktor für eine Reihe von Enzymen, wie Cytochrom-Oxidasen, Superoxid-Dismutasen, Monooxygenasen und Dioxygenasen (Karlin, 1993, Solioz *et al.*, 2010). Andererseits kann Kupfer durch Katalyse einer Fenton-ähnlichen Reaktion für Zellen toxisch sein. Bei dieser Reaktion entstehen hochreaktive Hydroxyl-Radikale, die Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden verursachen (Yoshida *et al.*, 1993, Magnani and Solioz, 2007, Imlay, 2003). Für *Escherichia coli* wurde darüber hinaus gezeigt, dass Kupfer die Dehydratasen mit einem Eisen-Schwefel-Zentrum inaktivieren kann, wobei Eisen aus dem Fe-S-Zentrum verdrängt wird (Macomber and Imlay, 2009). Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Kupfer-Homöostase in allen Organismen sehr streng reguliert. Dabei spielen Proteine für Kupfer-Erkennung, -Transport und -Einbau eine sehr wichtige Rolle (Rensing and McDevitt, 2013).

### 2 Regulation der Kupfer-Homöostase in Bakterien

In Bezug auf die Regulation der Kupfer-Homöostase sind *E. coli* und *Enterococcus hirae* die am besten untersuchten Modellorganismen unter den Gram-negativen bzw. Gram-positiven Bakterien. In *E. coli* wird  $\text{Cu}^+$  im Periplasma mit Hilfe der Multikupfer-Oxidase CueO zu weniger schädlichem  $\text{Cu}^{2+}$  oxidiert. Gelangt  $\text{Cu}^+$  in die Zelle, wird es von dem Transkriptionsregulator CueR erkannt, was zu einer Überexpression des Gens für die Kupfer-exportierende ATPase CopA führt. Kupfer wird aber nicht nur intrazellulär detektiert, sondern auch im periplasmatischen Raum durch die Sensorkinase CusS des Zweikomponentensystems CusRS. Der korrespondierende Antwortregulator CusR aktiviert daraufhin die Transkription der Gene *cusCFBA*, welche für einen Kupfer-exportierenden Protein-Komplex kodieren (Rensing and Grass, 2003) (Abb. 1A). Manche *E. coli*-Stämme besitzen außerdem ein episomal vorliegendes Gencluster *pcoABCDRSE*. Die Regulation dieser Gene erfolgt über ein weiteres Zweikomponentensystem PcoRS, welches ebenfalls auf dem Episom kodiert ist. Die Expression dieser Gene erlaubt *E. coli* unter extrem hohen Kupferkonzentrationen zu überleben (Brown *et al.*, 1995, Mills *et al.*, 1993). Im Gram-positiven Bakterium *E. hirae* werden Kupfer-Ionen, sobald sie in die Zelle gelangen, vom Chaperon CopZ gebunden und zum Transkriptionsregulator CopY transportiert. In Anwesenheit von Kupfer-Ionen werden die von CopY gebundenen Zink-Ionen durch Kupfer verdrängt. Dadurch wird die Repression des *copYZAB*-Operons aufgehoben, die Kupfer-exportierenden ATPasen CopA und CopB werden

verstärkt gebildet und sorgen für die Entfernung der überschüssigen Kupfer-Ionen aus der Zelle (Solioz and Stoyanov, 2003, Solioz *et al.*, 2010) (Abb. 1B).



**Abbildung 1:** Kupfer-Homöostase in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien am Beispiel von *E. coli* (A) und *E. hirae* (B). Genaue Beschreibung s. Text. Quelle: Rademacher and Masepohl, 2012.

In beiden Modellorganismen sind keine Kupfer-importierenden Mechanismen bekannt. Im Gegensatz dazu wurde in dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas syringae* das Gencluster *copABCD* beschrieben, welches die Gene *copC* und *copD* enthält, deren Genprodukte für den Kupfer-Import verantwortlich sind (Cha and Cooksey, 1993, Puig *et al.*, 2002). Im Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* sind die beiden Proteine CopC und CopD durch die gleichnamigen Domänen in dem YcnJ-Protein repräsentiert und sind ebenfalls für den Import der Kupfer-Ionen verantwortlich (Chillappagari *et al.*, 2009).

### 3 Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*

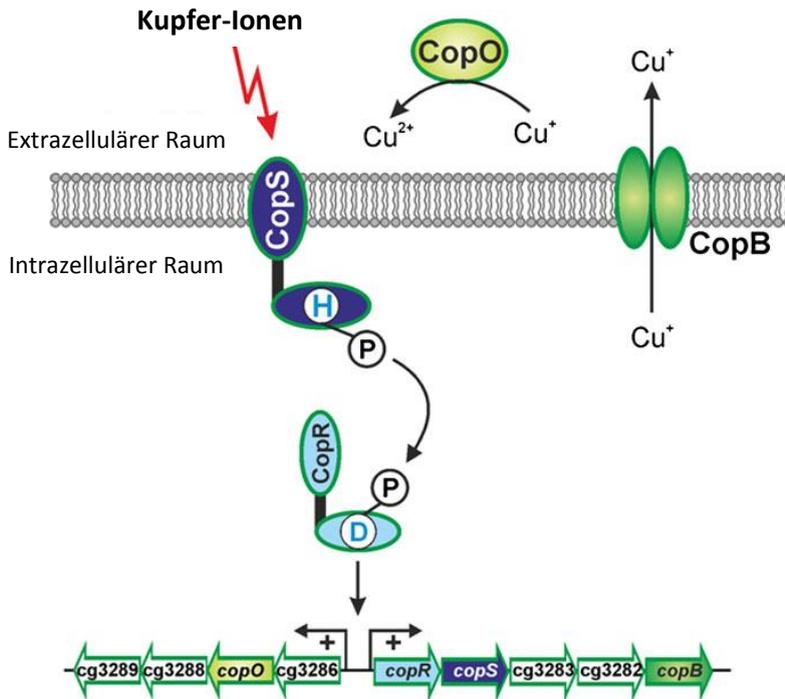
*Corynebacterium glutamicum* ist ein Gram-positives Bodenbakterium, das bei der Suche nach Glutamat-sekretierenden Bakterien gefunden wurde (Kinoshita *et al.*, 1957). *C. glutamicum* wird für die Produktion von Aminosäuren industriell eingesetzt (Eggeling and Sahn, 2001, Eggeling and Bott, 2005). Als Bodenbakterium ist *C. glutamicum* unter anderem auch Kupfer-Stress ausgesetzt, einerseits in Form von erhöhten, toxischen Kupferkonzentrationen, andererseits in Form von Kupfer-Mangel. Eine *in silico*-Analyse des Kupfer-Proteoms in *C. glutamicum* hat ergeben, dass es zwei Kupfer-exportierende ATPasen CopB und CtpA, zwei Multikupfer-Oxidasen CopO und Cg1080 und einige Kupfer-Chaperone gibt (Schuplezow, 2009, Schelder, 2011). Die Regulation der Stress-Antwort gegenüber erhöhten Kupferkonzentrationen erfolgt über das Zweikomponentensystem CopSR und dem intrazellulären Regulator CsoR (Schelder, 2011, Teramoto *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurden

bei Transkriptomanalysen Gene ermittelt, welche bei Kupfer-Mangel bzw. Kupfer-Überschuss einen veränderten mRNA-Spiegel zeigten. Diese Gene könnten auch direkt oder indirekt an der Kupfer-Homöostase in *C. glutamicum* beteiligt sein (Schuplezow, 2009, Schelder *et al.*, 2011).

### 3.1 Das Zweikomponentensystem CopSR

Zweikomponentensysteme bestehen in der Regel aus einer membrangebundenen Sensorkinase, die für Signalerkennung und -weiterleitung verantwortlich ist, und einem Antwortregulator, der die Expression seiner Zielgene aktiviert oder reprimiert. Eine klassische Sensorkinase ist modular aufgebaut und besteht aus einer variablen Sensor-Domäne und einer konservierten katalytischen Domäne oder Kinase-Domäne (Gao and Stock, 2009, Szurmant *et al.*, 2007). Die Sensor-Domäne ist oft im extrazellulären oder periplasmatischen Raum lokalisiert und wird von zwei Transmembranhelices flankiert. Dadurch kann sie Umgebungssignale wahrnehmen, indem z. B. Liganden an das Protein gebunden werden. Zwischen der katalytischen Domäne einer Sensorkinase und der zweiten Transmembranhelix befindet sich oft eine HAMP-, PAS- oder GAF-Domäne, die an der Signalweiterleitung beteiligt ist. Die katalytische Domäne besteht aus der HisKA-Domäne, die an einem konservierten Histidin-Rest phosphoryliert wird und bei einer Dimerisierung des Proteins eine wichtige Rolle spielt und der HATPase\_c-Domäne, die das für die Autophosphorylierung benötigte ATP bindet (Gao and Stock, 2009). Der klassische Antwortregulator besteht aus einer variablen Effektor-Domäne und einer konservierten Empfänger-Domäne. Der Phosphat-Rest der phosphorylierten Sensorkinase wird auf einen konservierten Aspartat-Rest der Empfänger-Domäne des Antwortregulators übertragen. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Antwortregulators, der dann in der Regel an seine Zielpromotoren binden und die Expression seiner Zielgene beeinflussen kann (Stock *et al.*, 2000, Gao and Stock, 2009).

Das Zweikomponentensystem CopSR aus *C. glutamicum* entspricht einem klassischen Zweikomponentensystem und besteht aus der membrangebundenen Sensorkinase CopS und dem cytosolischen Antwortregulator CopR. Als Signal werden erhöhte Kupferkonzentrationen in der Umgebung der Sensorkinase CopS erkannt. Daraufhin erfolgt eine Autophosphorylierung von CopS gefolgt von der Übertragung des Phosphat-Restes vom Histidin-Rest an Position 153 auf den Aspartat-Rest D63 des Antwortregulators CopR. Dies führt zu einer Aktivierung der Genexpression des *cop*-Operons (Abb. 2). Als Folge bildet die Zelle Proteine, die einen Schutz vor hohen Kupferkonzentrationen bieten (Schelder *et al.*, 2011, Bott and Brocker, 2012).



**Abbildung 2:** Das Zweikomponentensystem CopSR aus *C. glutamicum*. Die Signalkaskade, die bei der postulierten Bindung von Kupfer-Ionen ausgelöst wird, führt zur Phosphatübertragung von der Sensorkinase CopS auf den Antwortregulator CopR. Daraufhin wird die Expression der Gene *cg3286*, *copO*, *cg3288*, *cg3289*, *copR*, *copS*, *cg3283*, *cg3282* und *copB* aktiviert. Die Multikupfer-Oxidase CopO und die Kupfer-exportierende ATPase CopB sorgen für die Oxidation von  $\text{Cu}^+$  zu weniger toxischem  $\text{Cu}^{2+}$  im extrazellulären Raum bzw. für den Export der Kupfer-Ionen aus der Zelle. Quelle: Bott and Brocker, 2012.

### 3.1.1 Die Sensorkinase CopS

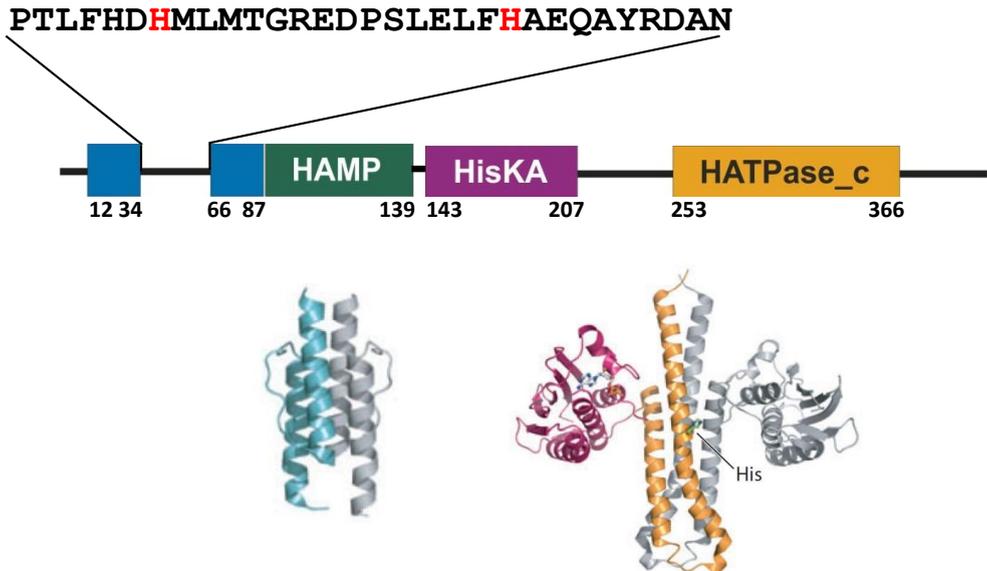
Eine *in silico* Untersuchung der Sensorkinase CopS hat gezeigt, dass CopS, wie ein Großteil der Sensorkinasen, aus zwei Transmembranhelices, einer HAMP-, einer HisKA- und einer HATPase\_c-Domäne besteht (Kocan *et al.*, 2006). Die postulierte Sensor-Domäne von CopS umfasst ca. 31 Aminosäurereste, die zwischen den beiden Transmembranhelices außerhalb der Cytoplasmamembran lokalisiert sind und vermutlich für die Erkennung von Kupfer-Ionen verantwortlich sind. Es wurden zwei Histidin-Reste H41 und H56 identifiziert, die an der Kupfer-Bindung beteiligt sein könnten (Abb. 3). Die Mutationen CopS-H41A und CopS-H56A führten zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Kupfer in einem Agar-Diffusionstest und verursachten eine starke Reduzierung der relativen Aktivität des Antwortregulators CopR (Schelder, 2011). Für die Sensorkinase CinS aus *Pseudomonas putida* wurde gezeigt, dass zwei Histidin-Reste H37 und H147 im periplasmatischen Bereich zwischen zwei Transmembranhelices eine Kupfer-Bindestelle bilden

könnten (Quaranta *et al.*, 2009). Die Sensor-Domänen der Kupfer-erkennenden Sensorkinasen aus anderen Organismen sind mit ca. 130 Aminosäuren (126 aa bei CinS aus *P. putida*, 126 bei CopS aus *Synechocystis* sp. und 151 aa bei CusS aus *E. coli*) deutlich länger als der extrazytoplasmatische Bereich von CopS aus *C. glutamicum* mit 31 Aminosäuren. Außer den beiden Histidin-Resten H41 und H56, die sich wie die konservierten Histidin-Reste H37 und H147 bei CinS aus *P. putida* genau 7 Aminosäuren nach der ersten Transmembranhelix und 10 Aminosäuren vor der zweiten Transmembranhelix befinden, gibt es keine Übereinstimmungen zu den Sensor-Domänen anderer bekannter Kupfer-detektierender Sensorkinasen. Zwischen der Sensor-Domäne und der Kinase-Domäne befindet sich bei CopS eine HAMP-Domäne, die an der Signaltransduktion beteiligt sein soll. Die HAMP-Domäne besteht aus zwei parallel zueinander positionierten  $\alpha$ -Helices, die durch einen langen Konnektor miteinander verbunden sind (Hulko *et al.*, 2006). Die Kinase-Domäne katalysiert die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe von ATP, das von der HATPase<sub>c</sub>-Domäne gebunden wird, auf den konservierten Histidin-Rest der HisKA-Domäne (Marina *et al.*, 2005, Casino *et al.*, 2009). Die Domänenzusammensetzung von CopS sowie die gelösten Strukturen der HAMP-Domäne des Af1503-Proteins aus *Archaeoglobus fulgidus* (Hulko *et al.*, 2006) und des cytosolischen Teils der Sensorkinase HK853 aus *Thermotoga maritima* (Marina *et al.*, 2005) sind in Abbildung 3 dargestellt.

Der Mechanismus der Autophosphorylierung von Sensorkinasen und der Phosphatübertragung auf die korrespondierenden Antwortregulatoren ist dank der strukturellen Studien an der katalytischen Domäne der Sensorkinase HK853 aus *T. maritima* relativ gut untersucht (Casino *et al.*, 2009, Casino *et al.*, 2010). Die Mechanismen der Signalerkennung unterscheiden sich je nach Signal, welches von der Sensorkinase detektiert wird. Verschiedene Studien sind publiziert, die auf den gelösten Strukturen periplasmatischer Sensordomänen mit und ohne den jeweiligen Effektor basieren, z. B. von CitA aus *Klebsiella pneumoniae* (Sevvana *et al.*, 2008, Reinelt *et al.*, 2003), DcuS aus *E. coli* (Pappalardo *et al.*, 2003) oder PhoQ aus *Salmonella typhimurium* (Cho *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung der Signalweiterleitung über die Membran fehlen die Strukturen des betreffenden Proteinbereichs oder einer kompletten Sensorkinase und der Mechanismus der Signalübertragung von der Sensordomäne zur Kinase-Domäne ist bisher unbekannt (Szurmant *et al.*, 2007, Gao and Stock, 2009). Hierzu wurden jedoch mehrere Mechanismen vorgeschlagen wie (i) ein Kolbenhub-ähnliches Modell der Signalübertragung über die Membran (Ottemann *et al.*, 1999), (ii) eine Rotationsbewegung der beiden Transmembranhelices und der HAMP-Domänen (Stewart, 2010, Albanesi *et al.*, 2009, Hulko *et al.*, 2006, Ferris *et al.*, 2011) und (iii) eine Scheren-ähnliche Bewegung der Transmembranhelices, die durch die Signalerkennung aktiviert wird (Lowe *et al.*, 2012).

Die strukturelle Untersuchung der Sensorkinase CopS mittels Röntgenstrukturanalyse und Festkörper-NMR könnte zum Verständnis des Signalweiterleitungsmechanismus beitragen, indem die Struktur der kompletten Sensorkinase oder des membrangebundenen Proteinteils rekonstituiert in

Proteoliposomen gelöst wird. Die vorangegangenen Studien an der Sensorkinase CopS haben eine Reihe von vorteilhaften Eigenschaften des Proteins für strukturelle Untersuchungen gezeigt: (i) das vollständige Protein lässt sich gut heterolog in *E. coli* überproduzieren, (ii) nach der Aufreinigung kann ein hoher Reinheitsgrad und eine hohe Homogenität der Proteinlösung erreicht werden und (iii) das vollständige Protein kann erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert werden (Schelder, 2008, Schuplezow, 2009).

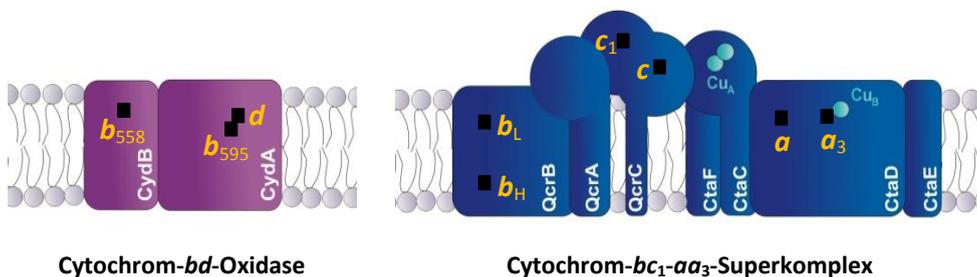


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Sensorkinase CopS (oben) und Struktur-Beispiele der HAMP-Domäne (unten links, aus Hulko *et al.*, 2006) sowie der Kinase-Domäne aus HisKA- und HATPase\_c-Domäne (unten rechts, aus Marina *et al.*, 2005). Die Histidin-Reste H41 und H56 im extrazellulären Bereich zwischen den Transmembranhelices sind rot hervorgehoben. Die Lage der einzelnen Domänen ist mit den Aminosäurepositionen bzgl. des N-Terminus angegeben (Bott and Brocker, 2012). Die Lage der Transmembranhelices wurde mit Hilfe der Software Protter ermittelt (<http://wlab.ethz.ch/protter>).

### 3.2 Die Atmungskette in *C. glutamicum*

In der verzweigten Atmungskette von *C. glutamicum* werden die Elektronen von den Dehydrogenasen auf Menachinon und entweder über den Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex oder über die Cytochrom-*bd*-Oxidase weiter auf Sauerstoff übertragen. Die Cytochrom-*bd*-Oxidase wird aus den beiden Untereinheiten CydA und CydB gebildet, der Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplex besteht aus den Untereinheiten QcrB, QcrA und QcrC (Cytochrom-*bc<sub>1</sub>*-Komplex) und CtaF, CtaC, CtaD und CtaE (Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase) (Abb. 4). Die beiden terminalen Oxidasen unterscheiden sich in der Effizienz der Protonentranslokation, der Sauerstoffaffinität und der Abhängigkeit von Kupfer-10

lonen (Bott and Niebisch, 2003). Während die Cytochrom-*bd*-Oxidase weniger effizient als der Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplex ist, besitzt sie eine höhere Affinität zu Sauerstoff und ist damit vorteilhaft unter mikroaeroben Bedingungen (Kabus *et al.*, 2007). Der Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex enthält ein ungewöhnliches Dihäm-Cytochrom *c*<sub>1</sub>, wobei die zweite Hämgruppe von QcrC Elektronen vom *bc*<sub>1</sub>-Komplex direkt auf das Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Untereinheit II der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase (CtaC) überträgt (Niebisch and Bott, 2001, Niebisch and Bott, 2003). Vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Untereinheit II, das aus zwei Kupfer-Ionen besteht, werden Elektronen über das Häm *a* zum Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Untereinheit I (CtaD) weitergeleitet. Im Cu<sub>B</sub>-Zentrum bildet ein Kupfer-Ion zusammen mit Häm *a*<sub>3</sub> das katalytische Zentrum, in dem Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Bott and Niebisch, 2003) (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Die terminalen Oxidasen der Atmungskette von *C. glutamicum*, bestehend aus der Cytochrom-*bd*-Oxidase (links) und dem Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplex (rechts). Die Untereinheiten sind entsprechend beschriftet, die Häme sind mit schwarzen Quadraten dargestellt und entsprechend beschriftet, die Kupfer-Ionen im Cu<sub>A</sub>- und Cu<sub>B</sub>-Zentrum sind als türkisfarbene Kreise gekennzeichnet. Quelle: Bott and Niebisch, 2003.

#### 4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Einblicke in die 3D-Struktur und die Dynamik der Signalübertragung der Sensorkinase CopS gewonnen werden. Dazu sollten das vollständige CopS-Protein sowie ausgewählte Derivate kristallisiert und einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden. Um CopS in einer Membrenumgebung untersuchen zu können, sollte das Protein auch mittels Festkörper-NMR analysiert werden. Da die Proteingröße bei dieser Methode eine wichtige Rolle spielt, sollte zunächst ein geeignetes verkürztes CopS-Derivat identifiziert werden, welches erfolgreich in *E. coli*-Proteoliposomen rekonstituiert werden kann. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die transkriptionelle Antwort von *C. glutamicum* auf Kupfer-limitierende Bedingungen untersucht werden. Damit sollten auch Proteine identifiziert werden, die an der Kupfer-Versorgung der Zelle generell und speziell der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase beteiligt sein könnten. Die potentiellen Kandidaten sollten anhand der Eigenschaften von Mutanten analysiert werden, in denen die entsprechenden Gene deletiert wurden.

## Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Bakterienstämme

**Tabelle 1:** Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Relevante Charakteristika	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Wildtyp-Stamm, Biotin-auxotroph	Abe <i>et al.</i> , 1967
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ ctaD	Derivat von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032, in-frame-Deletion des ctaD-Gens	Niebisch and Bott, 2001
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699	Derivat von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032, in-frame-Deletion der ctaD- und cg2699-Gene	Diese Arbeit
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ cg2699	Derivat von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032, in-frame-Deletion des cg2699-Gens	Diese Arbeit
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ copC	Derivat von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032, in-frame-Deletion des copC-Gens (cg1884)	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ) <i>deoR thi-1 phoA supE44 <math>\lambda</math> gyrA96 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^-$ , $m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> (DE3); Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen $\lambda$ DE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors trägt	Studier and Moffat, 1986

#### 1.2 Plasmide

**Tabelle 2:** Die in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide. Schnittstellen für die TEV-Protease sind unterstrichen, Thrombin-Schnittstellen sind kursiv dargestellt.

Plasmid	Relevante Charakteristika	Referenz
pET28b	Kan <sup>R</sup> ; P <sub>T7</sub> , <i>lacI</i> , Vektor zur Überproduktion von Genen in <i>E. coli</i> , der das Anfügen eines abspltbaren N-terminalen Tags aus sechs Histidin-Resten ermöglicht	Novagen

pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-Derivat zur heterologen Überproduktion der Sensorkinase CopS aus <i>C. glutamicum</i> , die am N-Terminus 31 zusätzliche Aminosäure-Reste enthält (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTENLYFQGHM)	Schuplezow, 2009
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-H153A	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion der Sensorkinase CopS aus <i>C. glutamicum</i> , die einen Austausch des His153 gegen Ala trägt	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-H153E	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion der Sensorkinase CopS aus <i>C. glutamicum</i> , die einen Austausch des His153 gegen Glu trägt	Diese Arbeit
pET28b-CopS-TEV <sub>88</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-Derivat zur heterologen Überproduktion der Sensorkinase CopS aus <i>C. glutamicum</i> , mit einer eingeführten Schnittstelle für eine TEV-Protease nach der 88. aa und einem Hexahistidin-Tag am C-Terminus	Diese Arbeit
pET28b-CopS-TEV <sub>142</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-Derivat zur heterologen Überproduktion der Sensorkinase CopS aus <i>C. glutamicum</i> , mit einer eingeführten Schnittstelle für eine TEV-Protease nach der 142. aa und einem Hexahistidin-Tag am C-Terminus	Diese Arbeit
pET28b-CopS-TEV <sub>210</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion der Sensorkinase CopS aus <i>C. glutamicum</i> , mit einer eingeführten Schnittstelle für eine TEV-Protease nach der 210. aa und einem Hexahistidin-Tag am C-Terminus	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>90</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-89 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>95</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-94 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit

pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>106</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-105 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>110</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-109 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>119</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-118 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>154</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-153 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>159</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-158 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>175</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-174 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>188</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-187) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>206</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-205 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit

pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS <sub>210</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pET28b-NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des C-terminal verkürzten Sensorkinasederivats NHis <sub>6</sub> -TEV-CopS (aa: 1-209 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pET-TEV1	Kan <sup>R</sup> ; pET-Derivat, Vektor zur Überproduktion von Genen in <i>E. coli</i> , der das Anfügen eines mittels TEV-Protease abspaltbaren N-terminalen Decahistidin-Tags ermöglicht	Bussmann <i>et al.</i> , 2010
pET-TEV-H <sub>3</sub> -CopS	Kan <sup>R</sup> ; pET-TEV1-Derivat zur heterologen Überproduktion des cytosolischen Teils der Sensorkinase CopS (aa: 89-399 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i> ; enthält am N-Terminus zusätzliche 29 Aminosäuren (MGSSHHHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGH)	Diese Arbeit
pET-TEV-H <sub>3</sub> -CopS-H153A	Kan <sup>R</sup> ; pET-TEV-H <sub>3</sub> -CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des N-terminal verkürzten Sensorkinasederivats H <sub>3</sub> -CopS (aa: 89-399 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i> , die einen Austausch des His153 gegen Ala trägt	Diese Arbeit
pET-TEV-H <sub>3</sub> -CopS-H153E	Kan <sup>R</sup> ; pET-TEV-H <sub>3</sub> -CopS-Derivat zur heterologen Überproduktion des N-terminal verkürzten Sensorkinasederivats H <sub>3</sub> -CopS (aa: 89-399 bzgl. der nativen CopS-Sequenz) aus <i>C. glutamicum</i> , die einen Austausch des His153 gegen Glu trägt	Diese Arbeit
pET-NHis <sub>10</sub> -TEV-CopR	Kan <sup>R</sup> ; pET-TEV1-Derivat zur heterologen Überproduktion des Antwortregulators CopR aus <i>C. glutamicum</i> der am N-Terminus zusätzliche 29 Aminosäuren enthält (MGSSHHHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGH)	Schelder, unveröffentlicht
pK19mobsacB	Kan <sup>R</sup> ; mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK19mobsacB-Δcg2699	Kan <sup>R</sup> ; pK19mobsacB-Derivat mit einem 1178 bp overlap-extension PCR-Fragment (PstI/EcoRI), das die flankierenden Bereiche des Gens cg2699 umfasst	Diese Arbeit
pK19mobsacB-ΔcopC	Kan <sup>R</sup> ; pK19mobsacB-Derivat mit einem 914 bp overlap-extension PCR-Fragment (HindIII/EcoRI), das die flankierenden Bereiche des Gens copC (cg1884) umfasst	Diese Arbeit

pJC1	Kan <sup>R</sup> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pJC1-CtaD <sub>St</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pJC1-Derivat zur Expression von Strep-getagtem CtaD aus <i>C. glutamicum</i> , das am C-Terminus 10 zusätzliche Aminosäuren enthält (AAWSHPQFEK), die <i>ctaD</i> -Expression steht unter der Kontrolle des nativen Promotors	Niebisch and Bott, 2003
pJC1-QcrB <sub>St</sub>	Kan <sup>R</sup> ; pJC1-Derivat zur Expression von Strep-getagtem QcrB aus <i>C. glutamicum</i> , das am C-Terminus 10 zusätzliche Aminosäuren enthält (AAWSHPQFEK), enthält die <i>ctaEqcrCAB</i> -Gene, die Expression steht unter der Kontrolle des nativen Promotors	Niebisch and Bott, 2003
pEKEx2	Kan <sup>R</sup> ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEx2-cg2699	Kan <sup>R</sup> ; pEKEx2-Derivat, enthält ein 2166 bp Fragment mit dem <i>C. glutamicum</i> cg2699-Gen, der RBS (AAGGA) und dem Linker (GGGGC) vor dem Startcodon	Diese Arbeit
pEKEx2-cg2699-eCFP	Kan <sup>R</sup> , pEKEx2-cg2699-Derivat, enthält ein 686 bp Fragment mit dem <i>eCFP</i> -Gen nach dem cg2699-Gen ohne Stoppcodon. Zwischen den beiden Genen befindet sich ein Linker aus 18 bp, welche für die Aminosäuren EFDpGR kodieren	Diese Arbeit
pVWEx2	Tet <sup>R</sup> , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor mit IPTG-induzierbarem <i>tac</i> -Promotor ( $P_{tac}$ , <i>lacI<sup>R</sup></i> , pHM1519 <i>oriV<sub>C.g.</sub></i> , pUC18 <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> )	Wendisch <i>et al.</i> , 1997
pVWEx2-CtaD <sub>NP</sub> -mCitrine	Tet <sup>R</sup> , pVWEx2-Derivat, enthält ein 1931 bp Fragment mit dem <i>ctaD</i> -Gen aus <i>C. glutamicum</i> inklusive der nativen Promotor-Sequenz ( <sub>NP</sub> ) und ein 720 bp Fragment mit dem <i>mCitrine</i> -Gen nach dem <i>ctaD</i> -Gen ohne Stoppcodon. Zwischen den beiden Genen befindet sich ein Linker aus 15 bp, die für die Aminosäuren EGDih kodieren	Diese Arbeit

---

### 1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 3:** Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die Start- und Stoppcodons fettgedruckt gekennzeichnet. Komplementäre Sequenzen der Overlap-extension PCR-Nukleotide und die In-Fusion-Sequenzen sind kursiv dargestellt. Triplets zum Austausch bei der ortsgerichteten Mutagenese sind kleingeschrieben. Die Restriktionsendonukleasen sind in Klammern genannt.

Name	5'-3' Nukleotidsequenz (5' → 3') und Eigenschaften
<b>DNA-Sequenzierung</b>	
M13-for	CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC
M13-rev	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
pET-Promotor	CGAAATTAATACGACTCACTATAGG
pET-Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTG
pEKEx2-for	GATATGACCATGATTACGCCAAGC
pEKEx2-rev	CGGCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC
pVWEx2-for	CAAGGCGCACTCCCGTTCTGG
pVWEx2-rev	GCTACTGCCGCCAGGCAAATTC
<b>Konstruktion und Überprüfung der Δcg2699-Deletionsmutante</b>	
Δcg2699-1-fw	TATA <u>CTGCAG</u> CAATCCATAAGGTAGAGGCTATATG (PstI)
Δcg2699-2-rv	<i>CCCATCCACTAAACTTAAGTAGAGAAGAACTCCACCAGAACCC</i>
Δcg2699-3-fw	<i>TACTTAAGTTTAGTGGATGGGCTACCAGGAAACCTTCGAGCCC</i>
Δcg2699-4-rv	TATAG <u>GAATT</u> CTGTAGTGGTTCATGTCAATGCCGA (EcoRI)
Δcg2699-out-fw	GGAGTTTCAGGATGGAGCTCGC
Δcg2699-out-rv	CTGAACCTGCTCCACACCCAG
<b>Konstruktion und Überprüfung der ΔcopC-Deletionsmutante</b>	
Δcg1884-1-fw	TATA <u>AAGCTT</u> GATCCACCACAAACCAGGCTGG (HindIII)
Δcg1884-2-rv	<i>CCCATCCACTAAACTTAAGTATTTTAGATTCTTCTCTGAAGCCACAT</i>
Δcg1884-3-fw	<i>TACTTAAGTTTAGTGGATGGGGCAAAGAATCGTAACCAGAAATAAG</i>
Δcg1884-4-rv	TATAG <u>GAATTC</u> CTCGATTGGGTTTCGCAAGCCC (EcoRI)
Δcg1884-out-fw	AGGTCATTCAGGCGGCTGG
Δcg1884-out-rv	ATGTCGCTCCTATATATAGTGG
<b>Konstruktion von pET-CopS-Derivaten</b>	
H153A-s	CTCTGATCTGGCCGCCGAAATGGGCACCCC
H153A-as	GGGGTGCCCATTTTCGGCGCCAGATCAGAGAG
H153E-s	TCTCTGATCTGGCCGAGGAAATGGGCACCCC
H153E-as	GGGGTGCCCATTTCTCGCCAGATCAGAGA
TEV-fw	TATA <u>CTAGA</u> AAGGACAGCCATGAATCACAGACCCGGCCTGACCTT (XbaI)
TEV-rv	TATA <u>CTCGAG</u> TGGGGTATTGTCAAGGGTTGATA (XhoI)
TEV88-fw	<i>GAGAACCTGTATTTTCAGGGCCGTCGCTGCGCACCCCC</i>
TEV88-rv	<i>GCCCTGAAAATACAGGTTCTCCGATAACCACAGGCTGGCCAG</i>
TEV142-fw	<i>GAGAACCTGTATTTTCAGGGCGTCCGCCAGATGCTCTC</i>
TEV142-rv	<i>GCCCTGAAAATACAGGTTCTCCTGTTCCGTTGTTCCAGCCG</i>
TEV210-fw	<i>GAGAACCTGTATTTTCAGGGCTTGGACCTGGCGGAGGAAGGG</i>
TEV210-rv	<i>GCCCTGAAAATACAGGTTCTCGCCCTGAAAATACAGGTTCTC</i>
Stop90-s	GTTATCGCGTCGCTagCGCACCCCCCTG

Stop90-as	CAGGGGGGTGCGctaGCGACGCGATAAC
Stop95-s	CGCACCCCTGtagGATCTCACCC
Stop95-as	GGGTGAGATCctaCAGGGGGGTGCG
Stop106-s	CGCTACCAGCCTGACGtagGGCAACTACCGTATCC
Stop106-as	GGATACGGTAGTTGCCctaCGTCAGGCTGGTAGCG
Stop110-s	ACGGCCGGCAACTAActagATCCGCGTGCCCGCC
Stop110-as	GGCGGGCACGCGGATctaGTAGTTGCCGGCCGT
Stop119-s	CGTGCCCGCCGAGAAGCAtagCCCGAGGTCA
Stop119-as	TGACCTCGGGctaTGCTTCTCCGGCGGGCAGC
Stop154-s	CTCTGATCTGCCCACGAatagGGCACCCCC
Stop154-as	GGGGGTGCCctaTTCGTGGGCCAGATCAGAG
Stop159-s	ATGGGCACCCCTTAtagGTGCTCACGG
Stop159-as	CCGTGAGCACctaTAAGGGGGTGCCCAT
Stop175-s	CAGGACGGGGTCGTtagTGGAATAATGCCACC
Stop175-as	GGTGGCATTATTCCActaCACGACCCCGTCTG
Stop188-s	CCCACAGATCATGGCTGACCAatagACCCGCCTGACC
Stop188-as	GGTCAGGCGGGTctaTTGGTCAGCCATGATCGTGTGGG
Stop206-s	TCCCGGGCCAGtaaCACCGGATCG
Stop206-as	CGATCCGGTGttaCTGGGCCGGGA
Stop210-s	CAGGAACACCGGATCtagTTGGACCTGGCGGAG
Stop210-as	CTCCGCCAGGTCCAActaGATCCGGTGTTCTG
H3-fw	TATACATATGTCGCGTCGCCTGCGCAC (NdeI)
H3-rv	TATAGAATTCCTATGGGGTATTGTCAAGGG (EcoRI)

---

Konstruktion von pEKEx2- und pVWEx2-Derivaten

---

**pEKEx2-cg2699**

cg2699-fw	TAT <u>ACTGCAGA</u> AAGGAGATCAATGGATGAGCAGGTCGTTGC (PstI)
cg2699-rv	TATAGAATTC <u>TTA</u> TCTTTGTCTTTGTCTTTGTCT (EcoRI)
cg2699-seq-1-fw	CCGGTATCGCTGGTCTGTTTTG
cg2699-seq-2-fw	TCCGGCATCGGCATGAATATGC

**pEKEx2-cg2699-eCFP**

cg2699-eCFP-fw	TATAGAATTCGATCCGGGCCCATGGTGAGC (EcoRI)
cg2699-eCFP-rv	TATACATGGGGAGACCTA <u>CCCGCGCGG</u> GTAC (BsaI)
cg2699-Stop-s	AAGACAAAGACAAAGACAAAGAAgcaGAATTCGATCCGGGGCCG
cg2699-Stop-as	CGGCCCGGATCGAATTCgtcTTCTTTGTCTTTGTCTTTGTCTT
CFP-seq-1-rv	TGTCCTACTCAGGAGAGCGTTC
CFP-seq-2-fw	ACCAGTGGCTTCGGGCGG
CFP-seq-3-rv	AGGCCGTTGCGCCTGGAG

**pVWEx2-CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine**

IF-ctaD-YFP-1-fw	GCAGGTCGACTCTAGAGGCAGCGACCTCATGAATTGTTTG
IF-ctaD-YFP-2-rv	ATGTATATCTCCTTCGCGGCTGGAGTCAGATGCAAGG
IF-ctaD-YFP-3-fw	GAAGGAGATACATATGGTGAG
IF-ctaD-YFP-4-rv	CCGGGGATCCTCTAGATTACTTGACAGCTCGTCCATGCCG
CtaD-seq-1-fw	TTCTGACCCCGGGTGGTGC
CtaD-seq-2-fw	TTCTGAGATCATTCTGTGTCTC
CtaD-seq-3-fw	CACACTGGACATCACGATGATATT

---

## 1.4 Medien

### 1.4.1 Nährmedien

SOC-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, nach dem (Hanahan, 1983) Autoklavieren 1 g/l  $MgCl_2 \cdot 4 H_2O$  (sterilfiltriert) und 4 g/l Glucose (separat autoklaviert) zugeben

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; LB-Nährboden: 15 g/l Agar- (Bertani, 1951) Agar (Bacto) zugeben

BHI-Medium: 37 g/l BHI (Bacto); BHI-Nährboden: 104 g/l BHI-Agar (Bacto) (Rosenow, 1919)

CGXII-Medium: 20 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ , 5 g/l Harnstoff, 1 g/l  $KH_2PO_4$ , 1 g/l  $K_2HPO_4$ , 0,25 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 mg/l  $CaCl_2$ , 42 g/l MOPS, 0,2 mg/l Biotin, pH 7 (mit KOH-Plätzchen einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l in verd. NaOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml/l Spurensalzlösung und 40 g/l Glucose zugeben

Spurensalzlösung für CGXII-Medium: 10 g/l  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 10 g/l  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 1 g/l  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,2 g/l  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 20 mg/l  $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ , zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1), für die Spurensalzlösung ohne  $Cu^{2+}$  wurde  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  weggelassen

M9-Medium: 6 g/l  $Na_2HPO_4$ , 3 g/l  $KH_2PO_4$ , 0,5 g NaCl, 1 g  $NH_4Cl$ , pH 7, nach dem (Miller, 1992) Autoklavieren 1 ml/l 1 M  $MgSO_4$ , 1 ml/l 0,1 M  $CaCl_2$  (beide separat sterilfiltriert) und 50 ml 40% (w/v) Glucose (autoklaviert) (sterilfiltriert), ggf. auch 1 ml/l Spurensalzlösung und 1 ml/l Vitaminlösung zugeben

Spurensalzlösung für M9-Medium: 3,7 mg/l  $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 6 H_2O$ , 24,73 mg/l  $H_3BO_3$ , 7,1 mg/l  $CoCl_2 \cdot 6 H_2O$ , 2,5 mg/l  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 15,8 mg  $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ , 2,9 mg  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 2,78 mg  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , sterilfiltrieren

Vitaminlösung für M9-Medium: 0,4 g/l Cholinchlorid, 0,5 g/l Folsäure, 0,5 g/l Pantothensäure, 0,5 g/l Nicotinamid, 1 g/l Myo-Inositol, 0,5 g Pyridoxin, 0,5 g/l Thiamin, 0,05 g/l Riboflavin, 1 g/l Biotin

Zur Herstellung von Kupfer-Mangelmedien wurden alle Glasgefäße vor dem Gebrauch mit 0,1 M HCl für mindestens 24 h inkubiert, danach mit VE-Wasser ausgespült und anschließend autoklaviert. Wenn benötigt, wurde der spezifische Kupfer(I)-Chelator BCS (Bathocuproindisulfonat, Sigma-Aldrich) zu einer Endkonzentration von 150  $\mu M$  BCS und 1 mM Ascorbat zum Medium zugegeben.

Wenn erforderlich, wurde den Nährmedien Kanamycin oder Tetracyclin zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml bzw. 10 µg/ml (*E. coli*) oder 25 mg/ml bzw. 3 µg/ml (*C. glutamicum*) zugegeben.

### 1.4.2 Puffer und Stammlösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt

APS	Ammoniumpersulfat, 10% (w/v)
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5
Ascorbat	1 M (sterilfiltriert, frisch angesetzt)
BCS	150 mM (sterilfiltriert)
Biotin	200 mg/l (sterilfiltriert)
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	1% (w/v) (sterilfiltriert)
CuSO <sub>4</sub> -Lösung	100 mM CuSO <sub>4</sub>
Glucose (40 %)	40% (w/v) (autoklaviert)
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid, 10% (w/v) (frisch angesetzt)
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid , 1 M (sterilfiltriert)
Kanamycin	50 mg/ml oder 25 mg/ml (sterilfiltriert)
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol (sterilfiltriert)
10 x PBS-Puffer	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 14 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3 (Sambrook, 1989)
Proteaseinhibitormix	100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 100 mM DFP (Diisopropylphosphat) in getrocknetem Ethanol gelöst
Protekatechusäure	30 mg/ml (sterilfiltriert, zum Lösen wurden 1-2 Tropfen NaOH zugegeben)
5 x SDS-Ladepuffer	0,225 M Tris-HCl, pH 6,8, 50% (v/v) Glycerin, 5% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT (Dithiotreitol) (Laemmli, 1970)
10 x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS (Laemmli, 1970)
Strip-Puffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7,9 (Porath <i>et al.</i> , 1975)
50 x TAE-Puffer	37,2 g/l Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O, 242 g/l Tris, mit Eisessig ad pH 8,5 (Sambrook, 1989)

TNlx-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, x mM Imidazol (Porath <i>et al.</i> , 1975)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA (Sambrook, 1989)
TG-Puffer	1 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10% (v/v) Glycerin (autoklaviert) (Sambrook, 1989)
Towbin-Puffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol (Towbin, 1979)
Puffer Wx	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, x mM NaCl, pH 8,0 (Towbin, 1979)
Puffer E	Puffer W + 300 mM NaCl + 15 mM Desthiobiotin (Towbin, 1979)
Puffer R	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, 500 mM NaCl, pH 8,0 (Towbin, 1979)

## 2 Methoden

### 2.1 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Die Kultivierung von Bakterien zur Stammhaltung erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium (*E. coli*) oder 5 ml BHI-Medium + 2% (w/v) Glucose (*C. glutamicum*), die über Nacht mit 170 Upm bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*C. glutamicum*) geschüttelt wurden. Anschließend wurden 500 µl der üN-Kulturen mit 500 µl sterilem Glycerin gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Beide Aliquots wurden bei -70°C gelagert. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.2 Kultivierung von *C. glutamicum*

*C. glutamicum* wurde standardmäßig in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen kultiviert, die 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose (222 mM) enthielten und bei 30 °C und 120 Upm inkubiert wurden. Zum Animpfen der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als 4 Tage waren. Die Vorkultivierung erfolgte zunächst für 8 h in 5 ml BHI-Medium mit 2% (w/v) Glucose und anschließend für 16 h in 20 ml CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, bevor die 50 ml Hauptkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inokuliert wurde. Bei Kultivierungen unter Kupfer-limitierenden Bedingungen wurden die Zellen nach der ersten Vorkultivierung in 5 ml BHI-Medium zweimal in CGXII-Minimalmedium ohne Kupfer gewaschen (jeweils 7 min bei 5467 g) und im Kupfer-Mangelmedium + 4% (w/v) Glucose wie oben beschrieben kultiviert. Für die Vorkultivierung und anschließende Hauptkultivierung wurden die mit 0,1 M HCl vorbehandelten Kolben verwendet (vgl. 1.4.1). Zu den Hauptkulturen wurde 150 µM BCS und 1 mM Ascorbat (frisch angesetzt) zugegeben. Bei Kultivierungen zur Gesamt-RNA-Isolierung wurde wie

oben beschrieben verfahren. Die Zellen für die RNA-Isolierung wurden bei einer  $OD_{600}$  von ca. 20 geerntet. Bei Hochdurchsatz- Kultivierungen wurde die BioLector-Technologie (Samorsky *et al.*, 2005, Kensy *et al.*, 2009) genutzt. Die Hauptkulturen wurden nicht in Kolben, sondern in Mikrotiter-Platten (48-well flower-paltes, m2p-labs) im BioLector® (m2p-labs) bei 1200 Upm und 30 °C inkubiert. Das Volumen der Kulturen betrug 800 µl. Die Zunahme der Biomasse wurde über die steigende Rückstreuung in den Kulturen detektiert und in Absorptionsunits in 15-minütigen Abständen gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der Software BioLecture 2.2.0.0 (m2p-labs). Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.3 Kultivierung von *E. coli***

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde routinemäßig LB-Medium verwendet (Sambrook, 1989). Nur zur Regeneration der Zellen nach einer Transformation bzw. bei der Kultivierung zur Herstellung kompetenter Zellen wurde SOC-Komplexmedium (Sambrook, 1989) eingesetzt. Zur Überexpression der Proteine für Festkörper-NMR wurde M9-Medium mit Zusätzen (Spurensalz- und Vitaminlösung) verwendet (Miller, 1992). Alle *E. coli*-Stämme wurden in Schüttelkolben, in Röhrchen bzw. auf Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Für Plasmid-Überexpression wurden 500 ml LB-Medium oder M9-Medium mit 2% (w/v) Glucose und 50 µg/ml Kanamycin mit 5 ml einer üN-Kultur des *E. coli*-Stammes mit dem gewünschten Expressionsplasmid angeimpft. Die Kulturen wurden zunächst bei 37 °C und 120 Upm inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von ca. 0,6 erreicht hatten. Die Expression des Zielgens wurde durch Zusatz von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Danach wurden die Zellen bei RT und 120 Upm 4 h oder üN weiter inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (30 min, 5467 g, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden einmal in 30 ml Aufschlusspuffer TN15 gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor Induktion sowie 1, 2, 3, 4 und ggf. 20 h danach wurde die  $OD_{600}$  bestimmt sowie 150 µl Proben entnommen und abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in ( $OD_{600} \times 30$ ) µl 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert. Zur Überproduktion von isotope markiertem Protein wurde M9-Medium ohne  $NH_4Cl$  verwendet, stattdessen wurde 1 g/l  $^{15}N-NH_4Cl$  (Cambridge Isotope Laboratories) zugesetzt, als C-Quelle wurde uniform markierte  $^{13}C$ -Glucose (0,5% (w/v)) (Cambridge Isotope Laboratories) genutzt. Die Methodenbeschreibung wurde aus Gebel (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

## 2.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Ultraspec 1100 *pro* Spectrophotometer (Amersham Biosciences) bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der optischen Dichte ist bis zu einer Extinktion von 0,4 gegeben. Lag die gemessene Extinktion höher als 0,4, wurde die Probe mit Wasser verdünnt. Die Methodenbeschreibung wurde aus Gebel (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

## 2.5 Bestimmung der Glucosekonzentration mittels HPLC

Die quantitative Bestimmung der Glucosekonzentration in Kulturüberständen erfolgte durch Ionen-Ausschlusschromatographie an einer Kationenaustauschersäule (Organic acid, 300 x 8 mm; Chromatographie GmbH) durch isokratische Elution innerhalb von 38 min mit 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei einer Flussrate von 0,4 ml/min und einer Temperatur von 30 °C mit Hilfe eines Agilent Technologies 1100 LC Systems. Die eluierte Glucose wurde mit einem Refractive Index-Detektor detektiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Signalflächen mit zuvor erstellten Kalibriergeraden aus externen Standards. Die Methodenbeschreibung wurde aus Otten (2012) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

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

Durch eine RbCl<sub>2</sub>-Behandlung erhielten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan, 1983, 1985). Einige 2-3 mm große Kolonien wurden von einer frischen LB-Platte in 5 ml LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C und 170 Upm üN inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml von der üN-Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 bei 37 °C und 120 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen in ein 50 ml-Falcon überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 5467 g und 4 °C geerntet, in 15 ml eiskalter RF<sub>1</sub>-Lösung (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 15% (v/v) Glycerin, mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 4 ml eiskalter RF<sub>2</sub>-Lösung (10 mM Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 15% (v/v) Glycerin, mit 6 M NaOH auf pH 6,8 eingestellt) resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in 50 bzw. 100 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden

100 µl der Zellen mit bis zu 10 µl Ligationsansatz oder 1 µg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 500 µl SOC-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz wurde für weitere 45 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Plasmids wurden 100 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

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

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest *et al.* (1999). Von einer frisch ausgestrichenen BHI-Agarplatte wurde eine 20 ml BHI-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 h bei 30 °C kultiviert. Eine 500 ml BHI-Hauptkultur wurde mit 10 ml der üN Kultur inokuliert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,75 wurden die Zellen zunächst für 20 min auf Eis gelagert, bevor sie geerntet wurden (30 min, 5467 g, 4 °C). Die Zellen wurden je zweimal mit 20 ml TG-Puffer und 10%-igem (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 10%-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und in 100 µl Aliquots im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen mit etwa 100 ng Plasmid (1 - 2 µg bei gewünschter Insertion ins Genom) in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Die Zellen wurden dann mit 900 µl eiskaltem 10%-igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 4 ml BHI-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46 °C) und abschließend 1 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf BHI-Agarplatten mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

## **2.8 DNA-Techniken**

### **2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim and Doly, 1979). Eluiert wurde mit 50 µl bidest. Wasser.

### 2.8.2 Isolierung von RNA

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

Ca. 20 ml einer *C. glutamicum*-Kultur ( $OD_{600}$  von 20) wurden in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte, mit 10 g Eis beladene 50 ml-Falcon gefüllt und abzentrifugiert (5 min, 5467 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die sedimentierten Zellen wurden eingefroren und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Aufschluss wurden die Zellen in 350  $\mu\text{l}$  eiskaltem RLT-Puffer (RNeasy, Qiagen) mit 10 mM DTT (Endkonzentration) resuspendiert und in Gegenwart von 250 mg Zirkonium/Silica-Perlen (Durchmesser 0,1 mm, Roth) 15 s und dann nochmals 30 s in einem Amalgamator (Silamat, Vivadent) mechanisch aufgeschlossen. Ab hier fanden alle Schritte bei RT statt. Nach Abtrennen von Zelltrümmern und intakten Zellen durch Zentrifugation (2 min, 15700 g) wurde der Überstand mit 250  $\mu\text{l}$  Ethanol abs. (eiskalt) vermischt, auf die RNeasy-Säulchen aufgetragen und 15 s bei 15700 g zentrifugiert. Die Membran wurde mit 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) gewaschen (15 s, 15700 g) und anschließend wurde ein Mix aus 10  $\mu\text{l}$  DNase I (RNase-free DNase-Set, Qiagen) und 70  $\mu\text{l}$  RDD-Puffer (RNase-free DNase-Set, Qiagen) auf die Säulchenmembran gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 350  $\mu\text{l}$  RW1-Puffer wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und mit 500  $\mu\text{l}$  RPE Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) gewaschen. Die Säulchen wurden 15 s bei 15700 g zentrifugiert und erneut mit 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer gewaschen (2 min, 16100 g). Nach einer weiteren Zentrifugation (30 s, 15700 g) zur Entfernung von Ethanol-Resten wurde die RNA mit 50  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert (1 min, 15700 g). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.8.3 Reinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte sowie geschnittene DNA von Nukleotiden, Oligonukleotiden und Enzymen zu reinigen, wurde das PCR-Purification-Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen) verwendet. Die DNA wurde mit 50  $\mu\text{l}$  bidest. Wasser.

#### 2.8.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II GelExtraction-Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mit 50 µl bidest. Wasser eluiert.

#### 2.8.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, peqlab Biotechnologie) bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Probe zwischen zwei optische Fasern pipettiert. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde anhand des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Niedrigere oder höhere Quotienten lassen auf Verunreinigungen mit Protein, Phenol oder anderen Kontaminanten schließen, die ebenfalls bei 280 nm eine hohe Absorption aufweisen. Es wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook, 1989):

doppelsträngige DNA:  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 ng/µl,

einzelsträngige DNA und RNA:  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 40 ng/µl.

Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen.

#### 2.8.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern (BioRad). Für die Gele wurde 1%-ige (w/v) Agarose (Invitrogen™ life technologies Agarose electrophoresis grade ultra pure) in 1 x TAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die zu analysierende DNA wurde mit 1/5 Vol. 6 x DNA-Loading Dye (Fermentas) versetzt. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung zwischen 90 und 110 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch 30-minütige Inkubation des Gels in wässriger Gelred-Lösung (1 µg/ml). Durch Belichtung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences). Zur Größenbestimmung der DNA wurde GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus, ready-to-use (Fermentas) verwendet. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

#### 2.8.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanden) als auch präparative Zwecke (*in vitro* Amplifizierung von DNA-Fragmenten) genutzt. Falls im Text nicht anders vermerkt, wurde für präparative PCR-Ansätze das Expand High Fidelity Kit

(Roche Diagnostics), für analytische PCR-Ansätze die *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen) verwendet. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotiden sind in Tab. 3 dargestellt. Die Reaktionen wurden in einem Thermal cycler (Eppendorf) oder in einem Primus Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt gewählt: Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 100 µl enthielten 0,2 - 0,3 µg Matrizen-DNA, je 600 nM der beiden Primer, 5 U High Fidelity DNA-Polymerase sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C wurden 35 Zyklen mit folgenden Parametern durchlaufen: 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei  $T_m - 5$  °C und  $x$  s Elongation bei 72 °C. Die Annealing-Temperatur wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer gewählt. Die Schmelztemperatur  $T_m$  der DNA kann mit der Formel  $T_m [°C] = [(G + C) \cdot 4] + [(A + T) \cdot 2]$  abgeschätzt werden. Als Elongationszeit wurde 1 min pro 1 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Zur Kontrolle von *E. coli*-Transformanden wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und als Matrize direkt in die PCR-Ansätze gegeben. Bei der Kontrolle von *C. glutamicum*-Transformanden erfolgte der erste Denaturierungsschritt für 10 min. Zur Analyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.8.8 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs, Fermentas oder Roche Diagnostics bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte in 20 µl (für PCR-Produkt) und 100 µl (für Vektor-DNA) Ansätzen unter Verwendung eines geeigneten Puffers (SuRE/Cut Buffers for Restriction Enzymes, Boehringer) und mit 5 - 10 U des entsprechenden Enzyms. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Methodenbeschreibung wurde aus Kabus (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.8.9 Ligation

Für Ligationen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ansätze wurden 30 min bei RT inkubiert.

### 2.8.10 DNA-Sequenzanalyse

Für DNA-Sequenzierungen wurden die zu testenden Plasmide mit einer Konzentration von 100 ng/µl zu Eurofins MWG Operon geschickt. Das dort praktizierte Barcode Sequencing nutzt die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Jeder Probe wurde zusätzlich 15 pmol

Sequenzierprimer (Tab. 3) zugesetzt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Clone Manager 9 für Windows XP (Professional Edition, Scientific & Educational Software), sowie BLAST (<http://hcbi.nlm.nih.gov>). Die Methodenbeschreibung wurde aus Otten (2008) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.8.11 Klonierung mittels In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit**

Das In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Clontech) bietet die Möglichkeit Restriktionsendonukleasen zu benutzen, die innerhalb des zu klonierenden Gens schneiden. Die Klonierung erfolgt hierbei Ligase- und Phosphatase-unabhängig und basiert auf der homologen Rekombination zwischen Vektor und PCR-Produkt bzw. mehreren PCR-Produkten. Für diese Methode wurden Primer konstruiert, die 15 bp lange zum Vektor bzw. zueinander homologe Überhänge aufweisen. Die Oligonukleotide IF-ctaD-YFP-1-fw, IF-ctaD-YFP-2-rv, IF-ctaD-YFP-3-fw und IF-ctaD-YFP-4-rv (Tab. 3) wurden *in silico* konstruiert (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcr-PrimersInit.do>). Die amplifizierten PCR-Produkte (mit den Oligonukleotiden IF-ctaD-YFP-1-fw und IF-ctaD-YFP-2-rv bzw. IF-ctaD-YFP-3-fw und IF-ctaD-YFP-4-rv) wurden nach Angaben des Herstellers mit dem In-Fusion Cloning Enhancer behandelt und mit dem linearisierten Vektor durch 30-minütige Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (15 min bei 37 °C und 15 min bei 50 °C) in Anwesenheit des In-Fusion Enzyms vereinigt. Es folgte eine Transformation in *E. coli* und eine Antibiotikum-Resistenz-bedingte Selektion. Die Methodenbeschreibung wurde aus Schuplezow (2009) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.8.12 Ortsgerichtete Mutagenese**

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit dem QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Mutation wurden zwei komplementäre Oligonukleotide ausgewählt, die im zentralen Bereich die gewünschte Mutation enthielten. Die Mutagenesereaktion wurde im Mastercycler engradiant (Eppendorf) durchgeführt, anschließend erfolgte ein 5-minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym DpnI aus dem Kit. Danach wurde der Ansatz direkt für die Transformation kompetenter *E. coli* DH5α verwendet. Überprüfung der erfolgreichen Mutagenesereaktion wurde bei einer Sequenzierung der aus *E. coli* isolierten Plasmide festgestellt.

## 2.8.13 Plasmidkonstruktion

### 2.8.13.1 Konstruktion von pET-Derivaten

Für die Konstruktion des pET-Expressionsplasmids pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS (Tab. 2) wurde der kodierende Bereich des *copS*-Gens zwischen den Codons 89 und 399 mit den Oligonukleotiden H3-fw und H3-rv (Tab. 3) und chromosomaler DNA von *C. glutamicum* amplifiziert. Das aufgereingte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und EcoRI verdaut und mit dem entsprechend geschnittenen pET-TEV1-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert. Die Transformanden wurden mittels Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden pET-Promotor und pET-Terminator (Tab. 3) überprüft. Das Plasmid wurde aus den positiven Klonen isoliert. Vor der Transformation des Überexpressionsstamms *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid wurde die Sequenz, die für das H<sub>3</sub>-CopS-Derivate kodiert, einer Sequenzanalyse mit den Oligonukleotiden pET-Promotor und pET-Terminator unterzogen.

Die pET-Expressionsplasmide pET28b-CopS-TEV<sub>88</sub>, pET28b-CopS-TEV<sub>142</sub> und pET28b-CopS-TEV<sub>210</sub> (Tab. 2) wurden mit Hilfe von overlap-extension PCR konstruiert. Hierzu wurden für jedes Konstrukt zwei PCR-Fragmente mit den Oligonukleotiden TEV-fw und TEV88-rv bzw. TEV88-fw und TEV-rv für pET28b-CopS-TEV<sub>88</sub>, TEV-fw und TEV142-rv bzw. TEV142-fw und TEV-rv für pET28b-CopS-TEV<sub>142</sub> und TEV-fw und TEV210-rv bzw. TEV210-fw und TEV-rv für pET28b-CopS-TEV<sub>210</sub> amplifiziert (Tab. 3). Als Template für die einzelnen Fragmente diente chromosomale *C. glutamicum* DNA. Anschließend erfolgte erneut eine PCR mit den Oligonukleotiden TEV-fw und TEV-rv. Als Template dienten die zuvor erhaltenen PCR-Produkte. Es entstanden Fusionsprodukte, die im Vergleich zu der nativen *copS*-Sequenz neben dem Hexahistidin-Tag am C-Terminus eine Schnittstelle für die TEV-Protase an Position 88, 142 bzw. 210 aufwiesen (bezogen auf die aa-Position in dem nativen CopS-Protein). Die Oligonukleotide TEV-fw und TEV-rv beinhalten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI und XhoI, welche einen Einbau in den pET28b-Vektor ermöglichen. Nachdem die Größe des jeweiligen Fusionskonstrukts auf einem Agarose-Gel überprüft wurde, erfolgte ein Restriktionsverdau mit XbaI und XhoI, anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem linearisierten pET28b (mit XbaI und XhoI) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert. Die Transformanden wurden mittels Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden pET-Promotor und pET-Terminator überprüft, aus den positiven Transformanden wurden die Plasmide isoliert und mit den gleichen Oligonukleotiden einer Sequenzierung unterzogen.

Die Konstruktion der Expressionsplasmide pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>90</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>95</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>106</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>110</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>119</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>154</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>159</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>175</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>188</sub>,

pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>210</sub> erfolgte mittels ortsgerichteter Mutagenese, indem ein Triplet für eine Aminosäure an einer bestimmten Position gegen ein Stoppcodon ausgetauscht wurde (Tab. 2). Die Nummer am Ende jedes Plasmidnamens gibt an, an welcher Position ein Stoppcodon eingeführt wurde. Hierzu wurden die Oligonukleotidpaare Stop90-s und Stop90-as, Stop95-s und Stop95-as, Stop106-s und Stop106-as, Stop110-s und Stop110-as, Stop119-s und Stop119-as, Stop154-s und Stop154-as, Stop159-s und Stop159-as, Stop175-s und Stop175-as, Stop188-s und Stop188-as, Stop206-s und Stop206-as, Stop210-s und Stop210-as verwendet (Tab. 3).

Bei den Expressionsplasmiden pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS-H153A, pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS-H153E, pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS-H153A und pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS-H153E (Tab. 2) wurde der konservierte Histidin-Rest von CopS an Position 153 gegen Alanin oder Glutamat mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese ersetzt. Der Austausch erfolgte in den Plasmiden pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS und pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS mit den Oligonukleotidpaaren H153A-s und H153A-as für Alanin und H153E-s und H153E-as für Glutamat (Tab. 3). Nach den Mutagenesereaktionen wurden die Plasmide in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA aus den Transformanden isoliert und einer Sequenzierung unterzogen.

### **2.8.13.2 Konstruktion von pEKEx2- und pVWEx2-Derivaten**

Zur Konstruktion des pEKEx2-cg2699 Plasmids wurde das Gen cg2699 mit den Oligonukleotiden cg2699-fw und cg2699-rv (Tab. 3) und chromosomaler DNA von *C. glutamicum* amplifiziert. Das 2166 bp große PCR-Produkt mit dem cg2699-Gen, einer RBS (AAGGA) und einem Linker (GGGGC) vor dem Startcodon, welche mit Hilfe des Primers cg2699-fw eingeführt wurde, wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und EcoRI verdaut und mit dem entsprechend linearisierten pEKEx2-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert. Die Richtigkeit der über Nacht gewachsenen Transformanden wurde mittels Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden pEKEx2-for und pEKEx2-rev überprüft. Anschließend wurden positive Klone mit den Primern pEKEx2-for, pEKEx2-rev, cg2699-seq1-fw und cg2699-seq2-rv einer Sequenzierung unterzogen (Tab. 3).

Für die Konstruktion des pEKEx2-cg2699-eCFP Plasmids, welches für ein Cg2699-eCFP Fusionsprotein kodiert, wurde pEKEx2-cg2699 als Ausgangsplasmid verwendet. Das eCFP-Gen wurde mit den Primern cg2699-eCFP-fw und cg2699-eCFP-rv amplifiziert und mit dem pEKEx2-cg2699-Plasmid (linearisiert mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BsaI) ligiert, sodass eCFP

nach dem Stoppcodon von Cg2699 und einem Linker aus 18 bp (GAATTCGATCCGGGCCGC) eingefügt wurde. Anschließend wurde das Stoppcodon gegen ein Alanin durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden cg2699-Stop-s und cg2699-Stop-as ersetzt (Tab. 3). Das Plasmid wurde mit den Oligonukleotiden CFP-seq-1-rv, CFP-cg2699-seq-2-fw, CFP-3-rv, cg2699-seq-1-fw, cg2699-seq-2-rv, pEKEx2-vor und pEKEx2-rev mittels Sequenzierung auf die Richtigkeit der Sequenz überprüft.

Das Plasmid pVWEx2-CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine wurde mittels in-Fusion Klonierung konstruiert. Dabei wurden zwei PCR-Produkte mit *ctaD* und *mCitrine* (amplifiziert mit IF-ctaD-YFP-1-fw und IF-ctaD-YFP-2-rv und mit IF-ctaD-YFP-3-fw und IF-ctaD-YFP-4-rv) in einer in-Fusion Reaktion mit dem mit XbaI verdautem pVWEx2-Vektor fusioniert (s. 2.8.11). Das resultierende Plasmid wurde mit den Oligonukleotiden CtaD-seq-1-fw, CtaD-seq-2-fw, CtaD-seq-3-fw, pVWEx2-vor und pVWEx2-rev auf die Richtigkeit des eingebauten Inserts überprüft.

### 2.8.13.3 Konstruktion von pK19*mobsacB*-Deletionsplasmiden

Zur Konstruktion der *C. glutamicum*-Deletionsmutanten  $\Delta$ cg2699,  $\Delta$ copC (oder  $\Delta$ cg1884) und  $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699 wurden die Plasmide pK19*mobsacB*- $\Delta$ cg2699 und pK19*mobsacB*- $\Delta$ cg1884 konstruiert (Tab. 2). In einer ersten PCR wurden zwei etwa 400 bp große Fragmente, die stromaufwärts und stromabwärts von dem zu deletierenden Gen liegen, mit den Oligonukleotiden  $\Delta$ cg2699-1-fw und  $\Delta$ cg2699-2-rv bzw.  $\Delta$ cg2699-3-fw und  $\Delta$ cg2699-4-rv für pK19*mobsacB*- $\Delta$ cg2699 und  $\Delta$ cg1884-1-fw und  $\Delta$ cg1884-2-rv bzw.  $\Delta$ cg1884-3-fw und  $\Delta$ cg1884-4-rv für pK19*mobsacB*- $\Delta$ cg1884 amplifiziert (Tab. 3). Die Oligonukleotide  $\Delta$ cg2699-1-fw und  $\Delta$ cg2699-4-rv bzw.  $\Delta$ cg1884-1-fw und  $\Delta$ cg1884-4-rv wurden für die Klonierung in das Plasmid pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme PstI und EcoRI bzw. HindIII und EcoRI ergänzt. Die Oligonukleotide  $\Delta$ cg2699-2-rv und  $\Delta$ cg2699-3-fw bzw.  $\Delta$ cg1884-2-rv und  $\Delta$ cg1884-3-fw besitzen eine 21 bp lange komplementäre Sequenz. In einer Overlap-extension PCR mit den Oligonukleotiden  $\Delta$ cg2699-1-fw und  $\Delta$ cg2699-4-rv bzw.  $\Delta$ cg1884-1-fw und  $\Delta$ cg1884-4-rv sowie den beiden ca. 400 bp großen Fragmenten der ersten PCR als Matrize konnten die komplementären Sequenzen hybridisieren und verlängert werden. Die so erhaltenen Fusionsprodukte wurden mit PstI und EcoRI bzw. HindIII und EcoRI verdaut, aufgereinigt und in den entsprechend geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* kloniert und auf Fehlerfreiheit mittels DNA-Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13-for und M13-rev (Tab. 3) überprüft.

### **2.8.14 Konstruktion der Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19mobsacB-Systems**

*C. glutamicum*-Deletionsmutanten wurden nach Niebisch and Bott (2001) in Anlehnung an die von Link *et al.* (1997) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19mobsacB konstruiert (Schäfer *et al.*, 1994). Dazu wurden die in Tab. 2 beschriebenen pK19mobsacB-Derivate verwendet, die mittels Elektroporation in *C. glutamicum* Wildtyp oder  $\Delta$ ctaD-Deletionsmutante transferiert wurden. Die transformierten Zellen wurden auf BHI-Agarplatten mit 25  $\mu$ g/ml Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19mobsacB kann in *C. glutamicum* nicht repliziert werden. Daher sollte bei Kanamycin-resistenten Klonen das Plasmid durch homologe Rekombination am entsprechenden Genlocus in das Chromosom integriert worden sein. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden Kanamycin-resistente Klone zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 0,5% (w/v) Glucose kultiviert bevor die Zellen in 5 ml CgXII-Medium mit 0,5% (w/v) Glucose (ohne N- und P-Quelle) gewaschen, in 5 ml resuspendiert und für 6 h bei 30 °C und 170 Upm inkubiert wurden. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l einer 1:200, 1:500 und 1:1000-Verdünnung der Kulturen auf BHI-Agarplatten mit 10% (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19mobsacB-Plasmids codiert für das Enzym Levansaccharase, das Saccharose in ihre Monosaccharide Fructose und Glucose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan umsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose letal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.*, 1992). Daher sollte bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein, wobei entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt wird. Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden  $\Delta$ cg2699-out-fw und  $\Delta$ cg2699-out-rv für die Deletion des cg2699-Gens bzw.  $\Delta$ cg1884-out-fw und  $\Delta$ cg1884-out-rv für die Deletion des cg1884-Gens (Tab. 3), analysiert. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

## **2.9 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.9.1 Zellaufschluss**

Für den Aufschluss von *C. glutamicum*- und *E. coli*-Zellen wurden diese in ca. 4 ml Aufschlusspuffer (TN15-Puffer oder Puffer W) pro 1 g Zellen (Nassgewicht) resuspendiert und 100  $\mu$ l Proteaseinhibitor-Mix pro 1 g Zellen hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch viermalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO Spectronic Instruments) bei einem Druck von 108 MPa (*E. coli*) oder 172 MPa (*C. glutamicum*). Alternativ wurden die *E. coli*-Zellen mit Ultraschall (Sonifier® 250, Branson Ultrasonics) in Rosettenzellen (Branson Ultrasonics) aufgeschlossen. Der

Zellaufschluss erfolgte für 5 x 2 min mit einer Pulslänge von 50%, einer Beschallintensität von 8 und einer Pause von 1 min zwischen den Beschallungen. Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 5467 g, 4 °C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (60 min bei 180000 g, 4 °C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.9.2 Solubilisierung von Membranproteinen**

Für die Solubilisierung von Membranproteinen wurde die Membranfraktion im Ausgangsvolumen Aufschlusspuffer (Puffer W oder TNI5) resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode bestimmt. Die Suspension wurde langsam auf Eis gerührt und dabei eine 10%-ige DDM-Lösung (Biomol) zugetropft, bis eine Endkonzentration von 2 g DDM pro g Protein erreicht war. Bei der Solubilisierung mit Empigen BB (N-N-Dimethyl-N-dodecyl-betain, 35%-ig in Wasser, Sigma-Aldrich) oder Digitonin (Sigma-Aldrich) wurde das Detergenz ebenfalls langsam zugefügt, bis die Endkonzentration von 2% (v/v) Empigen BB bzw. 1 g Digitonin pro g Protein erreicht wurde. Die Probe wurde anschließend 45 min auf Eis unter Rühren inkubiert. Nach 20-minütiger Ultrazentrifugation bei 180000 g und 4 °C wurde der Überstand mit den solubilisierten Membranproteinen für die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (s. 2.9.6) oder Strep-Tactin-Chromatographie (s. 2.9.7) weiter verwendet. Die Methodenbeschreibung wurde aus Schelder (2008) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.9.3 Bestimmung von Proteinkonzentration**

Bradford-Methode:

Für die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) wurden 50 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima) versetzt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde Rinder-Serumalbumin (BSA) verwendet. Die Methodenbeschreibung wurde aus Schelder (2008) übernommen.

UV-Absorption:

Bei den Standard-Proteinkonzentrationsbestimmungstests wirken Detergenzien störend, deswegen wurde die Konzentration von solubilisierten Proteinen durch die Messung der Extinktion unter Verwendung des berechneten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) bei 280 nm (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, peqlab Biotechnologie) bestimmt. Hierzu wurde der Extinktionskoeffizient

basierend auf der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms „ProtParam“ (www.expasy.ch) ermittelt. Für die CopS-Derivate NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS, NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS-H153A und NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS-H153E betrug der Extinktionskoeffizient 22,92 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>, für die CopS-Derivate N<sub>GHM</sub>CopS-TEV, N<sub>GHM</sub>CopS-TEV-H153A und N<sub>GHM</sub>CopS-H153E war  $\epsilon = 21,43 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , für die verkürzten CopS-Derivate NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> und N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub> war  $\epsilon = 16,96 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  bzw.  $15,47 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Die Methodenbeschreibung wurde aus Schuplezow (2009) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

#### **2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung löslicher und membrangebundener Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad) durchgeführt. Es wurden 15%-ige Trenngele und 8%-ige Sammelgele bzw. 12%-ige Trenngele und 6%-ige Sammelgele genutzt. Die Proben wurden mit 1/4 Volumen fünffach konzentriertem SDS-Ladepuffer (0,225 M Tris-HCl, pH 6,8, 50% (v/v) Glycerin, 5% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde für Coomassiegefärbte Gele der Precision Plus Protein Unstained Standard (BioRad) und für Westernblot-Analysen der Dual Color Standard (BioRad) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V. Um größere Mengen Protein nachzuweisen, erfolgte eine Färbung routinemäßig mit kolloidalem Coomassie (Nachweisgrenze: 50 bis 200 ng). Hierfür wurde die Fertiglösung Rapid Stain™ (Bioscience) entsprechend der Anweisung des Herstellers verwendet. Die Gele wurden zunächst 3 x 10 min mit bidest. Wasser gewaschen, eine Stunde gefärbt und dann mindestens eine Stunde mit bidest. Wasser wieder entfärbt. Zum Nachweis geringerer Proteinmengen (Nachweisgrenze: 0,1 bis 1 ng) wurde die Silberfärbung genutzt (Blum *et al.*, 1987). Hierfür wurden die Gele mindestens 30 min in Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig und 500 µl 37% (v/v) Formaldehyd pro Liter) inkubiert und dann 2 x 10 min in 30% (v/v) Ethanol und 1 x 10 min mit bidest. Wasser gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung (0,02% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O) und anschließendes Waschen für 3 x 20 s in bidest. Wasser. Als nächstes wurde das Gel 20 min in frisch angesetzter Silbernitratlösung (0,2% (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 75 µl 37% (v/v) Formaldehyd pro 100 ml) inkubiert und wieder 3 x 20 s mit bidest. Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 3% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,0004% (w/v) Natriumthiosulfat und 500 µl 37% (v/v) Formaldehyd pro Liter. Nach ausreichender Färbung wurden die Gele 2 x kurz mit VE-Wasser gespült und dann 10 min in Stopp-Lösung (50 mM EDTA) geschüttelt. Zuletzt wurde noch dreimal kurz mit VE-Wasser gewaschen. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Brocker (2006) und Krug (2004) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.9.5 Westernblot-Analyse

Für den Nachweis vom CtaD-Protein mit einer Strep-Tag II-Sequenz (CtaD<sub>St</sub>) mittels Westernblot-Analyse wurde ein Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (IBA) verwendet. Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Membranen erfolgte durch ElektrobloTTing in einer Transblot Semi-Dry Transfer Cell (BioRad). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Protran, Whatman) mit Towbin-Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) (Towbin *et al.*, 1979) übertragen. Dazu wurden 4 Whatman-Papiere, das Gel und die Membran zunächst in Towbin-Blotpuffer inkubiert. Für den Blot-Aufbau wurden 2 Whatmanpapiere, die Membran, das Gel und 2 Whatmanpapiere in der angegebenen Reihenfolge luftblasenfrie auf die Anode gelegt und anschließend die Kathode aufgesetzt. Der Transfer erfolgte 60 min (+ 15 min pro weiteres Gel) bei einer Stromdichte von 1 mA/cm<sup>2</sup>. Nach dem Blotten wurde die Membran über Nacht in 1 x PBST-Puffer mit 3% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) geschüttelt und anschließend dreimal 10 min mit PBST-Puffer gewaschen. Zur Maskierung biotinylierter Proteine wurde die Membran 30 min in 1 x PBST-Puffer mit 4 µg/ml Avidin (aus Hühnereiweiß, Sigma) geschüttelt, bevor sie nach Zugabe eines Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (IBA) in einer 1:4000-Verdünnung eine weitere Stunde geschüttelt wurde. Nach zweimaligem Waschen der Membran für 5 min mit PBST und 1 x 5 min mit PBS (PBST ohne Tween 20) erfolgte die Detektion. Dazu wurde die Membran in 25 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) mit je 250 µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat (20 mg/ml in H<sub>2</sub>O) und 250 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Lösung (30 mg/ml in 70% (v/v) Dimethylformamid) inkubiert. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Überführung der Membran in VE-Wasser gestoppt. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Schelder (2008) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.9.6 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Proteinreinigung der verschiedenen Polyhistidin-getaggten Proteine erfolgte über separate 5 ml-Polypropylen-Säulen (Qiagen), die luftblasenfrie mit je 4 ml suspendierter Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gefüllt wurden, was einem Bettvolumen von 2 ml entsprach. Das Material wurde mit einer Fritte abgedeckt. Die Säule wurde zunächst mit 40 ml TNI5-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt zweimal auf die Säule gegeben. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 40 ml TNI50-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 6 x 1 ml TNI200- oder TNI400-Puffer eluiert. Proteine, die immer noch an Ni<sup>2+</sup> gebunden waren, wurden durch Entfernen der Ni<sup>2+</sup>-Ionen mit 10 ml des EDTA enthaltenden Strip-Puffers entfernt. Die Säule wurde entweder bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C gelagert oder mit 4 ml 100

mM NiSO<sub>4</sub> für eine neue Chromatographie vorbereitet. Bei der Reinigung von Membranproteinen wurde jeder Puffer mit 0,05% (w/v) DDM versetzt. Die Proteinaufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.9.7 Strep-Tactin-Chromatographie**

Proteine mit einem C-terminalen Strep-Tag II (Sequenz: WSHQPFEK) wurden durch Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin-Sepharose gereinigt (Skerra and Schmidt, 2000). Die lösliche Proteinfraction wurde zunächst zur Absättigung von biotinylierten Proteinen mit 60 µl Avidin-Lösung (5 mg/ml, aus Hühnereiweiß, Sigma) versetzt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Säule mit Strep-Tactin-Sepharose (2 ml Bettvolumen, IBA) gegeben, die zuvor mit einer Fritte abgedeckt und mit 10 ml Puffer W150 äquilibriert worden war. Nach Waschen mit 2 x 10 ml Puffer W300 wurde spezifisch gebundenes Protein mit 6 x 1 ml Puffer E eluiert. Die Säule wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 ml Puffer R regeneriert und bei 4 °C gelagert. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 10 µl mit jeweils 100 µl Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung zeigte an, ob die Fraktion Protein enthielt oder nicht. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Schelder (2008) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.9.8 TEV-Protease-Verdau**

Die TEV-Protease ist ein 28 kDa großes Nuclear Infusion a (NIa) Protein aus tobacco etch virus (TEV), deren Erkennungssequenz ENLYFQG ist. Die TEV-Protease schneidet zwischen Q und G in dieser Sequenz und wird für die Abspaltung der Tags in den Fusionsproteinen eingesetzt. Vor dem Verdau wurde die Substrat-Proteinlösung, die mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt wurde (s. 2.9.6) aufkonzentriert (s. 2.9.10) und anschließend 1:40 mit TN-Puffer verdünnt, um eine Imidazolkonzentration von 5 mM zu erreichen. Es wurde 1 mg der TEV-Protease pro 10 mg des Substrats eingesetzt. Nach der Inkubation mit der TEV-Protease für max. 22 h wurde die Proteinlösung erneut einer Ni-NTA-Chromatographie unterzogen. Alle His-Tag-haltigen Fragmente sowie die TEV-Protease, die ebenfalls ein His-getagtes Protein ist, banden an das Säulenmaterial und die saubere Proteinlösung wurde aufgefangen. Um auch das gewünschte Protein ohne His-Tag, das unspezifisch gebunden wurde, von der Säule zu entfernen, wurde mit 20 ml TNi20-Puffer gewaschen.

Dabei wurde der Proteingehalt in allen aufgefangenen Fraktionen quantitativ untersucht, indem 100  $\mu$ l Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima) mit 10  $\mu$ l der aufgefangenen Fraktion versetzt wurden. Soweit eine Farbentwicklung festzustellen war, enthielten die Proben noch das gewünschte Protein. Die Imidazolkonzentration von 20 mM reichte aus, um die unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu entfernen, war aber für die Elution der His-Tag-haltigen Proteine bzw. Proteinfragmente zu niedrig. Alle Fraktionen mit Tag-freiem Protein (der Durchlauf und die Fraktionen nach dem Waschschrift mit TNI20) wurden vereint und für weitere Anwendungen aufkonzentriert. Die His-Tag-haltigen Fragmente wurden von der Ni-NTA-Säule mit Strip-Puffer entfernt. Die Säule wurde bei 4 °C gelagert. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Schuplezow (2009) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.9.9 Größenausschlusschromatographie**

Die Homogenität und Reinheit von Proteinen, die für Kristallisationsansätze eingesetzt werden sollten, wurden durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Hierfür wurde aufgereinigtes Protein mittels einer HiLoad 16/60 Superdex™ 200 prep grade-Säule (Amersham Biosciences), welche an ein Äkta Explorer-System (Amersham Biosciences) angeschlossen war, der Größe nach aufgetrennt. Die Säule wurde zuvor mit 20 mM Tris-HCl-Puffer + 0,05% (w/v) DDM, pH 7,0 für CopS-Derivate in voller Länge oder 20 mM Tris-HCl-Puffer + 50 mM NaCl, pH 7,0 für N<sub>GH</sub>CopR und lösliche CopS-Derivate äquilibriert. Für die Bestimmung der Homogenität der Probe wurden 3 bis 12 mg Protein in 1 ml des jeweiligen Puffers auf die Säule aufgetragen und bei 4 °C mit einer Flussrate von 1 ml/min von der Säule mit demselben Puffer, der auch für die Äquilibrierung der Säule verwendet wurde, eluiert. Die Säule wurde zuvor mit einem Protein Molekulargewichtsmarker (MWGF-200, Sigma) kalibriert. Dafür wurden 20 mg Albumin, 10 mg der Alkohol-Dehydrogenase, 8 mg Amylase, 6 mg Carboanhydrase und 4 mg Cytochrom c in je 1 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 gelöst und einzeln chromatographisch aufgetrennt. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Schuplezow (2009) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.9.10 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen**

Zur Aufkonzentrierung wurden die Proteinlösungen mittels Amicon Ultra 4 bzw. 15 (Millipore) mit einem MWCO von 100000 für CopS-Derivate in DDM-Micellen und 10000 für lösliche CopS-Derivate und N<sub>GH</sub>CopR durch 10- bis 40-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3363 g auf das gewünschte Volumen reduziert.

### **2.9.11 Proteinidentifizierung mittels MALDI-ToF-MS Analyse**

Für Peptidmassen-Fingerprint-Analysen wurden Proteinbanden aus Coomassie-gefärbten SDS-Acrylamidgelen ausgeschnitten und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis and Langen, 1997). Hierzu wurden die Gelstückchen zweimal 10 min mit 750 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30% (v/v) Acetonitril gewaschen, 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 6 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 mit 10 ng/µl Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 6 µl 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 ohne Trypsin zugegeben und die Proben 10 min bei RT verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 10 µl bidest. Wasser und 15 min Inkubation bei RT, sowie Zugabe von 10 µl 0,2% (v/v) Trifluoressigsäure in 30% (v/v) Acetonitril und 10 min Inkubation bei RT eluiert. Gegebenenfalls wurden die Peptide mittels ZipTip C18 standard bed (Millipore) nach Angaben des Herstellers entsalzt und konzentriert. Anschließend wurden die Proben auf eine Prespotted AnchorChip-Platte (Bruker Daltonics), die bereits eine α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)-Matrix und einen Kalibrierungsstandard enthält, aufgetragen. Die MALDI-ToF-MS/MS-Messungen wurden mit einem Ultraflex MALDI-ToF/ToF-Massenspektrometer III (Bruker Daltonics) im positiven Reflektormodus und einem Beschleunigungspotential von 26,3 kV durchgeführt. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mit Hilfe des Programms BioTools 3.1 des MASCOT-Servers (Matrix Science) und der MASCOT-Software (Perkins *et al.*, 1999) mit der NCBI-*glutamicum*-Protein-Datenbank verglichen. Beim Peptidmassenvergleich mittels der MASCOT-Software sowie mittels des MS-Fit-Programms wurden ein missed cleavage beim Trypsinverdau, eine Carbamidomethylsubstitution am Cystein als feste Modifikation, eine Oxidation von Methionin sowie Phosphorylierungen von Serin- und Threonin-Resten als variable Modifikationen und eine Abweichung von 200 ppm zugelassen. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn ein MOWSE-Score (Molecular Weight Search, Molmassensuche)  $\geq 50$  erhalten wurde (Pappin *et al.*, 1993). Weiterhin konnten mit dem Ultraflex MALDI-ToF/ToF-Massenspektrometer III mittels MS/MS-Methode einzelne tryptische Peptide selektiert und weiter fragmentiert werden, um die Aminosäuresequenz des ausgewählten Peptids (*parent ion*) abzuleiten. Dazu wurde die entsprechende Probe mit hoher Laserenergie verdampft und ionisiert. Nach Beschleunigung der ionisierten tryptischen Peptide wurden diese über eine kurze Strecke aufgetrennt und im Anschluss konnte mit Hilfe eines kurzzeitig aussetzenden Gegenfeldes das *parent ion* selektiert werden. Aufgrund der hohen Laserenergie, die zum Verdampfen der Probe verwendet wurde, zerfallen die tryptischen Peptide während des Fluges (Laser-Induced-Dissociation, LID). Um diese entstandenen Ionen voneinander zu trennen, folgte anschließend deren Beschleunigung in der LIFT-Einheit (Lift-Technik = Post-Akzeleration von fragmentierten Ionen) (Suckau *et al.*, 2003). Die Ionisierungsspannung betrug in diesen Fällen 8,0 kV, die Lift-Spannung 19 kV und die Reflektorspannung 29,5 kV. Bei der Zuordnung und Bewertung der erhaltenen Spektren wurde eine

MS/MS-Toleranz von 0,5 Da zugelassen. Ein Protein galt als identifiziert, wenn die MASCOT-Datenbanksuche einen Kandidaten als signifikant ( $p < 0,05$ ) betrachtete. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Krawczyk (2011) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.9.12 Bestimmung der Proteinstabilität von CtaD<sub>St</sub>

Um die Proteinstabilität von CtaD<sub>St</sub> zu bestimmen, wurden die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta$ ctaD/pJC1-CtaD<sub>St</sub> und  $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699/pJC1-CtaD<sub>St</sub> in BHI-Medium mit 2% (w/v) Glucose mit 25  $\mu$ g/ml Kanamycin bei 30 °C und 170 Upm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden mehrere 50 ml-Hauptkulturen im gleichen Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Die Synthese von plasmidkodiertem CtaD<sub>St</sub> unterlag der Kontrolle des nativen Promotors und bedarf keiner Induktion. Nach 5 h Kultivierung wurde sowohl die Transkription mit 250  $\mu$ g/ml Rifampicin als auch die Translation mit 100  $\mu$ g/ml Tetracyclin in allen Kulturen gehemmt. Bis 100 min nach Zugabe der Hemmstoffe wurden im 30-min-Takt je eine 50 ml-Kultur geerntet (20 min bei 5467 g, 4 °C) und bei -20 °C gelagert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, in je 8 ml TE-Puffer resuspendiert und mittels French-Press-Zelle (SLM AMINCO Spectronic Instruments) aufgeschlossen. Danach folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 5467 g, 4 °C, der Überstand wurde bei der Ultrazentrifugation (1 h, 180000 g, 4 °C) in zwei Fraktionen getrennt: die sedimentierten Membranproteine und cytosolische Proteine im Überstand. Die Membranproteinfraktion wurde in 500  $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Methode bestimmt und darauf basierend wurden Proben für SDS-PAGE hergestellt, die alle ungefähr die gleichen Proteinmengen enthielten. Die Denaturierung der Proteine vor der SDS-PAGE-Analyse erfolgte schonend bei 50 °C für 30 min, anschließend wurden die Proben auf zwei SDS-PAGE-Gele geladen, ein Gel wurde nach der SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie (Rapid Stain™, Bioscience) gefärbt, um die Menge der geladenen Proteinlösungen untereinander vergleichen zu können, das zweite Gel wurde einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion des CtaD<sub>St</sub>-Proteins erfolgte mit dem Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (IBA) (2.9.5). Die Methodenbeschreibung wurde aus Schweitzer (2007) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.10 DNA-Microarray-Technologie

Die DNA-Microarray-Technik dient dazu, die relativen mRNA-Spiegel von tausenden Genen gleichzeitig bestimmen zu können. Die hierbei verwendeten DNA-Microarrays sind Glas-Objektträger, auf denen entweder PCR-Produkte oder synthetisch hergestellte Oligonukleotide gespottet werden können, an denen dann cDNA hybridisieren kann. Die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*

DNA-Microarrays wurden von der Firma Operon Biotechnologies hergestellt. Auf einem DNA-Microarray werden neben 3057 Protein-kodierenden Genen 1294 intergenische Regionen, 60 tRNA-Gene, 15 rRNA Gene und 140 Oligonukleotide für positive und negative Kontrollen gespottet. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen.

### **2.10.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden**

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen (25 µg) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ( $\lambda_{\text{Absorption max}}$  550 nm,  $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$  570 nm, grün, Amersham Biosciences) und Cy5-dUTP ( $\lambda_{\text{Absorption max}}$  649 nm,  $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$  670 nm, rot, Amersham Biosciences) verwendet. Die RNA (25 µg Gesamt-RNA in 14 µl Wasser gelöst) wurde mit 1 µl einer 500 ng/µl Zufallshexanukleotid-Primer-Lösung (in bidest. Wasser gelöst, Amersham Biosciences) inkubiert (65 °C, 10 min) und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Die reverse Transkription wurde in einem Puffer durchgeführt, der 0,1 mM Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,2 mM dTTP und 400 U Superscript-II Reverse Transcriptase (Invitrogen) enthielt (Wendisch *et al.*, 2001). Der 30 µl Ansatz wurde 10 min bei RT und anschließend 110 min bei 42 °C inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde die RNA durch Zusatz von 10 µl NaOH (0,1 N) 10 min bei 65 °C hydrolysiert. Die Lösung wurde mit 10 µl HCl (0,1 N) neutralisiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Ultrazentrifugationseinheiten (Microcon YM-30, Millipore). Der 50 µl Ansatz wurde mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und durch Zentrifugation (10 min, 13800 g) zweimal auf etwa 20 µl eingengt. Danach wurden die für eine Hybridisierung vorgesehenen Cy3- bzw. Cy5-markierten Sonden vereinigt und es erfolgte, wie oben beschrieben, eine weitere Ultrafiltrationszentrifugation (10 min, 13800 g). Die so erhaltene cDNA-Sonde (5 µl) wurde sofort für die DNA-Chip-Hybridisierungen eingesetzt. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.10.2 Prähybridisierung**

Es wurde zuerst getestet, ob der Chip Mängel in Form von Kratzern oder schlechtem Spotting aufwies. Dafür wurde der Chip bei Wellenlängen von 532 nm und 635 nm mit einer Verstärkung von je 600 PMT mit dem GenePix<sup>TM</sup> 4000 B Laser Scanner (Axon Instruments) gescannt. Die SDS-enhaltende Prähybridisierungslösung (Hybridisierungs-Kit, Operon) wurde auf 42 °C vorgewärmt, 50 ml dieser Lösung wurden in ein Falcon steril filtriert und der Chip 1 h in der Lösung geschwenkt. Die Prähybridisierung ist notwendig, um auf dem Chip unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Nach 1 h wurde der Chip 5 min in Wash 1 (1,25 ml OpArray Wash B, Operon) in 50 ml bidest. Wasser, sterilfiltriert) bei 37 °C geschwenkt. Anschließend wurde der Chip 5 min im vorgewärmten bidest. Wasser gewaschen, um die Prähybridisierungslösung mit SDS zu entfernen. Nach dem Schwenken im Wasser musste der Chip schnellstmöglich in ein 50 ml-Falcon überführt und durch Zentrifugieren getrocknet werden. Dazu wurde 5 min bei 521 g zentrifugiert. Nun wurde der Chip wiederum gescannt, wobei der Hintergrund kleiner 600 sein sollte und möglichst keine grünen Schlieren vom SDS mehr vorhanden sein sollten. Bis zur Hybridisierung wurde der Chip in einem Exikator gelagert. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.10.3 Hybridisierung**

Zu den vereinigten und aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden (5 µl) wurden 50 µl Hybridisierungspuffer (OpArray Hyb Solution, Operon) hinzugefügt, für 3 min bei 95 °C denaturiert und auf 42 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Chips auf dem DC-Mixer fixiert und die Sonden aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte in einer speziellen Hybridisierungskammer (MAUI®, BioMicro® Systems) für 16 - 17 Stunden bei 42 °C. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.10.4 Posthybridisierung**

Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte cDNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen der DNA-Chips für 10 min bei 42 °C in Wash 2 (5 ml OpArray Wash A und 2,5 ml OpArray Wash B, Operon, ad. 50 ml bidest. Wasser), 10 min bei 37 °C in Wash 3 (10 ml OpArrayWash A, ad 50 ml bidest. Wasser) und 5 min bei RT in Wash 4 (100 µl OpArrayWash A ad 50 ml bidest. Wasser), jeweils unter Ausschluss von Licht. Durch Zentrifugation (5 min, 521 g, RT) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### **2.10.5 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen**

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

1996). Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenePix 4000 A Laser Scanner (Axon) verwendet. Die DNA-Chip-Oberfläche (10 x 10 µm Raster) wurde zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppen mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen bestrahlt, eine zur Anregung von Cy3-dUTP (532 nm) und die andere für Cy5-dUTP (635 nm), und die daraufhin emittierte Fluoreszenz wurde mit lichtempfindlichen Kathoden bei 570 nm (Cy3-Fluoreszenz) und bei 670 nm (Cy5-Fluoreszenz) registriert. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird. Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16 bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert (GenePix Pro 6.0 Software). Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die GenePix Array List (erstellt von Dr. T. Polen) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *C. glutamicum*-Gen bzw. zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen (genomische *C. glutamicum*-DNA,  $\lambda$ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *E. coli*). Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen.

### **2.10.6 Normierung und statistische Analyse von DNA-Microarray-Daten**

Die Berechnung des Verhältnisses von Signal zu Rauschen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten  $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{Spotintergrund}}$ . Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis sowohl für die Cy3- als auch für die Cy5-Fluoreszenz kleiner als fünf war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um die durch die Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Microarray-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen *et al.*, 1998). Die Normalisierung erfolgte für jeden DNA-Chip anhand des Cy3-/Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisses von chromosomaler *C. glutamicum*-DNA. Dazu wurde aus den Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnissen aller auswertbaren Spots mit genomischer DNA (insgesamt 196) der Mittelwert bestimmt. Der Kehrwert dieses Mittelwerts diente als Korrekturfaktor zur Normalisierung. Bei Multiplikation des Korrekturfaktors mit dem experimentellen bestimmten Mittelwert für das Fluoreszenz-Verhältnis von chromosomaler DNA ergibt sich das theoretisch erwartete Verhältnis von 1 (Eisen *et al.*, 1998). Die Verhältnisse aller Gen-spezifischen Spots wurden dann mit diesem Korrekturfaktor multipliziert (Khodursky *et al.*, 2000). Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze, erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die

Berechnung von  $p$ -Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, EXCEL 2000, Microsoft). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky *et al.*, 2000). Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit  $p$ -Werten  $>0,05$  wurden als statistisch nicht signifikant verändert betrachtet. Die Methodenbeschreibung wurde aus Brocker (2006) übernommen.

### 2.10.7 Archivierung von DNA-Microarray-Daten

Zur Verwaltung und Archivierung von DNA-Microarray-Daten wurde die für das Computer-Betriebssystem Linux frei erhältliche relationale Datenbank MySQL verwendet (MySQLAB <http://www.mysql.com>). Die DNA-Microarray-Daten, Fluorogramme sowie die relevanten Informationen zur Kultivierung der Zellen, RNA-Isolierung etc. wurden entsprechend des MIAME-Standards erfasst und auf dem Linux- Zentralrechner des Instituts in einer MySQL-Datenbank hinterlegt, so dass sie über das institutsinterne Netzwerk für weitere Analysen zur Verfügung stehen (Polen and Wendisch, 2004). Die Methodenbeschreibung wurde aus Krug (2004) übernommen.

### 2.11 Analyse von Cytochromspektren

Zur Analyse von Cytochromspektren wurden Spektren intakter *C. glutamicum*-Zellen unter reduzierenden Bedingungen bzw. reduziert-minus-oxidiert Differenzspektren isolierter *C. glutamicum*-Membranen zwischen 540 und 650 nm bei Raumtemperatur mit einem Jasco V560 (Jasco) Spektrophotometer aufgenommen. Die Geräteeinstellungen waren: 40 nm/min Scangeschwindigkeit, 1 nm Bandbreite, slow response. Zur Messung trüber Proben (intakte Zellen und Membranen) in Küvetten mit 5 mm Schichtdicke wurde ein spezieller Siliziumphotodiodendetektor (Castiglioni *et al.*, 1997) eingesetzt. Die Aufnahme von reduziert-Spektren intakter Zellen erfolgte bei einer  $OD_{600}$  von 100 nach Zugabe von einigen Kristallen Natriumdithionit. Für die Analyse von Cytochromen in den isolierten Membranen wurde zunächst das reduziert-Spektrum nach Zugabe von einigen Kristallen Dithionit aufgenommen und anschließend das oxidiert-Spektrum nach Zugabe von festem Kaliumhexacyanoferrat(III). Die Methodenbeschreibung wurde aus Niebisch (2002) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie der Stämme  $\Delta ctaD/pVWEx2-CtaD_{NP}$ -mCitrine und  $\Delta cg2699/pEKEx2-cg2699-eCFP$  wurden die Zellen auf mit Agarose beschichtete Objektträger (ca. 1 mm Agarose-Schicht) pipettiert und mit dem entsprechenden Filter für CFP- oder YFP-Fluoreszenz

mikroskopiert. Die Mikroskopie erfolgte für  $\Delta ctaD/pVWEx2-CtaD_{NP}$ -mCitrine am Zeiss Axio Imager M2 Mikroskop (Zeiss) und für  $\Delta cg2699/pEKEx2-cg2699-eCFP$  wegen einer besseren Auflösung am Nikon Eclipse Ti Mikroskop (Nikon).

## **2.13 Röntgenstrukturanalyse der Sensorkinase CopS**

### **2.13.1 Proteinkristallisation**

Die Kristallisationsversuche wurden am Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Kooperation mit Prof. Dr. Georg Groth unter der Anleitung von Mariana Grieben und Dr. Daniel Schlieper durchgeführt. Die Proteinkristallisation ist ein Prozess, bei dem die Proteine kontrolliert aus der Lösung abscheiden und die einzelnen Proteinmoleküle sich in eine geordnete Kristallstruktur einordnen. Dabei sind äußere Bedingungen kritisch, denn für die Proteinkristallisation ist es essenziell, dass die Proteine nicht als Präzipitat ausfallen, sondern ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften beibehalten und in einer klar geordneten Struktur gepackt werden. Zur Kristallisation diverser CopS-Derivate wurden verschiedene Methoden mit kommerziell erworbenen Kits getestet. Hierzu wurde das Protein auf eine Konzentration von 3,5 mg/ml bis 24 mg/ml aufkonzentriert und wenn nicht anders angegeben in 20 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 0,05% (w/v) DDM für die Kristallisationsansätze eingesetzt. Die Proteinlösung wurde vor der Verwendung für die Kristallisationsansätze abzentrifugiert und mit 0,01% (w/v) Natriumazid und 0,001% (w/v) PMSF versetzt zum Vermeiden von Pilz-Bewuchs bzw. von Protein-Abbau durch Proteasen.

Microbatch:

Bei dieser Kristallisationsmethode wird das Protein mit der Kristallisationslösung gemischt und unter einer Ölschicht inkubiert. Dies erlaubt minimale bis keine Wasser-Verdunstung (Chayen *et al.*, 1990). Hierzu wurden Greiner IMP@CT 96-well-Platten oder Greiner 72-well Microbatch-Platten (Hampton Research) verwendet. Die Kristallisationslösungen aus den Kits JBScreen Membrane 1 - 3 (Jena Bioscience), MemStart™&MemSys™ HT-96 (Molecular Dimensions) und MbClass and MbClass II Suit (Qiagen) für membrangebundene CopS-Derivate und die Kits Classics Suite, Classics Suite II, PEGs Suite und PEGs II Suite (Qiagen) für lösliche CopS-Derivate wurden getestet, indem 1 µl Kristallisationslösung mit 1 µl Proteinlösung gemischt und mit einem Ölfilm (Mineralöl, Sigma) überschichtet wurden, sodass eine Verdunstung kaum möglich ist. Die Platten wurden in 4 °C-, 15 °C- und 25 °C- Inkubatoren (Molecular Dimensions) gelagert und in regelmäßigen Abständen auf die Kristallbildung überprüft. Sobald eine geeignete Bedingung gefunden wurde, um darin Proteinkristalle zu züchten (initiale Bedingung), erfolgten weitere Optimierungen. Es wurden pH-Werte (in 0,2 Schritten), Proteinkonzentration und PEG-Konzentration (in 1% Schritten) systematisch

verändert. Die Proteinkonzentration wurde wenn möglich erhöht. Darüber hinaus wurde die geeignete initiale Bedingung mit diversen Additiven aus dem Additive Screen (Hampton Research) getestet.

Evaporationsmethode:

Im Gegensatz zu Microbatch-Kristallisationsmethode basieren die Methoden *sitting drop* und *hanging drop* auf dem Prinzip der Evaporation. Dabei wird Wasser aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen aus dem Kristallisationsansatz (die Kristallisationslösung wird mit der Proteinlösung verdünnt) verdrängt. Die Proteinlösung wird dadurch eingeengt, sodass auf die Proteine Kräfte wirken, die die einzelnen Moleküle in räumliche Nähe bringen und somit eine geordnete Kristallbildung begünstigen (McPherson, 1985). Die beiden Methoden unterscheiden sich in der Position des Protein-haltigen Tropfens: bei der *sitting drop*-Methode wird der Tropfen auf einem Podest „sitzend“ positioniert und bei der *hanging drop*-Methode hängt der Tropfen am Deckel über dem Reservoir mit Kristallisationslösung. Für die Kristallisation als *sitting drop* wurden die 96-well NeXtal Evolution Platten verwendet (Qiagen). Dabei betrug die Reservoir-Lösung 70  $\mu\text{l}$ , wobei 1  $\mu\text{l}$  der Reservoir-Lösung mit 1  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung auf dem Podest gemischt wurde. Die Platten wurden anschließend mit einer Schutzfolie abgeklebt, um eine unkontrollierte Verdunstung zu verhindern. Die Platten wurden bei 15 °C und 25 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen beobachtet. Hierbei wurden folgende Kits verwendet: JBScreen Membrane 1 - 3 (Jena Bioscience), MemStart™ & MemSys™ HT-96 (Molecular Dimensions) und MbClass and MbClass II Suit (Qiagen) für membran gebundene CopS-Derivate und die Kits Classics Suite, Classics Suite II, PEGs Suite und PEGs II Suite (Qiagen) für lösliche CopS-Derivate. Sobald eine geeignete Kristallisationsbedingung gefunden wurde, erfolgten Optimierungen der jeweiligen Parameter (pH, PEG-Konzentration, Proteinkonzentration und Zugabe von Additiven). Für die *hanging drop*-Methode wurden die EasyXtal 15-well Platten verwendet (Qiagen), die Reservoir-Lösung betrug 400  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  der Reservoir-Lösung wurde mit 1  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung auf dem Deckel vermischt und behutsam umgedreht und an das Reservoir angeschraubt. Die Platten wurden bei 15 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen beobachtet. Aufgrund des geringeren Durchsatzes mit den 15-well Platten wurde diese Kristallisationsmethode nur bei den Optimierungsschritten der initialen Bedingungen als eine Variation der Kristallisationsparameter verwendet.

*Lipidic sponge phase:*

Diese Methode wurde von der *lipidic cubic phase*-Kristallisationsmethode für Membranproteine abgeleitet. Dabei imitiert die Lipid-haltige Kristallisationslösung die biologischen Membranen und begünstigt die Kristallisation von Membranproteinen (Landau and Rosenbusch,

1996). Die *lipidic sponge phase*-Kristallisationsmethode ist aufgrund des erhöhten Anteils an aquatischen Poren in der Lipid-haltigen Umgebung besonders gut für Membranproteine mit großen löslichen Domänen geeignet (Engström *et al.*, 1998). Es wurde das Kit Lipidic-Sponge Phase™ Screen MD (Molecular Dimensions) nach Angaben des Herstellers und Entwicklers (Wöhri *et al.*, 2008), verwendet. Dazu wurden die EasyXtal 24-well Platten (Qiagen) für *hanging drop*-Ansätze genutzt, die Reservoir-Lösung betrug 400 µl, der Tropfen enthielt 1 µl Proteinlösung und 1 µl der kurz davor auf 50 °C erwärmte und abgekühlte *lipidic sponge phase*-Lösung. Die Platten wurden bei 21 °C über mehrere Wochen inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf Phasentrennung bzw. Kristallbildung mikroskopisch untersucht.

Verwendung der Lipopeptid-Detergenzien:

Aufgrund der hohen Hydrophobizität der Transmembranhelices können die Membranproteine ohne die Anwesenheit von Detergenzien, die die hydrophoben Bereiche schützen und eine Protein-Detergenz-Micelle (hier: Protein-DDM-Micelle) bilden, nicht in Lösung gebracht werden. Bei der Kristallisation kann das Detergenz jedoch störend sein, und es können die Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Micelle gestört sein, die für eine Kristallpackung notwendig sind. Um dies zu umgehen, wurde das Detergenz in den Protein-DDM-Micellen gegen ein Lipopeptid-Detergenz LPD-12 (Calbiochem/EMD, Millipore) ausgetauscht. Die sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Eigenschaften des LPD-12 erlauben es, die Integrität der Membranproteine zu erhalten und gleichzeitig die Micellen-Hülle gegen eine LPD-Micelle (23 kDa) zu ersetzen (McGregor *et al.*, 2003, Prive, 2009). Die aufgereinigten Proteine in DDM-haltigen Puffern wurden in den Aufkonzentratoren Amicon Ultra 4 (Millipore) mit einem MWCO von 10000 bei 4 °C und 3363 g mit dem LPD-haltigen Puffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,0) auf 1 ml eingengt. Dabei betrug das LPD: Protein-Verhältnis 20:1. Der Vorgang wurde zweimal durchgeführt und anschließend wurde die Protein-LPD-Lösung erneut mit einem Detergenz-freien Puffer aufgefüllt und aufkonzentriert (5 Mal, 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,0). Dadurch wurden alle restlichen DDM-Detergenzien aus der Lösung entfernt (Prive, 2007). Die Proteine in den LPD-Micellen wurden auf eine gewünschte Konzentration eingengt und direkt für die Kristallisationsansätze eingesetzt.

### **2.13.2 Messung der Röntgenbeugungsmuster von Proteinkristallen**

Die gezüchteten Kristalle wurden daraufhin überprüft, ob es sich um Proteinkristalle handelt oder nicht. Hierzu wurde meistens der IZIT-Farbstoff (Hampton Research, 1:10 verdünnt mit der Kristallisationslösung) verwendet. Wenn eine intensive Blaufärbung im Kristall beobachtet wurde, handelte es sich um ein Proteinkristall. Wenn die Kristallpackung sehr dicht war, konnten keine Farbstoff-Moleküle in das Kristall eindringen. Dies deutete darauf hin, dass es sich um ein Salzkristall

handelt. Eine andere Methode, die Kristalle zu überprüfen war, diese mit einer sehr dünnen Nadel zu picken. Wenn ein Kristall sehr leicht nachgab und bei der ersten Berührung zerstört wurde, war das ein Hinweis, dass dieser Kristall ein Proteinkristall war. Wenn der Kristall jedoch erst nach mehreren Versuchen zerstört wurde und dabei ein lautes Geräusch zu hören war, deutete es auf einen Salzkristall hin. Die Proteinkristalle wurden zur ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble, Frankreich mitgenommen und an der Beamline ID14-4 mit dem Detektor ADSC Q315r CCD gemessen. Die Montierung der Kristalle in die Cryo-Loops und Messung am ESRF wurden von Dr. Astrid Höppner durchgeführt, die Auswertung der gesammelten Daten erfolgte durch Dr. Daniel Schlieper.

## 2.14 Festkörper-NMR mit rekonstituierter Sensorkinase-CopS

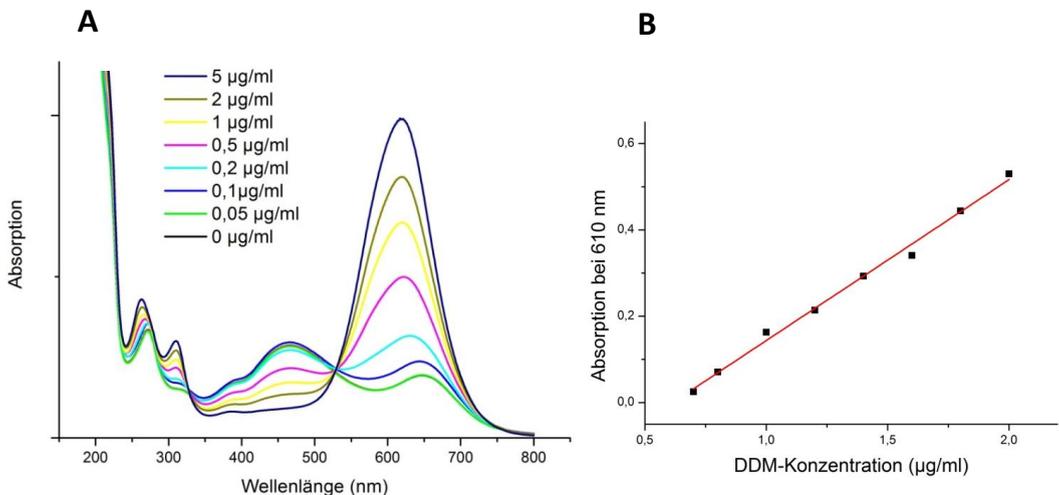
### 2.14.1 Rekonstitution von N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub> in *E. coli*-Liposomen

Zur Präparation der Liposomen wurden zunächst *E. coli*-Phospholipide (polar lipid extract, 20 mg/ml in Chloroform, Avanti polar lipids) im Rotationsverdampfer eingedampft. Anschließend wurde die Probe über Nacht lyophilisiert und in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 auf eine Endkonzentration von 20 mg/ml eingestellt. Die Proben wurden in 500 µl Aliquots separiert, mit Stickstoff überschichtet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Möker *et al.*, 2007). Die Liposomen wurden bei -80 °C gelagert. Das gereinigte CopS-Derivat N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub> (His-Tag-freies NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>) wurde wie im Folgenden beschrieben rekonstituiert (Rigaud *et al.*, 1995, Etzkorn *et al.*, 2008, Ostuni *et al.*, 2010). Die *E. coli*-Liposomen wurden durch schrittweise Zugabe von 20% (v/v) Triton X-100 (in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5) solubilisiert. Dabei wurde ein Lipid : Triton X-100 Verhältnis (R<sub>eff</sub>-Koeffizient, Rigaud *et al.*, 1995) von 1,3 eingehalten. Direkt nachdem die Liposomen-Suspension klar wurde, wurden die Liposomen 30 min bei RT geschüttelt (300 Upm). Nach der Inkubation wurde die Sensorkinase (12 mg) in einem Verhältnis von Lipid zu Protein von 5 : 1 (w/w) hinzugegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Zum Entfernen der Detergenzien wurden Bio-Beads (BioRad) in einem Verhältnis von 5 : 1 (Bio-Beads : Triton X-100 (w/w)) hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei leichtem Schütteln 1 h bei RT inkubiert bevor die zweite Zugabe der gleichen Menge an Bio-Beads erfolgte und die Probe eine weitere Stunde bei RT bei leichtem Schütteln inkubiert wurde. Anschließend folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag folgte eine weitere Zugabe der fünffachen Menge an Bio-Beads und Inkubation für 1 h bei RT. Nach dem Entfernen der Bio-Beads wurden die Proteoliposomen 50 min bei 4 °C und 180000 g durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Die sedimentierten Proteoliposomen wurden zweimal mit Membranpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10% (v/v) Glycerin) gewaschen (180.000 g, 4 °C, 40 min) und anschließend in 400 µl Membranpuffer resuspendiert. Vor

der Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Proteoliposomen im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei RT aufgetaut. Dieser Frieren-und-Tauen-Vorgang, der zu Stabilisierung der Proteoliposomen dienen sollte, wurde dreimal wiederholt. Vor der Festkörper-NMR-Messung wurden die Proteoliposomen aufgetaut, durch Ultrazentrifugation ( $180000\text{ g}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $40\text{ min}$ ) sedimentiert, der Überstand abgenommen und die sedimentierten Proteoliposomen wurden mit einem kleinen Spatel direkt in den Rotor gegeben. Die Methodenbeschreibung sowie die Puffer-Zusammensetzung wurden aus Schelder (2008) übernommen. Wenn nötig wurden die relevanten Parameter entsprechend der Versuchsdurchführung geändert und ggf. ergänzt.

### 2.14.2 Bestimmung von DDM-Konzentration

Für eine Bestimmung der Abnahme der DDM-Konzentration bei der Rekonstitution von  $N_{\text{GHM}}\text{COP}_{\text{S}206}$  wurde die Eigenschaft des Detergenz genutzt, eine farbliche Reaktion bei Mischung mit Bradford-Lösung hervorzurufen. Daher eignet sich die Bradford-Methode nicht zur Bestimmung der Proteinkonzentration in DDM-haltigen Lösungen. Für die Ermittlung der Wellenlänge, bei der die DDM-Konzentration messbar ist, wurde ein Spektrum von DDM-Konzentrationen zwischen  $0\text{ }\mu\text{g/ml}$  und  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  im gewünschten Puffer zwischen  $200$  und  $800\text{ nm}$  aufgenommen (Jasco V560, Jasco). Dabei wurde die Wellenlänge von  $610\text{ nm}$  ermittelt, bei welcher die größten Unterschiede für verschiedene Konzentrationen zu erkennen waren (Abb. 5A).



**Abbildung 5:** Spektren der DDM-haltigen Proben zur Ermittlung einer Wellenlänge, bei der der Unterschied in der Absorption am stärksten ist. 1 ml Bradford-Reagenz wurde mit verschiedenen Volumina an 10% (w/v) DDM-Lösung versetzt, sodass die Endkonzentrationen zwischen 0 und  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  lagen (A). Die Ausgleichgerade zur Bestimmung der DDM-Konzentration im linearen Bereich zwischen  $0,7\text{ }\mu\text{g/ml}$  und  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  DDM wurde für die Absorptionswerte bei der Wellenlänge von  $610\text{ nm}$  erstellt (B).

Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Detergenzkonzentration und der gemessenen Absorption wurde für den DDM-Konzentration-Bereich zwischen 0,7 und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  festgestellt (Abb. 5B). Zur Bestimmung der DDM-Konzentration in Proteoliposomen-Proben wurde das Protein mit Methanol gefällt und abzentrifugiert (Ostuni *et al.*, 2010). Der Überstand wurde für 10 min mit Bradford-Reagenz inkubiert und anschließend die Absorption bei 610 nm gemessen. Zu Erstellung einer Kalibriergerade dienten frisch angesetzte DDM-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0 und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### 2.14.3 Saccharose-Dichtegradient

Die Überprüfung einer erfolgreichen Rekonstitution von  $\text{N}_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$  in die *E. coli*-Liposomen erfolgte mittels eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten. Es wurden sterilfiltrierte Saccharose-Lösungen (400  $\mu\text{l}$  von 45%-iger und je 200  $\mu\text{l}$  von 20%-, 10%- und 5%-iger (v/v) Saccharose-Lösung in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) in 2 ml UZ-Röhrchen in Schichten mit abnehmender Konzentration vorbereitet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Schichten sich nicht miteinander vermischen. Die trübe Probe mit Proteoliposomen wurde auf die obere 5%-ige Saccharose-Schicht gegeben und 2 h bei langsamer Beschleunigung und Abbremsung bei 4 °C und 180000 *g* ultrazentrifugiert. Dabei wurden spezielle Keramik-Einsätze mit Deckel für 2 ml-Röhrchen für den 70.1 Ti-Rotor (Beckman Coulter) verwendet. Nach der Zentrifugation wurde der Inhalt des Röhrchens mit der Pipette vorsichtig abgenommen und aliquotiert, die Fraktionen mit einer trüben Färbung wurden notiert. Alle Fraktionen wurden einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen (s. 2.9.4) und auf Proteingehalt untersucht. Eine erfolgreiche Rekonstitution konnte dann festgestellt werden, wenn die Fraktionen mit einer sichtlichen Trübung (Lipide) mit den Protein-haltigen Fraktionen korrelierten.

### 2.14.4 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Henrike Heise, ICS-6, Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Dazu wurden Proteoliposomen mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertem  $\text{N}_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$  eingesetzt. Die Proteoliposomen wurden mit einem kleinen Spatel in einen 4 mm Rotor gefüllt, wobei zwischendurch kurze Zentrifugationsschritte erfolgten, um eine möglichst große Menge der gelartigen Probe in den Rotor zu füllen. Membrangebundene Proteine können in einer Membranumgebung nicht mit einer herkömmlichen NMR-Spektroskopie untersucht werden, weil Proteine in der Membran nicht mit hinreichend hoher Geschwindigkeit rotieren können und daher die orientierungsabhängigen Wechselwirkungen wie dipolare Kopplungen zwischen den Kernen und die chemische Verschiebungsanisotropie nicht ausgemittelt werden können. Bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie wird das Problem der Anisotropie umgangen, indem der Rotor in

einem „magischen“ Winkel von  $54,7^\circ$  bezüglich des äußeren Magnetfelds positioniert und rotiert wird (MAS, magic angle spinning) (Mehring, 1983). Die Festkörper-MAS-NMR-Messung erfolgte bei  $-30^\circ\text{C}$  und einer Feldstärke von 14,1 T, was einer Protonen-Larmorfrequenz von 600 MHz entspricht. Es wurden  $^{13}\text{C}$ -Spindiffusions- und Doppelquantum-Korrelations-Experimente durchgeführt. Der Magnetisierungstransfer beider Methoden basiert auf den dipolaren Kopplungen zwischen Spins und erlaubt es, Wechselwirkungen zwischen räumlich benachbarten Kernen zu beobachten. Bei der Doppelquantum-Korrelation werden nur die stark gekoppelten Spins direkt gebundener Kohlenstoffatome innerhalb einer Aminosäure, wie  $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$  oder  $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$  miteinander korreliert. Eine Kombination der beiden Experimente liefert eine Möglichkeit, zwischen den intraresidualen und interresidualen NMR-Signalen zu unterscheiden. Darüber hinaus wurde die Probe bei exakt 9375 Hz rotiert, diese Rotationsgeschwindigkeit wurde aufgrund der Unterschiede in der chemischen Verschiebung zwischen den ausgemittelten  $\text{C}\alpha$ - und CO-Signalen bestimmt und ermöglicht eine Übertragung der Magnetisierung zwischen den interresidualen Spins (Rotationsresonanz) (Seidel *et al.*, 2004). Damit können Abstandsmessungen zwischen einzelnen Kernen durchgeführt und Sekundärstrukturelemente analysiert werden. Die Messungen und die Auswertung der Ergebnisse wurden von Dr. Santhosh Ayalur-Karunakaran und Prof. Dr. Henrike Heise durchgeführt.

## Ergebnisse

### 1. Strukturelle Untersuchungen der Sensorkinase CopS

Die Sensorkinase CopS aus dem Zweikomponentensystem CopSR ist für die Erkennung von erhöhten Kupferkonzentrationen und die Weiterleitung dieses Signals über die Membran in *C. glutamicum* verantwortlich (Schelder *et al.*, 2011). Es ist nicht bekannt, wie dieser Mechanismus abläuft und welche strukturellen Änderungen in der Sensorkinase CopS dazu führen, dass die Autophosphorylierung an dem konserviertem Histidin-Rest an Position 153 stattfindet. Die Sensorkinasen fungieren als Dimere, wobei der Phosphat-Rest von der HATPase\_c-Domäne eines Monomers auf den konservierten Histidin-Rest der HisKA-Domäne des anderen Monomers übertragen wird (Gao and Stock, 2009). Eine Strukturaufklärung des CopS-Proteins könnte dazu beitragen, den Mechanismus der Signalübertragung zu verstehen. Die Sensorkinase CopS weist eine Reihe von Vorteilen auf, die bei den strukturellen Studien nützlich sind: (i) das Protein lässt sich relativ gut heterolog überproduzieren, (ii) in großen Mengen reinigen und (iii) die Proteinlösung weist nach der Reinigung eine hohe Homogenität auf (bei der Gelfiltration erfolgt die Elution in einem einzigen Peak, Schuplezow, 2009). Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse könnte die Struktur der vollständigen CopS-Sensorkinase aufgeklärt werden. Eine mögliche Änderung der Struktur in Anwesenheit des putativen Effektors Kupfer könnte zum Verständnis der Dynamik innerhalb des Proteins beitragen, die bei der Signalerkennung bzw. Signalweiterleitung stattfindet. Bei der Festkörper-NMR-Analyse kann ebenfalls die Dynamik der Weiterleitung des Signals über die Membran erforscht werden. Dazu wird das in Proteoliposomen rekonstituierte CopS-Protein in An- und Abwesenheit des Effektors auf die Verschiebung von Aminosäuren in der Membran bzw. in den angrenzenden Domänen untersucht. In den vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass CopS sich erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituieren lässt (Schelder, 2008, Schuplezow, 2009). Für die Festkörper-NMR-Analyse ist jedoch die vollständige Sensorkinase CopS mit 399 Aminosäuren zu groß. Um eine Signalüberlappung der einzelnen Aminosäuren zu verhindern, sollte ein verkürztes CopS-Derivat identifiziert und eingesetzt werden, welches den membrangebundenen Teil enthält.

#### 1.1 Kristallisation von CopS für Röntgenstrukturanalyse

##### 1.1.1 Kristallisation von N<sub>GHM</sub>CopS

Für die Kristallisation der kompletten Sensorkinase CopS wurden zunächst große Mengen von Histidin-getaggetem CopS (NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS) in *E. coli* überproduziert und über eine Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde der His-Tag mittels der TEV-Protease abgespalten und das Tag-freie N<sub>GHM</sub>CopS-Protein erneut aufgereinigt. Im Anschluss daran wurde das

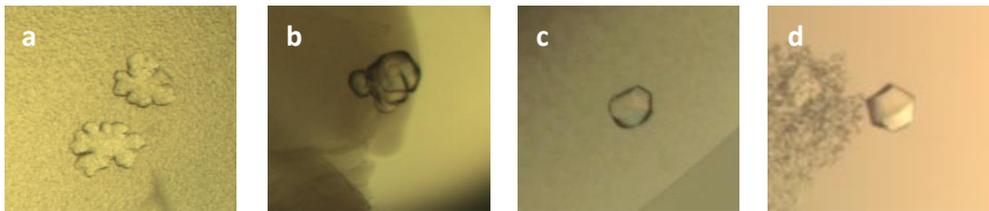
Protein mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie auf Homogenität untersucht und gleichzeitig in 20 mM Tris-HCl, pH 7,0 + 0,05% (w/v) DDM umgepuffert (für Details s. Material und Methoden 2.9.6, 2.9.8, 2.9.9 und 2.9.10). Nachdem das Protein von der Gelfiltrationssäule eluiert wurde, wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration zwischen 3,5 mg/ml und 24 mg/ml eingengt, in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Kurz vor den Kristallisationsansätzen wurde die benötigte Anzahl an Proteinaliquots schnell und schonend aufgetaut.

Die ersten Kristallisationsscreens (JBS-Membrane 1 – 3 (Jena Bioscience), MemStart™ & MemSys™ HT-96 (Molecular Dimensions) und MbClass and MbClass II Suit (Qiagen)) mit N<sub>GHM</sub>CopS ergaben vier initiale Bedingungen, in denen Kristalle gewachsen waren (genaue Zusammensetzung der Bedingungen s. Anhang, Tab. 6). Anschließende Optimierungsversuche dieser Kristallisationsbedingungen hinsichtlich bspw. der Pufferzusammensetzung, Zugabe von Additiven und einer anderen Kristallisationsmethode waren nur für eine Bedingung erfolgreich (A6 aus JBS-Membrane 1-3 Kristallisationskit (Jena Bioscience) in Microbatch, Abb. 6A-a). Die Ausgangskomposition der Kristallisationslösung war: 20% (w/v) PEG550 MME, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Variationen in der Inkubationstemperatur (15 °C, 20 °C, 25 °C), PEG-Konzentration (16 - 30%) und Proteinkonzentration (3, 5 und 10 mg/ml), pH (6,8 - 8,3) (für mehr Details s. Material und Methoden 2.13.1) führten zu keiner Verbesserung der anfangs beobachteten Kristalle. Die Zugabe des Additivs Dextransulfat (Endkonzentration in der Kristallisationslösung 0,075% (v/v), Additive-Kit, Hampton-Research) führte hingegen zu einer Verbesserung der Kristallform (Abb. 6A-b). Eine weitere Verbesserung der Kristallisation konnte durch Änderung der Kristallisationsmethode von Microbatch zu *hanging drop* erzielt werden. Dabei konnten am Rand des Kristallisationstropfens relativ große Einkristalle beobachtet werden (Abb. 6A-c).

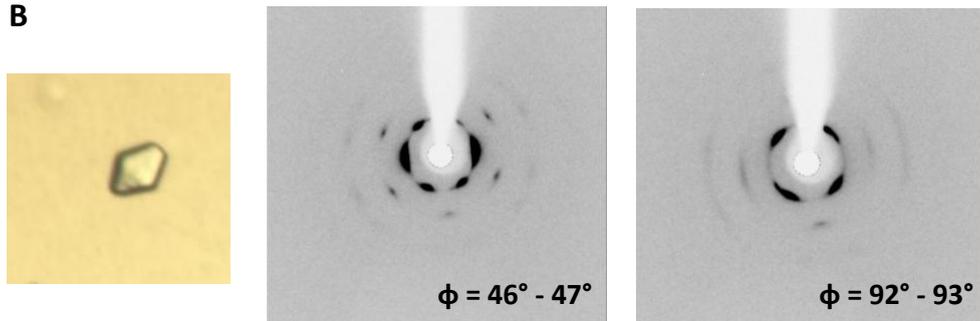
Es wurde beschrieben, dass die Kristallisation phosphorylierbarer Proteine durch Zugabe von ATP, ADP oder dem nicht hydrolysierbaren ATP-Analog AMP-PNP (Adenylyl-Imidodiphosphat) verbessert werden kann (Marina *et al.*, 2005 und Albanesi *et al.*, 2009). Die Zugabe von AMP-PNP zu der bereits optimierten Kristallisationsbedingung führte zur Bildung von Doppelkonus-förmigen Kristallen, welche bis zu 100 µm groß waren (Abb. 6A-d). Die genaue Zusammensetzung der optimierten Kristallisationsbedingungen (A6-b, -c und -d) ist im Anhang, Tab. A1 zusammengefasst.

Parallel zu den oben beschriebenen Screens und Optimierungen wurden alle Ansätze auch mit Kupfer (CuSO<sub>4</sub>) als potentiellm Liganden von CopS durchgeführt (zweifacher molarer Überschuss gegenüber dem Protein). Dabei konnten keine geeigneten Kristallisationsbedingungen für weitere Optimierungen gefunden werden, da in Anwesenheit von Kupfer keine Proteinkristalle gewachsen waren.

A



B



**Abbildung 6:** Kristallbilder von den Optimierungsschritten der Kristallisation von  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}$  (A) und Beugungsmuster (B, rechts) des Kristalls aus der Bedingung „d“ (B, links) an der ID14-4 Beamline in ESRF, Grenoble, Frankreich (B). Die Kristallisationsbedingungen bei denen die Kristalle a - c gewachsen sind, sind wie folgt zusammengesetzt: 20% (w/v) PEG550 MME, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 in Microbatch (a) + 0,075% (v/v) Dextransulfat in Microbatch (b) + 0,075% (v/v) Dextransulfat in *hanging drop* (c) + 0,075% (v/v) Dextransulfat, + 0,25 mM AMP-PNP in *hanging drop* (d).

Ein Doppelkonus-förmiger Kristall wurde in Grenoble untersucht und an der ID14-4 Beamline in ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) gemessen. Die Montierung und Vermessung des Kristalls erfolgte durch Dr. Astrid Höppner und die anschließende Auswertung der Ergebnisse wurde von Dr. Daniel Schlieper durchgeführt. Der Kristall wurde dazu in den Winkeln  $\phi = 46^\circ$  und  $\phi = 92^\circ$  um  $1^\circ$  gedreht. Die Beugungsmuster sowie der gemessene Kristall sind in Abb. 6B dargestellt. Die Spots bis zu  $12 \text{ \AA}$  bei  $\phi = 46^\circ - 47^\circ$  verschwinden nach der Drehung des Kristalls um  $45^\circ$  und es sind nur Ringe anstelle von Spots zu erkennen ( $\phi = 92^\circ - 93^\circ$ ). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass der gemessene Kristall eine innere Asymmetrie in einer Dimension aufweist. Somit ist es unmöglich, von diesem Kristall Daten zu sammeln, die für die Strukturberechnungen verwendet werden können.

Parallel zu den oben beschriebenen klassischen Ansätzen zur Kristallisation des Membranproteins  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}$  wurden auch unkonventionelle Methoden ausprobiert, wie die *lipidic sponge phase*-Methode und das Verwenden von Lipopeptid-Detergenzien (Engström *et al.*, 1998, McGregor *et al.*, 2003, Details zur Durchführung s. Material und Methoden 2.13.1). Die *lipidic sponge phase*-Methode wurde für die Kristallisation von Membranproteinen entwickelt. Dabei wird die Lipid-haltige Umgebung der biologischen Membranen durch lipophile Bereiche und dazwischen liegende

aquatische Poren imitiert. Die Membranproteine werden in Detergenz-Micellen zu den Kristallisationsansätzen dazugegeben. Wenn die Bedingungen günstig für die Kristallisation des Proteins sind, wandern die Membranproteine aus den Detergenz-Micellen in die schwammartige Umgebung und werden dadurch im Idealfall zu einem Proteinkristall angereichert (Wöhri *et al.*, 2008). Bei der Kristallisation von N<sub>GHM</sub>CopS mittels der *lipidic sponge phase*-Methode wurde in einigen Ansätzen eine Phasentrennung beobachtet, die ein Hinweis für eine ansetzende Kristallisation sein könnte. Jedoch führten die Optimierungen dieser Bedingungen zu keiner erfolgreichen Kristallbildung. Alternativ wurden Lipopeptid-Detergenzien (Calbiochem, Millipore) zur Kristallisation von Membranproteinen verwendet. Hierbei wurden die DDM-Micellen des N<sub>GHM</sub>CopS-Proteins vor den Kristallisationsansätzen durch Lipopeptid-Detergenzien ersetzt. Die Transmembranhelices des Proteins sollten von den Lipopeptid-Detergenzien abgedeckt werden, sodass die Peptidkomponente nach außen zeigt und das Protein keine Hydrophobizität mehr aufweist. Demnach konnte das N<sub>GHM</sub>CopS in Lipopeptid-Detergenzien bei den Kristallisationsansätzen wie ein lösliches Protein behandelt werden. Es wurden die Kristallisationskits Classics Suite, Classics Suite II, PEGs Suite und PEGs II Suite (Qiagen), die nicht speziell für Membranproteine, sondern primär für lösliche Proteine geeignet sind, getestet. Es konnten allerdings keine geeigneten initialen Bedingungen gefunden werden, die zu einer Kristallbildung führten.

### **1.1.2 Kristallisation verschiedener CopS-Derivate**

Die Schwierigkeiten, N<sub>GHM</sub>CopS zu kristallisieren, könnten darin begründet sein, dass das Protein nicht stabil in Lösung vorliegt. Eine mögliche Ursache könnte eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung der Sensorkinase CopS sein. Um dies zu vermeiden, wurden Versuche unternommen CopS-Derivate zu kristallisieren, die nicht mehr phosphoryliert werden können. Dazu wurden die Plasmide pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS-H153A und pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS-H153E durch ortsgerichtete Mutagenese von pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS konstruiert (s. Material und Methoden 2.8.13.1). Die von diesen Plasmiden kodierten CopS-Derivate haben anstelle des phosphorylierbaren Histidin-Restes an Position 153 einen Alanin- (N<sub>GHM</sub>CopS-H153A) bzw. einen Glutamat-Rest (N<sub>GHM</sub>CopS-H153E). Die Überexpression, Aufreinigung und Größenausschlusschromatographie erfolgten wie für N<sub>GHM</sub>CopS. Die Reinheit sowie die Homogenität beider neuen Derivate unterschieden sich nicht von denen des N<sub>GHM</sub>CopS-Proteins. N<sub>GHM</sub>CopS-H153A und N<sub>GHM</sub>CopS-H153E wurden nach der Reinigung und Umpufferung in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0 + 0,05% (w/v) DDM für die Kristallisationsscreens in Microbatch und *sitting drop* eingesetzt (für Details s. Material und Methoden 2.13.1). Dazu wurden folgende Kits verwendet: JBScreen Membrane 1-3 (Jena Bioscience), MemStart™&MemSys™ HT-96, Molecular Dimensions) und MbClass and MbClass II Suit (Qiagen). Darüber hinaus wurden auch die Kristallisationsscreens Classics Suite, Classics Suite II, PEGs Suite und

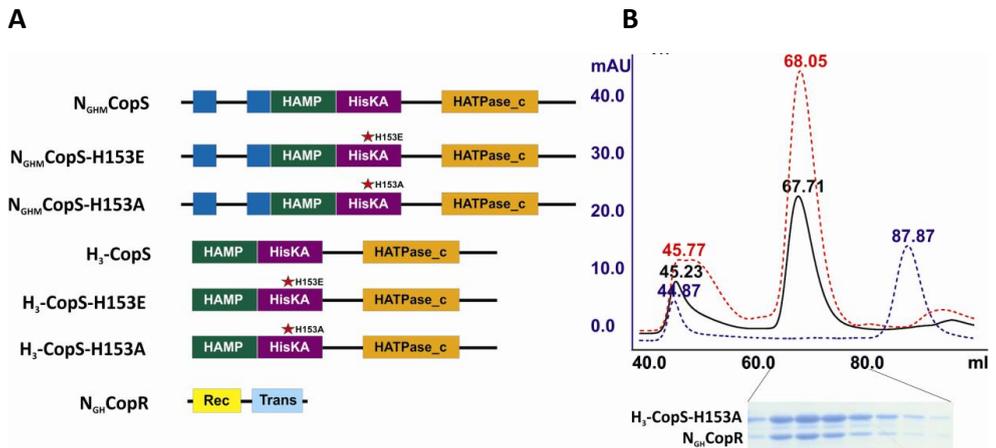
PEGs II Suite (Qiagen) verwendet. Dazu wurden die DDM-Micellen zunächst gegen Lipopeptid-Detergenzien wie oben beschrieben ersetzt. Außerdem wurde versucht, die CopS-Derivate  $N_{\text{GHM}}\text{CopS-H153A}$  und  $N_{\text{GHM}}\text{CopS-H153E}$  in der bereits optimierten Kristallisationsbedingung für  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}$  (s. oben) zu kristallisieren. In allen getesteten Ansätzen konnte keine geeignete Bedingung gefunden werden, in der Proteinkristalle wuchsen.

Da es sich als schwierig erwies, das vollständige CopS-Protein bzw. dessen Derivate zu kristallisieren, wurde im Folgenden versucht, nur den cytoplasmatischen Teil von CopS zu kristallisieren. Die Kristallisierung löslicher Proteine verläuft allgemein erfolgreicher (White, 2004). Hierzu wurde das Überexpressionsplasmid pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS konstruiert, welches für ein CopS-Derivat ohne die beiden Transmembranhelices mit einem abspaltbaren Dekahistidin-Tag kodiert (TEV-H<sub>3</sub>-CopS). Bezogen auf die native CopS-Sequenz umfasst das H<sub>3</sub>-CopS-Derivat die Aminosäuren 89-399. Um die mögliche Flexibilität des Proteins zu minimieren, die durch eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung ausgelöst werden könnte, wurden darüber hinaus die beiden Überexpressionsplasmide pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS-H153A und pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS-H153E mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgehend von pET-TEV-H<sub>3</sub>-CopS konstruiert. Dabei wurde der konservierte Histidin-Rest an Position 153 (bezogen auf die native CopS-Sequenz) gegen einen Alanin- (TEV-H<sub>3</sub>-CopS-H153A) bzw. einen Glutamat-Rest (TEV-H<sub>3</sub>-CopS-H153E) ausgetauscht. Die Überproduktion, Aufreinigung, Abspaltung des Tags mittels der TEV-Protease sowie die Größenausschlusschromatographie waren für alle drei löslichen CopS-Derivate erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Anschließende Kristallisationsversuche mit den Kits für lösliche Proteine in Microbatch und *sitting drop* (s. Material und Methoden 2.13.1) blieben für alle drei Proteine erfolglos. Alle CopS-Derivate, die für die Kristallisation eingesetzt wurden, sind in der Abb. 7A schematisch dargestellt.

Eine wahrscheinliche Ursache für die erfolglose Kristallisation von CopS könnte die Flexibilität bzw. Beweglichkeit des Proteins sein. Sowohl die Zugabe von AMP-PNP zu den Kristallisationsansätzen als auch der Austausch des konservierten Histidin-Restes gegen einen Alanin-, bzw. Glutamat-Rest haben das Wachstum der Kristalle nicht begünstigt.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, die lösliche Domäne von CopS mit dem zugehörigen Antwortregulator CopR co-zu-kristallisieren. Dadurch erhoffte man sich eine verringerte Flexibilität der Proteine. Dass diese Strategie erfolgreich sein kann, konnte durch die Kristallisation von HK853 mit RR468 aus *Thermotoga maritima* bereits gezeigt werden (Casino *et al.*, 2009). Um eine mögliche Flexibilität der Proteine zu reduzieren und das Problem der Hydrophobizität der Transmembranhelices zu umgehen, wurde das lösliche CopS-Derivat H<sub>3</sub>-CopS-H153A ausgewählt. Für den Antwortregulator wurde das  $N_{\text{GH}}\text{CopR}$ -Derivat ausgewählt, das einen abspaltbaren Dekahistidin-

Tag trägt und von dem Plasmid pET-NHis10-TEV-CopR kodiert wird. Die erfolgreiche Überproduktion und Aufreinigung von  $N_{GH}$ CopR konnte bereits gezeigt werden (Schelder, unveröffentlicht).  $H_3$ -CopS-H153A und  $N_{GH}$ CopR wurden aufgereinigt, mittels TEV-Protease verdaut und die Tag-freien Proteine wurden nach einem kurzen Inkubationsschritt mittels Größenausschlusschromatographie auf eine mögliche Komplex-Bildung hin untersucht (Abb. 7B).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der für die Kristallisation verwendeten CopS- und CopR-Derivate (A) und das Elutionsprofil von  $H_3$ -CopS-H153A und  $N_{GH}$ CopR einzeln (gestrichelte Linien in rot bzw. blau) und zusammen (schwarze durchgezogene Linie) mit anschließender SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Fraktionen aus dem Lauf mit den beiden Proteinen zusammen (B). Bei den CopS-Derivaten sind die Transmembranhelices blau, die HAMP-Domäne grün, die HisKA-Domäne violett und die HATPase\_c-Domäne orange dargestellt. Der Austausch des Histidin-Restes an der Position 153 (bezogen auf das native CopS-Protein) ist mit einem roten Stern gekennzeichnet. Die Empfänger-Domäne des Antwortregulators ist gelb, die Transmitter-Domäne hellblau dargestellt.

Das Elutionsprofil beider Proteine zusammen (schwarze Linie) zeigte abgesehen von dem Peak mit den aggregierten Proteinen bei 45 ml nur einen weiteren Peak bei 68 ml. Der CopR-Peak bei 87 ml war nicht mehr erkennbar. In den Elutionsfraktionen zwischen 60 und 80 ml konnten beide Proteine  $H_3$ -CopS-H153A und  $N_{GH}$ CopR mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 7B). Es konnte somit ein Komplex zwischen dem löslichen Teil der Sensorkinase CopS mit dem korrespondierenden Antwortregulator CopR identifiziert werden. Die Elutionspeaks von  $N_{GH}$ CopR und  $H_3$ -CopS-H153A einzeln und beider Proteine zusammen waren bei 87,18 ml, 68,05 ml bzw. 67,71 ml detektierbar. Für  $N_{GH}$ CopR entspricht dies einer Proteingröße von 31,4 kDa, was der berechneten Monomer-Größe von 27 kDa nahekommt. Für  $H_3$ -CopS-H153A entspricht der Elutionspeak einer Größe von 150,8 kDa, die berechnete Größe von  $H_3$ -CopS-H153 beträgt dagegen nur 33,8 kDa. Dies würde bei einem globulären Protein auf ein Tetramer hindeuten. Die beiden Proteine zusammen weisen eine

apparente Größe von 155 kDa auf. Eine Interaktion zwischen CopS und CopR könnte dazu führen, dass CopS nicht mehr als ein Tetramer vorliegt, sondern ein CopS-CopR-Dimer mit einer berechneten Größe von 122,6 kDa entsteht. Wenn das lösliche CopS-Derivat jedoch ein nicht globuläres Dimer bildet, könnten die gleich großen Elutionsmaxima für H<sub>3</sub>-CopS-H153A allein und im Komplex mit N<sub>6H</sub>CopR dadurch erklärt werden, dass bei einer Interaktion der beiden Proteine der Stokes-Radius von H<sub>3</sub>-CopS-H153A nicht verändert wird.

Der H<sub>3</sub>-CopS-H153A-N<sub>6H</sub>CopR-Komplex wurde mit den Kristallisationskits für lösliche Proteine in Microbatch mit und ohne AMP-PNP als Additiv gescreent. Es konnten jedoch keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden werden.

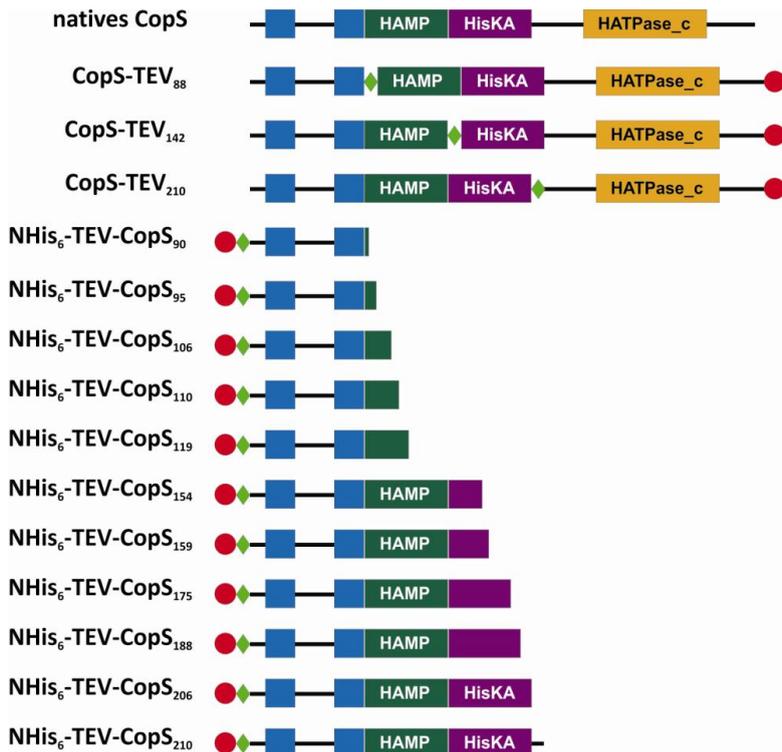
## 1.2 Festkörper-NMR mit der Sensorkinase CopS

### 1.2.1 Probenvorbereitung für Festkörper-NMR

Festkörper-NMR-Studien erlauben es, die Wechselwirkungen eines Proteins mit seinem Liganden und die Rolle der einzelnen daran beteiligten Aminosäuren zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Ansatzes sollte die Dynamik der Signalübertragung von CopS, die durch die Ligandenbindung hervorgerufen wird, dargestellt und die Struktur des membrangebundenen Teils der Sensorkinase CopS bestimmt werden. Allerdings sind die Anforderungen an die Probenvorbereitung für die Festkörper-NMR-Messung sehr hoch. Erstens sollte das Protein in Proteoliposomen vorliegen. Hierzu sollte für jedes zu analysierende CopS-Derivat ein Protokoll ausgearbeitet werden, welches einen maximalen Einbau in Proteoliposomen ermöglicht. Zweitens sollte das Protein in hohen Mengen (5 - 10 mg) eingesetzt werden, damit die Signalintensität hoch genug ist, um diese detektieren zu können. Gleichzeitig darf das Protein nicht zu groß sein, um eine Auswertung der NMR-Spektren zu ermöglichen. Bei einem zu großen Protein könnte die Überlagerung der Signale dazu führen, dass die Spektren zu überladen und somit nicht lesbar sind. Drittens erfolgt die Messung an <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten Proteinen, was eine entsprechende Markierung der zu untersuchenden Proteine während der Überproduktion erfordert. Dabei sollte die Überproduktion der Proteine in Minimalmedium stattfinden, welches mit <sup>13</sup>C- Glucose und <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid supplementiert wurde. In den vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die vollständige Sensorkinase CopS erfolgreich in *E. coli*-Proteoliposomen eingebaut werden konnte (Schelder, 2008, Schuplezow, 2009), allerdings ist das vollständige Protein mit seinen 399 Aminosäuren zu groß für die Festkörper-NMR-Messung. Daher sollte zunächst ein C-terminal verkürztes CopS-Derivat gefunden werden, welches beide Transmembranhelices besitzt und in großen Mengen überproduziert und gereinigt werden kann.

### 1.2.2 Suche nach einem geeigneten C-terminal verkürzten CopS-Derivat

Um ein geeignetes verkürztes CopS-Derivat zu identifizieren, wurden diverse Überexpressionsplasmide konstruiert, welche für verschiedene C-terminal verkürzte CopS-Derivate kodieren oder für CopS-Derivate, denen an definierten Stellen eine TEV-Schnittstelle eingefügt wurde, sodass nach einem Verdau mit der TEV-Protease verkürzte CopS-Derivate entstehen sollten. Alle CopS-Derivate, die für die anschließenden Festkörper-NMR-Studien getestet wurden, sind in der Abb. 8 schematisch dargestellt.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der CopS-Derivate, die für die Festkörper-NMR-Studien auf Überproduktion, Solubilisierung und Rekonstitution in Proteoliposomen getestet wurden. Der Hexahistidin-Tag ist als roter Kreis, die TEV-Schnittstelle als grüner Rhombus und die Transmembranhelices als blauer Quader dargestellt. Die Domänen der Sensorkinase sind beschriftet und farblich (grün für HAMP-, violett für HisKA- und gelb für HATPase\_c-Domäne) hervorgehoben.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verkürzung der Sensorkinase CopS am C-Terminus zu einer Instabilität des Proteins führt (Schuplezow, 2009). Aus diesem Grund wurde versucht, ein Stoppcodon, sowie die Sequenzen für die TEV-Schnittstelle gezielt an die Positionen in der Aminosäuresequenz einzubringen, an denen Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter mit geringster Wahrscheinlichkeit zu erwarten waren. Zu Analyse der Sekundärstruktur von CopS wurden

frei zugängliche Programme benutzt: DISTILL (<http://distill.ucd.ie/distill/>), GOR4 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>), APSSP2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2>) und NetSurfP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>). Die Überexpressionsplasmide, die für die C-terminal verkürzte CopS-Derivate, bzw. für die CopS-Derivate mit einer eingefügten TEV-Schnittstelle kodieren (Tab. 2), wurden in *E. coli* BL21(DE3) transferiert. Zunächst erfolgte eine Überprüfung aller Derivate auf (i) Überproduktion, (ii) Solubilisierung und wenn erforderlich (iii) auf TEV-Protease-Verdau. Die Derivate NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>106</sub>, NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>110</sub>, NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>119</sub>, NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>154</sub>, NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>159</sub>, NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>175</sub>, und NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>188</sub> konnten nicht erfolgreich überproduziert werden. Die Derivate NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>90</sub> und NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>95</sub> konnten in *E. coli* BL21(DE3) zwar überproduziert werden, die Solubilisierung der beiden Proteine aus den Zellmembranen war jedoch nicht möglich. Die Derivate CopS-TEV<sub>210</sub>, CopS-TEV<sub>142</sub> und CopS-TEV<sub>88</sub> konnten überproduziert, solubilisiert und in geringen Mengen gereinigt wurden, der finale TEV-Verdau zum Erhalten der verkürzten CopS-Derivate war aber nicht erfolgreich. Möglicherweise waren die TEV-Schnittstellen für die TEV-Protease nicht zugänglich. Schließlich wurden zwei C-terminal verkürzte CopS-Derivate gefunden, welche sowohl überproduziert als auch solubilisiert werden konnten, nämlich NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>210</sub> und NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>. Aufgrund der kürzeren Aminosäuresequenz wurde das NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> für die weiteren vorbereitenden Studien für die Festkörper-NMR ausgewählt. Es war auffallend, dass nur die beiden Derivate stabil waren, die sowohl die HAMP- als auch die HisKA-Domäne enthalten. Vermutlich sind beide Domänen für die Stabilität der Sensor kinase CopS und deren Derivate notwendig.

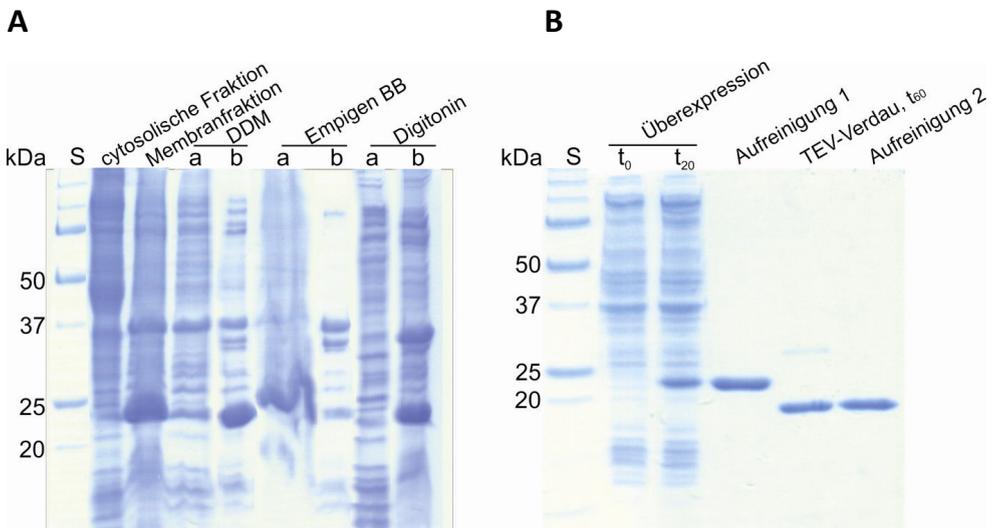
### 1.2.3 Überproduktion, Reinigung und TEV-Verdau von NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>

Nachdem ein geeignetes C-terminal verkürztes CopS-Derivat gefunden wurde, erfolgten Optimierungen zur (i) Überproduktion von NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> in Minimalmedium, (ii) Solubilisierung des Proteins aus der *E. coli*-Membran, (iii) Aufreinigung (iv) sowie zur Abspaltung des Histidin-Tags mit der TEV-Protease. Alle Optimierungen wurden auf eine maximale Proteinausbeute ausgerichtet. Die Überproduktion von NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> erfolgte in M9-Minimalmedium, um eine <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Isotopenmarkierung für die Festkörper-NMR-Analyse zu ermöglichen. Hierzu wurden zunächst unterschiedliche Medien-Zusammensetzungen bzw. Kultivierungsbedingungen getestet: M9-Minimalmedium ohne Zusätze, M9-Minimalmedium mit Spurensalzen, M9-Minimalmedium mit Spurensalzen und Vitaminen und „aufkonzentriertes“ M9-Minimalmedium. Als Referenz diente LB-Medium. Bei dem „aufkonzentrierten“ M9-Minimalmedium handelt es sich um eine bei Ostuni *et al.* (2010) beschriebene Kultivierungsmethode, wobei die Zellen zunächst in 1 l LB-Medium kultiviert wurden, bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 sedimentiert und dann in 0,5 l M9-Minimalmedium resuspendiert wurden. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37 °C im neuen Medium inkubiert und anschließend mit

0,5 mM IPTG induziert; die Proteinüberproduktion erfolgte wie bei anderen Kultivierungen über Nacht bei RT. Während der Kultivierungen wurde neben der Überproduktion auch der Glucose-Verbrauch bestimmt, um die Zugabe der isotope-markierten Glucose dem tatsächlichen Verbrauch anzupassen. Dazu wurde am Anfang der Kultivierung, zum Zeitpunkt der IPTG-Zugabe und am Ende der Kultivierung die Glucosekonzentration im Medium mittels HPLC bestimmt (Material und Methoden 2.5). Die aus jedem Kultivierungsansatz geernteten Zellen wurden aufgeschlossen und nach der Solubilisierung wurde das Protein NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Material und Methoden 2.9.6). Ein Vergleich der Protein-Ausbeuten zeigte, dass die Menge vom gereinigten N-His<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> aus *E. coli*-Zellen, die im M9-Minimalmedium mit Spurensalzen kultiviert wurden, im Vergleich zu anderen Kultivierungsansätzen fast doppelt so groß war. Dabei blieb der Glucose-Verbrauch bei allen Kultivierungsansätzen bis auf das „aufkonzentrierte“ M9-Minimalmedium konstant. Bei Letzterem war der Glucose-Verbrauch deutlich höher. Demnach war das M9-Minimalmedium mit Spurensalzen für die Überproduktion von NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> am besten geeignet. In allen Ansätzen war die Glucosekonzentration nach Beendigung der Kultivierung sehr hoch. Für die weiteren Kultivierungen wurde deswegen die eingesetzte Glucosekonzentration von 2% (w/v) auf 0,5% (w/v) reduziert.

Bei der Aufreinigung von Membranproteinen ist die Solubilisierung ein kritischer Schritt. Deswegen wurde als Nächstes die Solubilisierung für das NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>-Protein optimiert, indem bei der Solubilisierung der Membranproteine aus *E. coli*-Zellmembranen drei Detergenzien miteinander verglichen wurden. Neben dem routinemäßig eingesetzten DDM wurde Digitonin und Empigen BB getestet. Nachdem die Zellmembranen aus *E. coli* BL21(DE3)/pET-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> mit dem jeweiligen Detergenz inkubiert worden waren (für mehr Details s. Material und Methoden 2.9.2), wurden die Proben ultrazentrifugiert und sowohl die Pellets mit den nicht solubilisierten Proteinen als auch die Überstände mit den solubilisierten Membranproteinen einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Das NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>-Protein (apparente Masse 26 kDa) konnte bei der Solubilisierung mit Digitonin nur im Pellet nachgewiesen werden, deswegen schied dieses Detergenz aus. Bei den beiden anderen Detergenzien konnte kein direkter Vergleich erfolgen, denn Empigen BB wirkte störend auf das Laufverhalten der Proteine bei der SDS-PAGE (Abb. 9A). Daher wurden in einem weiteren Versuch die mit Empigen BB bzw. DDM solubilisierten Proteine einer erneuten Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen, bei der allen Puffern 0,05% (w/v) DDM zugesetzt wurde, was einen Austausch von Empigen BB gegen DDM ermöglichte (Kneuper, 2005, Krämer, 2008). Die anschließende Bestimmung der Proteinausbeuten ergab, dass bei der Solubilisierung mit DDM 1 mg NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> gereinigt werden konnte, bei der Solubilisierung mit Empigen BB dagegen 6 mg, ausgehend von der gleichen Zellmenge aus 500 ml Kulturvolumen. Aufgrund der sechsfach höheren

Protein-Ausbeute wurde bei der Probenvorbereitung für die Festkörper-NMR-Messung Empigen BB als Detergenz für die Solubilisierung verwendet.



**Abbildung 9:** SDS-PAGE-Analysen der Solubilisierung von Membranproteinen zur Aufreinigung von NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> mit DDM, Empigen BB und Digitonin (A). Durch eine Ultrazentrifugation wurden die solubilisierten Proteine (a) von der nicht solubilisierten Membranfraktion (b) getrennt. Überproduktion, Aufreinigung, TEV-Verdau und zweite Aufreinigung des <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten Proteins für die Rekonstitution in Proteoliposomen und anschließende Festkörper-NMR-Messung (B). S: Proteinstandard.

Nach den erfolgten Optimierungen zur Überexpression und Solubilisierung folgte die Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer für den TEV-Verdau. Eine vollständige Abspaltung des Histidin-Tags mit Hilfe der TEV-Protease (10 µg Protease pro 1 mg Substrat) erfolgte nach ca. 60 Stunden bei 4 °C. Die apparente Masse von NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> beträgt 26 kDa, die des Tag-freien N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub>-Proteins, welches nach dem Verdau entsteht, 23 kDa (Abb. 9B). Nach dem Verdau wurden nicht gespaltene Proteine, abgespaltene Histidin-Tags, sowie die Histidin-getaggte TEV-Protease in einem erneuten Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Schritt von dem N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub> abgetrennt. Das gereinigte N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub> wurde für die Rekonstitution in die Proteoliposomen für die anschließende Festkörper-NMR-Messung eingesetzt.

Für die Rekonstitution von <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markiertem N<sub>GHM</sub>CopS<sub>206</sub> wurden alle Ergebnisse aus den Optimierungsschritten berücksichtigt und ein Protokoll zur Überexpression, Aufreinigung, Solubilisierung und den TEV-Verdau erarbeitet. Das Plasmid pET28b-NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub> wurde in *E. coli* BL21(DE3) in M9-Minimalmedium mit Spurensalzen überexprimiert. Die Expression wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit 0,5 mM IPTG induziert und erfolgte über Nacht bei RT (Abb. 9B). Die

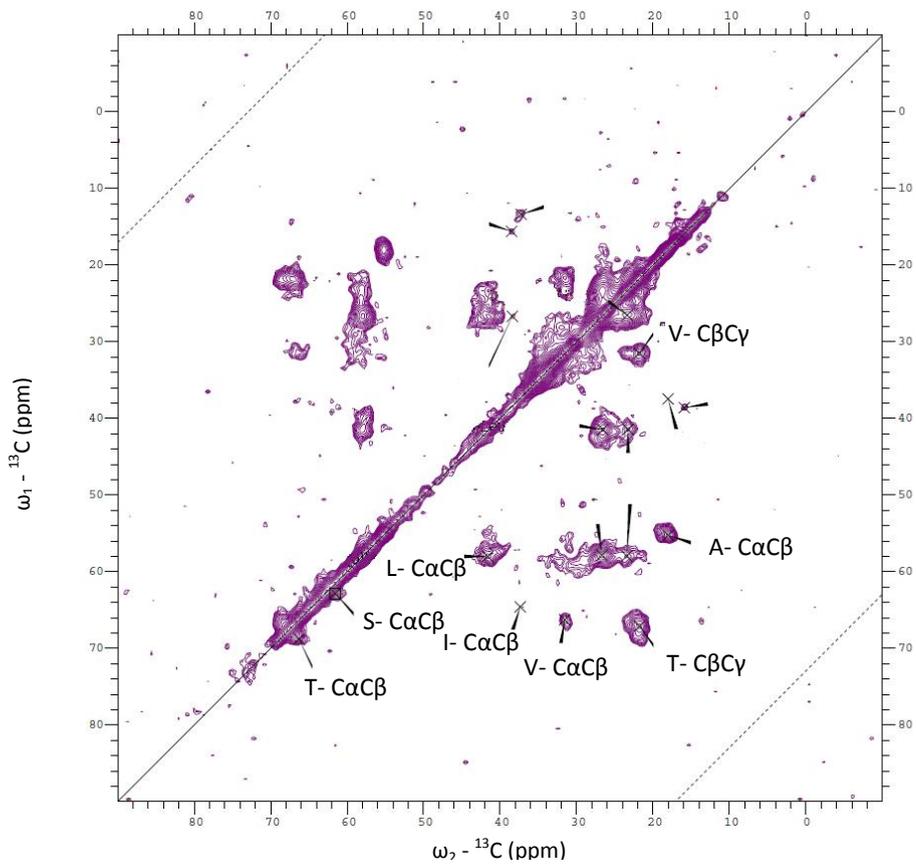
sedimentierten Zellen aus 1 l Kultur wurde in TN15-Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 5467 g, um die Zelltrümmer abzutrennen. Danach wurde der Zellextrakt durch Ultrazentrifugation in die cytosolische und in die Membranfraktion aufgetrennt. Die Membranproteine wurden mit Empigen BB solubilisiert und erneut ultrazentrifugiert. Die solubilisierten Proteine wurden einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen, wobei alle dazu verwendeten Puffer 0,05% (w/v) DDM enthielten, um Empigen BB gegen DDM auszutauschen. Das Histidin-getaggte NHis<sub>6</sub>-TEV-CopS<sub>206</sub>-Protein wurde mit TN1200-Puffer von der Säule eluiert und in den Aufkonzentrierungsröhrchen (MWCO 10000) durch wiederholte Zentrifugation mit TN-Puffer solange verdünnt, bis die Imidazol-Konzentration in der Probe ca. 5 mM betrug (Abb. 9B, Aufreinigung 1). Danach erfolgte der Verdau mit der TEV-Protease (10 µg Protease/1 mg Substrat) bei 4 °C für 60 Stunden (Abb. 9B, TEV-Verdau). Anschließend wurde die Probe erneut einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie unterzogen. In diesem Fall wurde der Durchfluss mit den ungetaggtten Proteinen aufgefangen (Abb. 9B, Aufreinigung 2). Nach diesem Protokoll gereinigtes <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markiertes Protein wurde für die Rekonstitution in *E. coli*-Proteoliposomen eingesetzt.

#### **1.2.4 Rekonstitution von N<sub>G<sub>HM</sub></sub>CopS<sub>206</sub> für Festkörper-NMR**

Für die Festkörper-NMR sollte das N<sub>G<sub>HM</sub></sub>CopS<sub>206</sub>-Protein rekonstituiert in Proteoliposomen vorliegen. Beim Einbau von Proteinen in Liposomen werden die solubilisierten Membranproteine zunächst mit destabilisierten Lipiden bzw. Lipid-Vesikeln vermischt. Anschließend werden die Detergenzien aus diesem Gemisch entfernt. Dabei gehen die Membranproteine aus den Detergenz-Micellen in die Lipid-haltige Umgebung über und werden so zu Lipid-Vesikeln assembliert (Rigaud *et al.*, 1995, Ostuni *et al.*, 2010). Da es für die Rekonstitution von Membranproteinen kein allgemeingültiges Protokoll gibt, wurden die einzelnen Schritte speziell für N<sub>G<sub>HM</sub></sub>CopS<sub>206</sub> optimiert. Der Prozess der Rekonstitution kann in drei Stadien unterteilt werden, (i) Vorbereitung der Lipid-Suspension, inklusive der Vorbehandlung der Lipide für die Bildung von Vesikeln und eine anschließende Destabilisierung der Lipide mit einem Detergenz, (ii) Ermittlung eines optimalen Protein-zu-Lipid-Verhältnisses, um eine maximale Effektivität der Rekonstitution zu erzielen und Proteinverluste zu vermeiden, und (iii) Entfernung der Detergenzien aus dem Protein-Lipid-Detergenz Gemisch mit Hilfe von BioBeads (BioRad). Bei der Ermittlung der erfolgreichen Entfernung der Detergenzien mit BioBeads wurde eine modifizierte Bradford-Messung verwendet (s. Material und Methoden 2.14.2). Die Effektivität jedes einzelnen Optimierungsschrittes wurde mittels eines diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten ermittelt. Dabei wurde nach vollständiger Rekonstitution mit jeweils nur einem geänderten Parameter die Proben mit N<sub>G<sub>HM</sub></sub>CopS<sub>206</sub>-Proteoliposomen in einem Saccharose-Dichtegradienten von den Lipiden und nicht assemblierten

Proteinen getrennt (s. Material und Methoden 2.14.3). Eine Bestimmung des Protein-Gehaltes in den so erhaltenen Proteoliposomen war ein Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Optimierung: je dichter die Proteoliposomen mit Protein gepackt sind, desto besser eignen sie sich für die anschließende Festkörper-NMR-Messung. Das für  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$  ermittelte Protokoll zum Einbau in Proteoliposomen ist in Material und Methoden 2.14.1 beschrieben. Die finale Effizienz des Einbaus von  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$  in die *E. coli*-Liposomen betrug 50%, d.h. nur die Hälfte des eingesetzten Proteins konnte erfolgreich in die Proteoliposomen eingebaut werden.

Nachdem die Optimierungen des Rekonstitutionsprotokolls abgeschlossen waren, wurde  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$  in Liposomen eingebaut und für die erste Festkörper-NMR-Messung eingesetzt. In Abb. 10 ist das Festkörper-NMR-Spektrum nach der ersten Messung der  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$ -Probe dargestellt, die identifizierten Aminosäuren sind gekennzeichnet. Die Messung und Auswertung erfolgte durch Dr. Santhosh Ayalur-Karunakaran und Prof. Dr. Henrike Heise (ICS-6, Forschungszentrum Jülich). Aus diesem Spektrum konnte abgeleitet werden, dass nur die Aminosäuren der Transmembranhelices des Proteins sichtbar sind; insbesondere die Reste S, T, I, L, V und A sind klar identifizierbar und weisen Sekundärverschiebungen auf, die für alpha-helikale Sekundärstrukturen typisch sind. Anscheinend liegt der Rest der Probe mobil vor, sodass die dipolaren Kopplungen durch schnelle Bewegungen ausgemittelt werden und so kein Magnetisierungstransfer zwischen den entsprechenden Spins stattfinden kann und diese Bereiche unter den gewählten Bedingungen im Spektrum nicht erfasst werden können.



**Abbildung 10:** Ein exemplarisches Spektrum aus der ersten Festkörper-NMR-Messung des rekonstituierten  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten  $\text{N}_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$ -Proteins. Die Messung erfolgte bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer Protonenfrequenz von 600 MHz. Dargestellt ist das Spindiffusionsspektrum mit einer Mischzeit von 20 ms bei einer Rotationsresonanz von 9375 Hz.

## 2. Funktionelle Untersuchungen zu Kupfer-Mangel in *C. glutamicum*

Vorangegangene Studien zur Kupfer-Mangel-Antwort von *C. glutamicum* zeigten, dass Kupfer-Ionen während des Wachstums von den Zellen konsumiert werden und dass für solche Untersuchungen die Verwendung des Kupfer-spezifischen Chelators BCS notwendig ist. Für den Wildtyp konnte ein leichter Wachstumsdefekt unter Kupfer-limitierenden Bedingungen in der spätexponentiellen Phase beobachtet werden. Bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der  $\Delta cydAB$ -Deletionsmutante konnte ein deutlich stärker beeinträchtigt Wachstum unter Kupfer-limitierenden Bedingungen beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass die Kupfer-unabhängige Cytochrom-*bd*-Oxidase (kodiert von den Genen *cydA* und *cydB*) unter Kupfer-limitierenden Bedingungen eine wichtigere Rolle bei der Respiration und Energiegewinnung übernimmt als die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase mit ihren beiden Kupfer-Zentren Cu<sub>A</sub> und Cu<sub>B</sub>.

### 2.2 Auswirkungen der Kupfer-limitierenden Bedingungen auf *C. glutamicum* WT

In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen zur Kupfer-Homöostase in *C. glutamicum* in Bezug auf Kupfer-Mangel fortgesetzt. Als erstes wurde der Transkriptomvergleich *C. glutamicum* Wildtyp (WT) kultiviert in Standard-CGXII Medium vs. *C. glutamicum* WT kultiviert unter Kupfer-limitierenden Bedingungen wiederholt. Dabei wurde die Kupfer-Limitierung durch die Zugabe des spezifischen Kupfer-Chelators Bathocuproindisulfonat (BCS, 150  $\mu$ M) und des Reduktionsmittels Ascorbat (1 mM) zum Medium erzeugt. Die Anzahl der Gene mit einem mehr als zweifach veränderten mRNA-Spiegel betrug 46, wobei 11 davon bereits im Transkriptomvergleich ohne BCS und Ascorbat erfasst wurden (Schuplezow, 2009). Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen waren die mRNA-Verhältnisse für die jeweiligen Gene stärker verändert. Ein Ausschnitt der Gene mit einem veränderten mRNA-Level (mehr als dreifach) beim Vergleich WT vs. WT unter Kupfer-Mangel (mit 150  $\mu$ M BCS und 1 mM Ascorbat) ist in der Tab. 4 dargestellt, die komplette Liste mit allen Genen aus dem Kupfer-Mangel-Stimulon befindet sich im Anhang, Tab. A2. Das am stärksten veränderte mRNA-Verhältnis wiesen die Gene aus dem *cydABDC*-Operon auf (10,54- bis 27,79-fach). Während die *cydAB*-Gene für die Untereinheiten I und II der Cytochrom-*bd*-Oxidase kodieren, sind die *cydCD*-Genprodukte an der Assemblierung der funktionsfähigen Cytochrom-*bd*-Oxidase beteiligt (Kabus *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigten die Gene *ctaA* und *ctaB* einen stark erhöhten mRNA-Spiegel (2,75-, bzw. 8,49-fach). Sie kodieren die Häm *a*-Synthase und die Häm *o*-Synthase und sind damit essentiell für die Bildung einer aktiven Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase (Eggeling and Bott, 2005). Die Funktion weiterer Gene mit einem erhöhten mRNA-Spiegel (*cg1884/copC*, *cg1883/pcuC* und *cg2699*) kann aufgrund der Homologien der Genprodukte zu Proteinen aus anderen Organismen mit der Regulation der Kupfer-Homöostase zusammenhängen (s. 2.3). Im Gegensatz zu den Genen *ctaA* und *ctaB* zeigte das *ctaE-qcrCAB*-Operon, das für die Untereinheit III der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase sowie die Untereinheiten

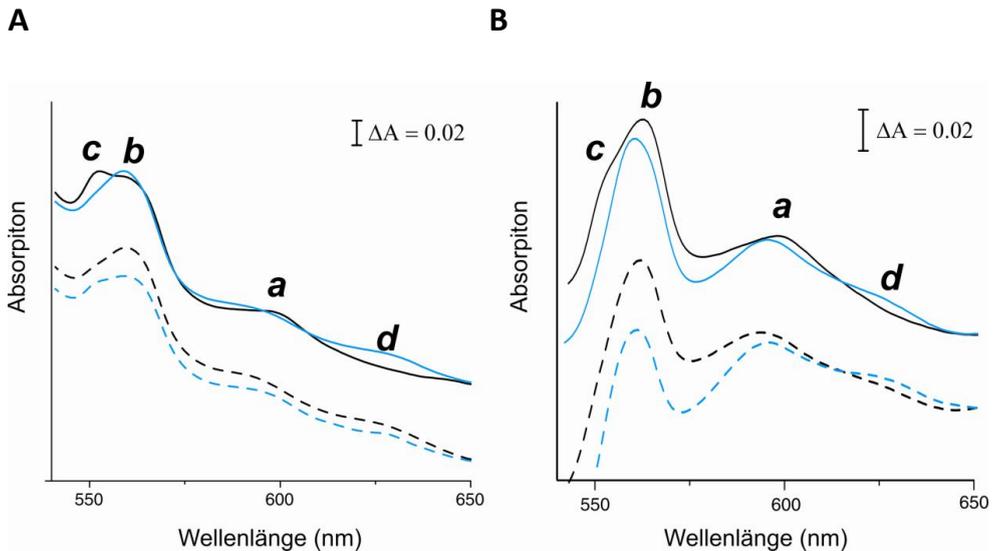
QcrA, QcrB und QcrC des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplexes kodiert, einen verringerten mRNA-Spiegel (0,31- bis 0,35-fach). Auch die Gene *ctaC* und *ctaF* für die Untereinheiten II und IV der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase zeigten ca. 2-fach erniedrigte mRNA-Spiegel, jedoch lag der p-Wert über 0,05. Das CtaD-Gen für Untereinheit I der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase zeigte dagegen einen nahezu unveränderten mRNA-Spiegel unter Kupfer-Mangel (Anhang, Tabelle A2).

**Tabelle 4:** Auswahl an Genen mit einem mindestens 3-fach veränderten mRNA-Spiegel in einem der Transkriptomvergleiche WT unter Kupfer-Mangel vs. WT oder  $\Delta$ cg2699 vs. WT (unter Standardbedingungen). Beide Transkriptomvergleiche wurden mit Zellen aus der späten exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> = 20) durchgeführt. Die Stämme wurden in Standard-CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose bzw. in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 150  $\mu$ M BCS + 1 mM Ascorbat (Kupfer-Mangelmedium) kultiviert. mRNA-Verhältnisse repräsentieren Mittelwerte aus je drei unabhängigen Versuchen, die von verschiedenen Kultivierungen ausgehen. Werte mit einem p-Wert über 0,05 sind mit einem Stern gekennzeichnet.

<i>Locus tag</i>	Gen-Name	Beschreibung	WT Cu-Mangel/ WT	$\Delta$ cg2699 /WT
cg0133		<i>p</i> -Aminobenzoyl-Glutamat-Transporter	0,27*	0,25
cg0316		Putatives sekretiertes Protein	2,07*	4,09
cg0569		Kation-transportierende ATPase	4,74	4,19*
cg0899		Glutamin-Amidotransferase, beteiligt an der Pyridoxin-Biosynthese	0,45	0,33
cg0924		Sekretiertes Siderophor-Bindeprotein	0,27	0,18*
cg0952		Putatives integrales Membranprotein	0,31	0,23
cg0953		Monocarboxylat-Transporter	0,31	0,23
cg1291		Hypothetisches Protein	2,15	3,06
cg1293		Putatives sekretiertes Protein	0,32	0,43
cg1298	<i>cydC</i>	ABC-Typ Transportsystem, ATPase Komponente	27,79	8,79
cg1299	<i>cydD</i>	ABC-Typ Transportsystem, ATPase Komponente	10,54	16,09
cg1300	<i>cydB</i>	Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase, Untereinheit II	14,55	12,55
cg1301	<i>cydA</i>	Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase, Untereinheit I	14,99	14,03
cg1424	<i>lysE</i>	Lysin-Efflux-Permease	3,30	2,16
cg1744	<i>pacL</i>	Kation-transportierende ATPase	4,01	3,27
cg1769	<i>ctaA</i>	Häm- <i>o</i> -Synthase, Häm- <i>o</i> -Monooxygenase	2,75	5,90
cg1773	<i>ctaB</i>	Häm- <i>o</i> -Synthase, Protohäm IX-Farnesyl-Transferase	8,49	5,83
cg1832		Permease eines ABC-Transporters	6,69	1,58
cg1833		ABC-Typ Cobalamin/Fe <sup>3+</sup> -Siderophor-Transport-System, sekretierte Komponente	8,56	2,51
cg1836		Sekretierte Solut-bindendes Protein	0,33	0,67*
cg1881		Vorhergesagte Eisen-abhängige Peroxidase, sekretiertes Protein	12,84	15,37
cg1883	<i>pcuC</i>	Putatives sekretiertes Protein	12,01	16,49
cg1884	<i>copC</i>	Hypothetisches Protein	12,94	16,99

cg2403	<i>qcrB</i>	Cytochrom- <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex, Cytochrom <i>b</i> Unterheit	0,31	0,58
cg2404	<i>qcrA</i>	Cytochrom- <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex, Rieske Eisen-Schwefel Protein	0,34	0,63
cg2405	<i>qcrC</i>	Cytochrom- <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex, Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> Untereinheit	0,35	0,66
cg2406	<i>ctaE</i>	Cytochrom- <i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase, Untereinheit III	0,31	0,66
cg2438		Hypothetisches Protein	0,47	0,30
cg2556		Eisen-reguliertes Membranprotein	10,04	6,49
cg2557		Vorhergesagter Na <sup>+</sup> -abhängiger Transporter	0,29	0,43
cg2699		Membranprotein	4,94	0,05
cg2750		Hypothetisches Protein	6,88	6,28
cg2837	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase $\beta$ -Untereinheit	1,03*	0,22
cg3138		Putativer membrangebundener Protease-Modulator	1,20*	4,83
cg3139		Hypothetisches Protein	1,33*	3,57
cg3195		Flavin-haltige Monooxygenase	0,58*	0,23

Um zu überprüfen, ob sich die beobachteten Veränderungen im mRNA-Spiegel der Atmungskettengene auch auf Proteinebene widerspiegeln, wurde die Cytochrom-Zusammensetzung in *C. glutamicum* WT kultiviert unter Kupfer-limitierenden Bedingungen mit WT kultiviert in Standard-CGXII-Medium verglichen. Hierzu wurden sowohl die Reduziert-Spektren der ganzen Zellen, als auch reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektren der isolierten Membranen aufgenommen und analysiert (s. Material und Methoden 2.11). Aufgrund der mRNA-Spiegel der Gene *cydA*, *cydB*, *qcrB*, *qcrC* und *ctaD* wurden ein erhöhter Gehalt an Cytochrom *d*, ein unveränderter Gehalt von Cytochrom *a* und ein verringerter Gehalt an Cytochrom *c*<sub>1</sub> erwartet. Im Fall von Cytochrom *b* war eine Vorhersage schwierig, da einerseits ein erhöhter Gehalt an Cytochrom-*bd*-Oxidase und andererseits ein verringerter Gehalt an Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex erwartet wurde. In Abb. 11 sind die Reduziert-Cytochromspektren der *C. glutamicum* WT-Zellen (Abb. 11A) und die Reduziert-minus-oxidiert-Spektren der isolierten Membranen (Abb. 11B) aus einer Kultivierung in Standard-CGXII-Medium (schwarz) und in Kupfer-Mangelmedium (blau) dargestellt. In beiden Fällen kann unter Kupfer-limitierenden Bedingungen kein Cytochrom *c* (552 nm) mehr detektiert werden, die Mengen an Cytochrom *b* (circa 560 nm) und Cytochrom *a* (circa 600 nm) sind nahezu unverändert und der Peak für Cytochrom *d* (circa 630 nm) ist nur unter Kupfer-Mangel erkennbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cytochrom-Zusammensetzung in der Atmungskette von *C. glutamicum* unter Kupfer-Mangel verändert ist. Die Veränderungen entsprechen denen, die aufgrund der Transkriptom-Daten erwartet wurden. Auffällig war, dass die Maxima der Peaks von Cytochrom *b* und Cytochrom *a* unter Kupfer-limitierenden Bedingungen um 2 - 3 nm in den kurzwelligen Bereich verschoben waren.



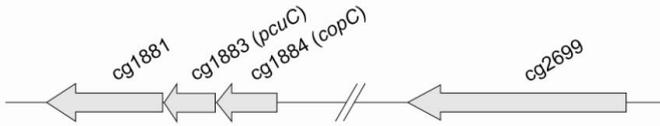
**Abbildung 11:** Cytochromspektren von intakten Zellen (A) und isolierten Membranen (B) der *C. glutamicum*-Stämme WT (durchgezogene Linien) und  $\Delta cg2699$  (gestrichelte Linien), kultiviert unter Standard-CGXII-Bedingungen (schwarz) und unter Kupfer-Mangel-Bedingungen (CGXII-Medium + 150  $\mu$ M BCS + 1 mM Ascorbat) (blau). Die Untersuchung erfolgte für Zellen in der stationären Phase. Die Peaks für Cytochrome c (552 nm), b (562 nm), a (600 nm) und d (630 nm) sind entsprechend gekennzeichnet. Die Cytochromspektren der intakten Zellen sind repräsentiert durch ein beispielhaftes Spektrum aus vier unabhängigen Messungen, die Differenzspektren der isolierten Membranen wurden einmal gemessen.

### 2.3 Charakterisierung von ausgewählten Genen aus dem Kupfer-Mangel-Stimulon von *C. glutamicum*

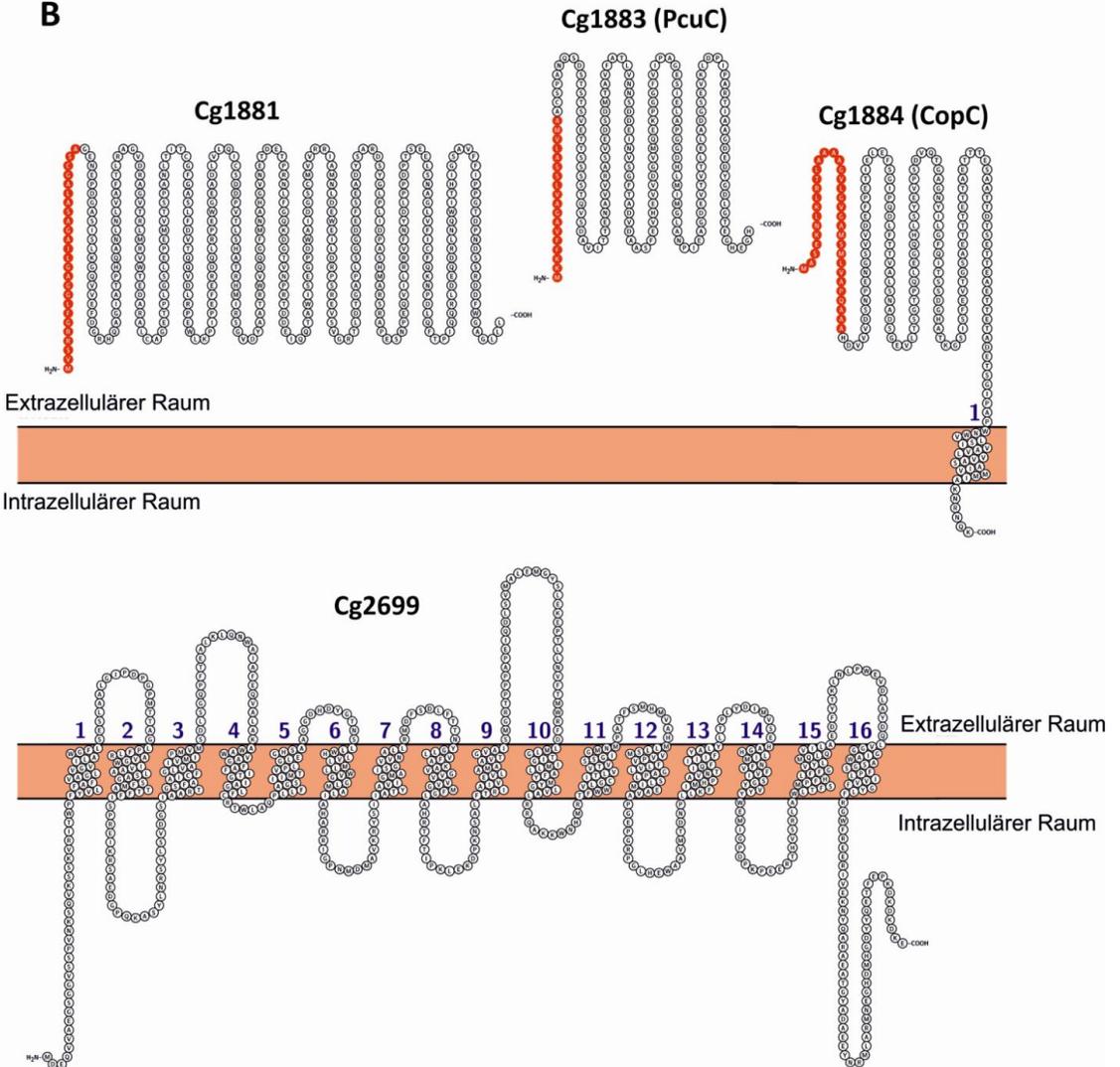
Die Kupfer-Mangel-Antwort von *C. glutamicum* legt nahe, dass Kupfer von den Zellen benötigt wird und es Transportmechanismen zur Beförderung von Kupfer-Ionen zu Kupfer-abhängigen Proteinen gibt. In *C. glutamicum* ist bisher nur die Cytochrom- $aa_3$ -Oxidase als Kupfer-abhängiges Protein bekannt. Bei den Untersuchungen der Effekte des Kupfer-Mangels auf den *C. glutamicum* WT konnten Auswirkungen auf die Atmungskette beobachtet werden, welche einen Zusammenhang zwischen der Kupfer-Bereitstellung und der Funktionsfähigkeit der Cytochrom- $aa_3$ -Oxidase und damit des Cytochrom- $bc_1-aa_3$ -Superkomplexes vermuten ließen. Auf der Suche nach Proteinen, die am Kupfer-Import oder der Kupfer-Assemblierung beteiligt sein könnten, wurden die Transkriptomdaten aus dem Vergleich *C. glutamicum* WT unter Kupfer-Mangel vs. WT in Standard-CGXII-Medium (s. oben) nach Proteinen untersucht, deren Homologe in anderen Organismen an der Kupfer-Homöostase beteiligt sind. Dabei wiesen die Proteine, die von den Genen *cg1883* und *copC* (*cg1884*) kodiert werden, Homologie zu PcuC aus *Bradyrhizobium japonicum* bzw. CopC aus *Pseudomonas syringae* auf. Das PcuC-Protein soll am Einbau von Kupfer in das  $Cu_A$ -Zentrum der

Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase involviert sein (Serventi *et al.*, 2012), während CopC zusammen mit CopD am Kupfer-Import beteiligt sein soll (Puig *et al.*, 2002). Die Suche nach einem CopD-homologen Protein in *C. glutamicum* ergab, dass es eine CopD-Domäne in dem von cg2699-kodierten Protein gibt. Das cg2699-Gen gehört neben cg1883 und *copC* auch zum Kupfer-Mangel-Stimulon von *C. glutamicum*. Neben der CopD-Domäne am N-Terminus wurde im Cg2699-Protein eine C-terminal lokalisierte CtaG-Domäne gefunden (Analyse mit SMART- und PFAM-Proteindatenbanken; <http://smart.embl-heidelberg.de> und <http://pfam.sanger.ac.uk/>). In *Bacillus subtilis* ist das CtaG-Protein an der Assemblierung der Cytochrom-*caa*<sub>3</sub>-Oxidase beteiligt (Bengtsson *et al.*, 2004). Aufgrund seiner Domänen-Zusammensetzung könnte das Cg2699-Protein von *C. glutamicum* eine doppelte Funktion besitzen: als Kupfer-Importer (möglicherweise zusammen mit CopC) und als Assemblierungsfaktor für den Einbau von Kupfer in die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase. Hierfür kämen sowohl das Cu<sub>A</sub>-Zentrum in Untereinheit II (CtaC) als auch das Cu<sub>B</sub>-Zentrum in Untereinheit I (CtaD) in Frage. Das Gen cg2699 kodiert für ein Membranprotein mit 16 postulierten Transmembranhelices, wobei die N-terminale CopD-Domäne die Transmembranhelices 3 - 9 und die C-terminale CtaG-Domäne die Transmembranhelices 10 - 16 umfasst (Sequenzanalyse mit Hilfe der SMART-Datenbank, <http://smart.embl-heidelberg.de>). Die Protein-Topologie ist in Abb. 12 dargestellt (ermittelt mit der Software Protter, <http://wlab.ethz.ch/protter/>). Für eine experimentelle Analyse der Funktion des Cg2699-Proteins wurde die  $\Delta$ cg2699-Deletionsmutante konstruiert (s. Material und Methoden 2.8.13.3) und einer detaillierten Charakterisierung unterzogen.

A



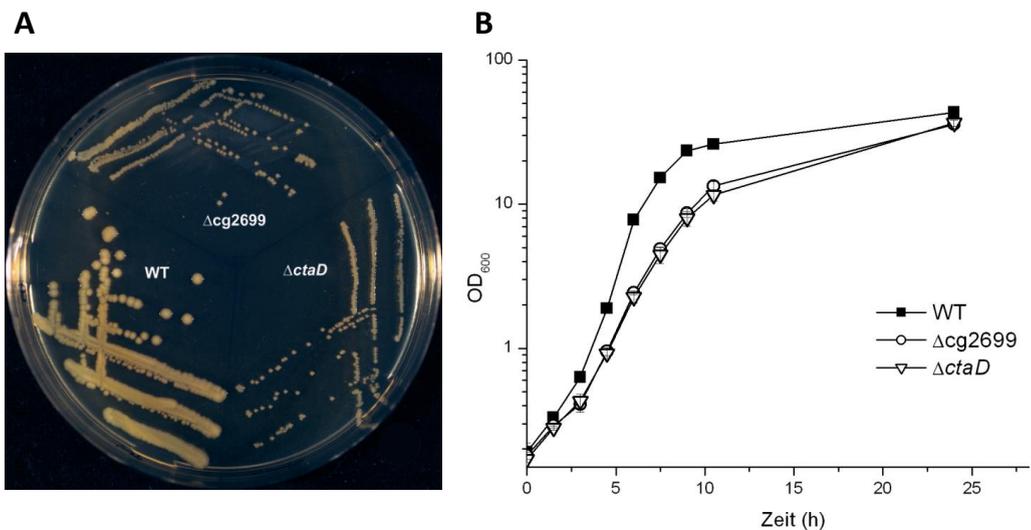
B



**Abbildung 12:** Anordnung der Gene cg1881-cg1884 und cg2699 im Genom von *C. glutamicum* (A) und die vorhergesagte Topologie der Genprodukte Cg1881, Cg1883 (PcuC), Cg1884 (CopC) und Cg2699 (B). Die Topologien wurden mit Hilfe der Software Protter ermittelt (<http://wlab.ethz.ch/protter/>). Putative Signalpeptide, die im nativen Protein fehlen, sind rot gekennzeichnet, die Tansmembranhelices sind durchnummeriert.

### 2.3.1 Wachstumsverhalten der $\Delta cg2699$ -Deletionsmutante

Bereits bei der Konstruktion von  $\Delta cg2699$  war auffällig, dass die Kolonien deutlich kleiner waren als die des Wildtyps (Abb. 13A). Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens sollte zunächst in flüssigem Vollmedium (BHI + 2% (w/v) Glucose) durchgeführt werden, um den beobachteten Wachstumsdefekt auf festem Nährboden zu bestätigen. Neben dem WT diene als Kontrolle der  $\Delta ctaD$ -Stamm, der eine Deletion des *ctaD*-Gens für die Untereinheit I der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase trägt. Im aktiven Zentrum von CtaD (Cu<sub>B</sub>-Zentrum, gekoppelt an Cytochrom *a*<sub>3</sub>) erfolgt die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff (Bott and Niebisch, 2003). Bei einer unterbrochenen Elektronen-Transferkette, die durch eine unzureichende oder völlig fehlende Beladung der Kupfer-Zentren (Cu<sub>A</sub> und Cu<sub>B</sub>) mit Kupfer hervorgerufen wird, sollte der dadurch erzeugte Wachstumsdefekt vergleichbar mit dem des  $\Delta ctaD$ -Stammes sein. Das Wachstum der  $\Delta cg2699$ -Deletionsmutante sowohl auf Agarplatten als auch im flüssigen BHI-Medium + 2% (w/v) Glucose war tatsächlich vergleichbar mit dem der  $\Delta ctaD$ -Deletionsmutante (Abb. 13). Die Wachstumsraten der Deletionsmutanten  $\Delta cg2699$  und  $\Delta ctaD$  waren identisch ( $\Delta cg2699$ :  $0,44 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ ,  $\Delta ctaD$ :  $0,44 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ) und kleiner als die des Wildtyps ( $0,62 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ). Alle drei untersuchten Stämme erreichten nach 30 Stunden Kultivierung eine End-OD<sub>600</sub> von ca. 40 (WT:  $41,53 \pm 1,79$ ,  $\Delta cg2699$ :  $37,43 \pm 3,45$  und  $\Delta ctaD$ :  $39,40 \pm 1,91$ ) (Abb. 13B).

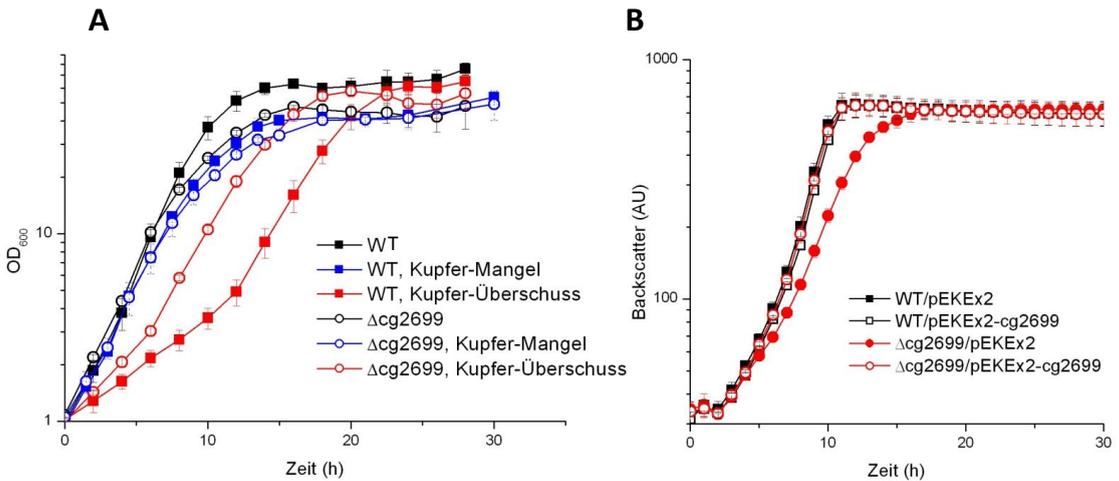


**Abbildung 13:** Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme WT,  $\Delta cg2699$  und  $\Delta ctaD$  auf BHI-Agarplatten (A) und im BHI-Vollmedium + 2% (w/v) Glucose (B). Die BHI-Agarplatten wurden nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C fotografiert. Die Kultivierung der Stämme in BHI-Vollmedium erfolgte in 50 ml-Kolben bei 120 Upm und 30 °C. Die Hauptkulturen wurden von 5 ml Übernachtskulturen (BHI + 2% (w/v) Glucose) auf OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Kultivierungen.

Als nächstes wurde das Wachstumsverhalten der  $\Delta cg2699$ -Mutante in CGXII-Minimalmedium mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen getestet. Für einen Kupfer-Überschuss wurde dem Medium  $100 \mu\text{M CuSO}_4$  zugefügt, für den Kupfer-Mangel erfolgte keine Zugabe von Kupfer und das Medium wurde zusätzlich mit  $150 \mu\text{M BCS}$  und  $1 \text{ mM Ascorbat}$  supplementiert (s. oben). Als Referenzstamm konnte bei den Wachstumsversuchen nur *C. glutamicum* WT verwendet werden, da der  $\Delta ctaD$ -Stamm in CGXII-Glucose-Medium ein extrem schlechtes Wachstum zeigt, das möglicherweise durch Lipidperoxidation verursacht wird (Niebisch, 2002; Koch-Körffges, 2011).

In Standard-CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose zeigte  $\Delta cg2699$  im Vergleich zum *C. glutamicum* WT einen leichten Wachstumsdefekt, vergleichbar mit dem Wachstumsverhalten des WT unter Kupfer-limitierenden Bedingungen. Der Kupfer-Mangel hatte auf das Wachstum von der  $\Delta cg2699$ -Mutante kaum einen Einfluss, bei erhöhten Kupferkonzentrationen erwies sich die Deletionsmutante dagegen deutlich resistenter als der Wildtyp (Abb. 14A). Neben dem Wachstum in Gegenwart von  $100 \mu\text{M CuSO}_4$  wurden auch andere Kupfer-Überschüsse ( $5, 10, 20, 50$  und  $200 \mu\text{M}$ ) getestet. Es konnte eine Verbesserung des Wachstumsverhaltens der  $\Delta cg2699$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp ab einer Konzentration von über  $50 \mu\text{M}$  festgestellt werden. Für die Kupfer-Assemblierungsproteine YpmQ aus *B. subtilis* und PcuC aus *B. japonicum* wurde beschrieben, dass leichter Kupfer-Überschuss im Medium den Phänotyp der jeweiligen Deletionsmutante supprimieren konnte (Mattatall *et al.*, 2000, Serventi *et al.*, 2012). In *C. glutamicum* konnte der Wachstumsdefekt der  $\Delta cg2699$ -Mutante bei den Kupferkonzentrationen von  $5$  und  $10 \mu\text{M}$  nicht behoben werden (Anhang, Abb. A1).

Um die beobachteten Wachstumsunterschiede der  $\Delta cg2699$ -Mutante zum WT auf die Deletion von *cg2699* zurückführen zu können, wurde das Komplementationsplasmid pEKEx2-*cg2699* konstruiert (s. Material und Methoden 2.8.13.2). Die Stämme *C. glutamicum* WT und  $\Delta cg2699$  wurden mit dem Leerplasmid pEKEx2 und pEKEx2-*cg2699* transformiert und in einem Mikrofermenter-System (BioLector, m2p-Labs) in Standard-CGXII-Medium und in Kupfer-Überschuss-Medium kultiviert. Allen Kultivierungsansätzen wurden  $100 \mu\text{M IPTG}$  zur Induktion der Expression des *cg2699*-Gens zugegeben. Die Komplementation wurde sowohl für den Wachstumsdefekt der  $\Delta cg2699$ -Mutante in Standard-CGXII-Medium (Abb. 14B) als auch für die bessere Kupfer-Resistenz in Anwesenheit von  $100 \mu\text{M CuSO}_4$  im Medium beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14:** Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* WT (gefüllte Symbole) und  $\Delta cg2699$  (offene Symbole) in Standard-CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose (schwarz), in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 150  $\mu M$  BCS + 1 mM Ascorbat (blau) und in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 100  $\mu M$   $CuSO_4$  (rot) (A) und Komplementierung des Wachstumsdefekts von  $\Delta cg2699$  (rot) durch eine Plasmidbasierte Expression von *cg2699* (B). Für die Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von *C. glutamicum* mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen (A) erfolgte die Kultivierung der Stämme bei 120 Upm und 30 °C für 30 Stunden in 50 ml Medium in 500 ml Schüttelkolben. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Wachstumsversuchen. Bei den Komplementationsversuchen (B) erfolgte die Kultivierung in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 100 mM IPTG + 25  $\mu g/ml$  Kanamycin im BioLector-System in 800  $\mu l$  Medium bei 1200 Upm und 30 °C. Die Vorkultivierung der Stämme erfolgte in 100 ml Schüttelkolben mit 20 ml CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 25  $\mu g/ml$  Kanamycin. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

### 2.3.2 Transkriptomvergleich $\Delta cg2699$ -Deletionsmutante vs. WT

Die beobachteten Ähnlichkeiten zwischen dem Wachstum des *C. glutamicum* WTs unter Kupfer-Mangel und  $\Delta cg2699$  in Standard-CGXII-Medium könnten gleiche Ursachen haben, darunter mögliche Änderungen in der Atmungskette von *C. glutamicum*. Um das zu überprüfen, wurde ein Transkriptomvergleich zwischen *C. glutamicum* WT und  $\Delta cg2699$  in Standard-CGXII-Medium durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für die DNA-Microarray-Analyse bei  $OD_{600} = 20$  geerntet, damit ein Vergleich zu der Transkriptom-Analyse *C. glutamicum* WT unter Kupfer-limitierenden Bedingungen vs. WT in Standard-CGXII-Medium (s. oben) möglich war. Die Auswertung der Daten aus dem Transkriptomvergleich *C. glutamicum*  $\Delta cg2699$  vs. WT ergab, dass 85 Gene einen mindestens zweifach veränderten mRNA-Spiegel zeigten ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ). Eine Auswahl dieser Gene ist in Tab. 4 gezeigt, eine Auflistung aller veränderten Gene ist im Anhang Tab. A2 dargestellt. Fast die Hälfte der Gene mit einem veränderten mRNA-Spiegel in der  $\Delta cg2699$ -Mutante gehörte zum Kupfer-Mangel-Stimulon, auch die mRNA-Verhältnisse dieser Gene waren mit denen aus dem Transkriptomvergleich

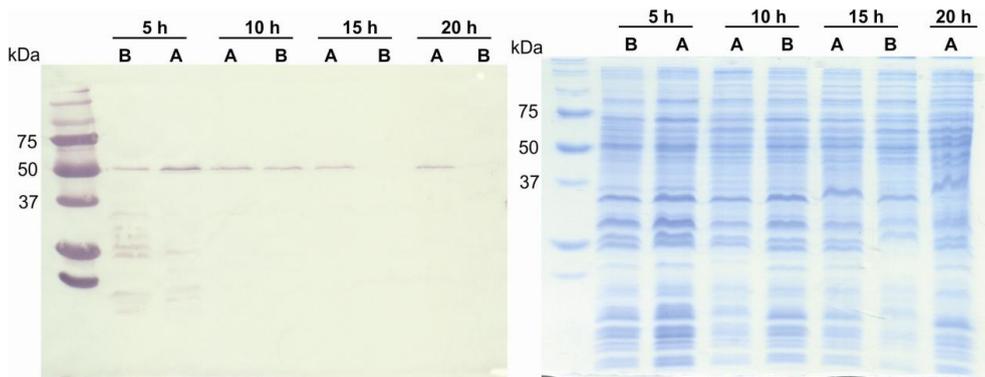
des WT's Kupfer-Mangel/regularäre Kupferkonzentration vergleichbar. Die am stärksten veränderten Gene bei dem Transkriptomvergleich *C. glutamicum*  $\Delta$ cg2699 vs. WT waren die Gene aus dem *cyd*-Operon (8,79- bis 16,09-fach vergrößerter mRNA-Spiegel), Gene aus dem putativen cg1881-1884-Operon (15,37- bis 16,99-fach vergrößerter mRNA-Spiegel) und die beiden Gene *ctaA* und *ctaB* (5,90- und 5,83-fach vergrößerter mRNA-Spiegel), deren Genprodukte an der Bildung von Cytochrom *a* beteiligt sind. Wie erwartet, war der mRNA-Spiegel des cg2699-Gens in der  $\Delta$ cg2699-Mutante 20-fach erniedrigt. Die Ähnlichkeiten der Resultate aus den beiden Transkriptomvergleichen (*C. glutamicum* WT unter Kupfer-Mangel vs. WT bei Standard-CGXII und *C. glutamicum*  $\Delta$ cg2699 vs. WT) lassen vermuten, dass das cg2699-Genprodukt an der Bereitstellung von Kupfer für die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase beteiligt sein könnte.

### 2.3.3 Cytochromspektren der $\Delta$ cg2699-Deletionsmutante

Wie für den Wildtyp unter Kupfer-Mangel wurde für die Deletionsmutante  $\Delta$ cg2699 erwartet, dass sich die veränderten mRNA-Spiegel der Atmungsketten-Gene in einem veränderten Gehalt an den verschiedenen Cytochromen widerspiegeln. Aufgrund der ähnlichen mRNA-Verhältnisse der relevanten Gene wurden dieselben Erwartungen wie für den Wildtyp bei Kupfer-Mangel aufgestellt (s. oben). Es wurden wiederum Reduziert-Cytochromspektren der intakten Zellen als auch Reduziert-minus-oxidiert-Differenzspektren der isolierten Membranen aufgenommen (Abb. 11). Für die Reinigung der Membranen und für die direkte Analyse der Cytochrome wurden Zellen aus der stationären Phase eingesetzt, die in Standard-CGXII-Medium oder und in Kupfer-Mangelmedium kultiviert worden waren. Bei beiden Messansätzen unterschieden sich die Spektren der  $\Delta$ cg2699-Deletionsmutante aus Standard-CGXII-Medium und Kupfer-Mangelmedium nur geringfügig voneinander. Bei den Cytochromspektren der intakten Zellen lag der einzige Unterschied in einem höheren Peak bei 552 nm (Cytochrom *c*) unter Kupfer-limitierenden Bedingungen, ansonsten sahen die Spektren fast identisch aus. Die Reduziert-minus-oxidiert-Spektren der isolierten Membranen waren gleich, die Unterschiede in der Peak-Höhe bei 562 nm (Cytochrom *b*) beruht möglicherweise in der Durchführung der Messung. In einem direkten Vergleich der Cytochromspektren der  $\Delta$ cg2699-Mutante mit den Spektren des Wildtyps unter Kupfer-Mangel fällt auf, dass die Spektren untereinander sehr ähnlich sind. Dies stellt ein weiteres Indiz dar, dass das Cg2699-Protein bei der Versorgung der Zelle mit Kupfer eine wichtige Rolle einnimmt, als möglicher Kupfer-Importer und/oder als Assemblierungsprotein der Kupfer-abhängigen Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase.

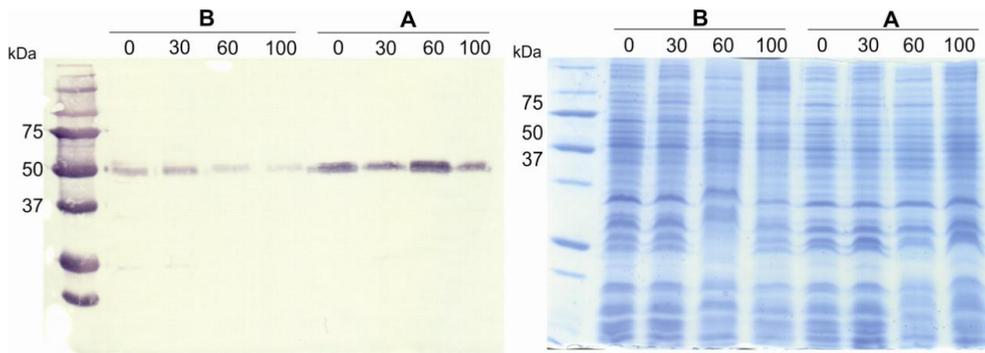
### 2.3.4 Nachweis von CtaD<sub>St</sub> in $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699/pJC1-CtaD<sub>St</sub>

Die bisherigen Untersuchungen der  $\Delta$ cg2699-Deletionsmutante deuten darauf hin, dass durch die Abwesenheit des Cg2699-Proteins bereits unter Standard-Bedingungen eine Kupfer-Mangel-Reaktion ausgelöst wird. Aufgrund der Domänen-Zusammensetzung wurde für Cg2699 neben einer Kupfer-importierenden Funktion (CopD-Domäne) auch eine assemblierende Funktion für die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase (CtaG-Domäne) postuliert (s. oben). Um zu untersuchen, ob Cg2699 tatsächlich an der Assemblierung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase bzw. am Einbau von Kupfer in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum verantwortlich ist, sollte der Zusammenhang zwischen CtaD und Cg2699 näher untersucht werden. Als erstes sollte überprüft werden, ob die Deletion des cg2699-Gens einen Einfluss auf die Menge an CtaD-Protein in der Zellmembran hat. Hierzu wurde die Mutante  $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699 konstruiert, in der sowohl *ctaD* als auch cg2699 deletiert sind (s. Material und Methoden 2.8.13.3). Anschließend wurde dieser Stamm mit dem Plasmid pJC1-CtaD<sub>St</sub> (Niebisch and Bott, 2001) transformiert, um die Bildung eines CtaD-Proteins mit einem C-terminalen Strep-Tag-II zu ermöglichen. Somit können die Auswirkungen der cg2699-Deletion auf die Menge an CtaD<sub>St</sub>-Protein mittels einer Westernblot-Analyse gegen den Strep-Tag während des Wachstums verfolgt werden. Als Kontrolle diente der Stamm  $\Delta$ ctaD/pJC1-CtaD<sub>St</sub> ohne die cg2699-Deletion. Die beiden Stämme wurden in BHI-Medium + 2% (w/v) Glucose kultiviert, in 5-stündigen Abständen geerntet, die Zellmembranen isoliert und die Membranproteine einer Westernblot-Analyse unterzogen (s. Material und Methoden 2.9.1 und 2.9.5). Die berechnete Masse von CtaD<sub>St</sub> beträgt 66,3 kDa, es wurde allerdings zuvor gezeigt, dass die apparente Masse nach einer SDS-PAGE bei ca. 50 kDa liegt (Niebisch, 2002). Zu Beginn der Kultivierung konnte das CtaD<sub>St</sub>-Protein mit einer apparenten Masse von 50 kDa in beiden Stämmen nachgewiesen werden. Nach 15 Stunden konnte aber im Stamm  $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699/pJC1-CtaD<sub>St</sub> kein CtaD<sub>St</sub> mehr detektiert werden. Das zum Westernblot korrespondierende Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigte, dass dieser Unterschied spezifisch für CtaD war, da die Proteinmengen pro Spur vergleichbar waren (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Westernblot-Analyse von Strep-getagtem CtaD in den Stämmen  $\Delta ctaD/pJC1-CtaD_{St}$  (A) und  $\Delta ctaD\Delta cg2699/pJC1-CtaD_{St}$  (B). Die Kultivierung der Stämme erfolgte in BHI-Medium + 2% (w/v) Glucose + 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin bei 30 °C und 120 Upm. Die Zellen wurden nach 5, 10, 15 und 20 Stunden geerntet. Anschließend wurden die Membranen isoliert und nach einer SDS-PAGE (12%-iges Trenngel) entweder einer Westernblot-Analyse mit einem Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (links) oder einer Coomassie-Färbung (rechts) unterzogen. Als Proteinstandards dienten Dual Color Standard für die Westernblot- bzw. Precision Plus Protein Unstained Standard (BioRad) für das Coomassie-gefärbte SDS-Gel.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die *cg2699*-Deletion die Menge an CtaD<sub>St</sub> in der stationären Phase drastisch reduziert. Die Ursache hierfür kann entweder ein schnellerer Abbau oder eine fehlende Neusynthese sein. Um der Frage bzgl. der Stabilität des CtaD<sub>St</sub>-Proteins nachzugehen, wurde den Kulturen von  $\Delta ctaD/pJC1-CtaD_{St}$  und  $\Delta ctaD\Delta cg2699/pJC1-CtaD_{St}$  nach 5 Stunden Inkubation der Transkriptionshemmstoff Rifampicin und der Translationshemmstoff Tetracyclin zugegeben. Vor Zugabe und 30, 60 und 100 min danach wurde die Menge an CtaD<sub>St</sub>-Protein durch eine Westernblot-Analyse untersucht. Wie in Abb. 16 dargestellt, nahm die Menge an CtaD<sub>St</sub>-Protein im Stamm mit der *cg2699*-Deletion relativ rasch ab, während im Stamm mit *cg2699* die Menge deutlich höher war und relativ konstant blieb. Dies deutete darauf hin, dass die Abwesenheit von *Cg2699* zu einem schnelleren Abbau von CtaD führt.



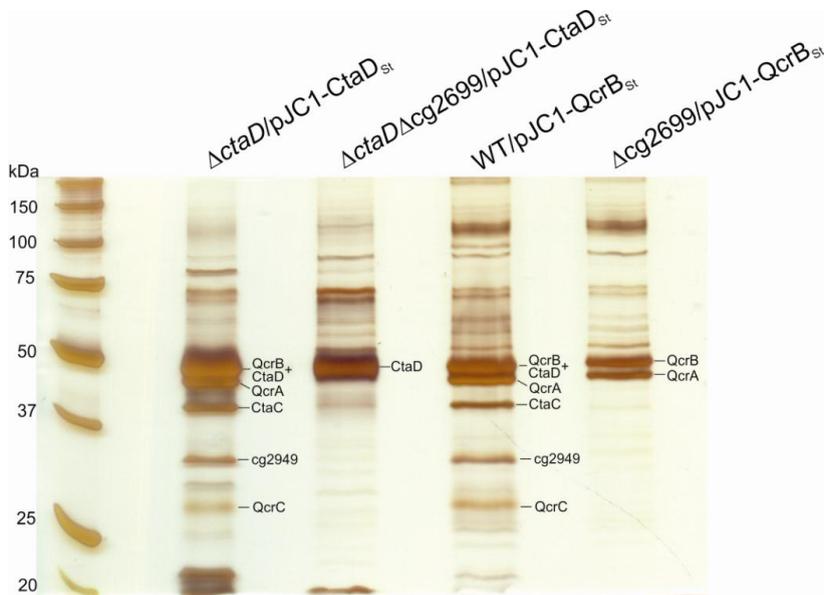
**Abbildung 16:** Westernblot-Analyse (links) und das korrespondierende Coomassie-gefärbte SDS-Gel (rechts) zur Untersuchung der CtaD<sub>St</sub>-Stabilität in den Stämmen  $\Delta ctaD\Delta cg2699/pJC1-CtaD_{St}$  (B) und  $\Delta ctaD/pJC1-CtaD_{St}$  (A). Der Transkriptions- bzw. Translationsstopp wurde durch Zugabe von 100  $\mu M$  Rifampicin, bzw. 50  $\mu M$  Tetracyclin eingeleitet. Die Zellernte erfolgte vor sowie 30, 60 und 100 Minuten nach Zugabe der Antibiotika. Die Membranen wurden isoliert und die Membranproteine in einer SDS-PAGE (12%-iges Trenngel) aufgetrennt. Eines der Gele wurde zur Detektion von CtaD<sub>St</sub> mittels Westernblot-Analyse verwendet, das andere zur Coomassie-Färbung. Als Proteinstandards dienten Dual Color Standard für die Westernblot-Analyse bzw. Precision Plus Protein Unstained Standard (BioRad) für das Coomassie-gefärbte SDS-Gel.

### 2.3.5 Ko-Reinigungsexperimente mit CtaD<sub>St</sub> und QcrB<sub>St</sub>

Um zu überprüfen, ob die Deletion von *cg2699* nicht nur die CtaD-Untereinheit der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase, sondern den Zusammenhalt des ganzen Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes beeinflusst, sollte eine Ko-Reinigung der Komplex-Untereinheiten in dem  $\Delta cg2699$ -Deletionsstamm mittels Strep-getaggtter Untereinheiten erfolgen. Hierzu wurden die Ko-Reinigungsexperimente mit CtaD<sub>St</sub> und QcrB<sub>St</sub> in den Stämmen  $\Delta ctaD\Delta cg2699/pJC1-CtaD_{St}$  und  $\Delta cg2699/pJC1-QcrB_{St}$  nach Niebisch and Bott, 2003 wiederholt. Als Referenzstämmen dienten  $\Delta ctaD/pJC1-CtaD_{St}$  und WT/ $pJC1-QcrB_{St}$ . Die beiden Stämme  $\Delta ctaD\Delta cg2699/pJC1-CtaD_{St}$  und  $\Delta ctaD/pJC1-CtaD_{St}$  enthielten nur die Strep-getaggte Variante des CtaD-Proteins. Die Stämme  $\Delta cg2699/pJC1-QcrB_{St}$  und WT/ $pJC1-QcrB_{St}$  besaßen dagegen neben dem Strep-getaggtten QcrB<sub>St</sub> auch das native QcrB-Protein. Das Plasmid  $pJC1-QcrB_{St}$  enthält das Operon *ctaE-qcrCAB*<sub>St</sub> unter der Kontrolle des nativen Promotors, so dass alle diese Gene in ca. 30-fach erhöhter Kopienzahl in der Zelle vorlagen (Niebisch and Bott, 2003). Da CtaD<sub>St</sub> in der stationären Wachstumsphase in der  $\Delta cg2699$ -Mutante nicht mehr nachweisbar war (s. oben), erfolgte die Zellernte aller vier Stämme bei einer OD<sub>600</sub> = 2,5. Nach dem Zellaufschluss und der Isolation der Membranen wurden die Strep-getaggtten Proteine mittels Strep-Tactin-Chromatographie aufgereinigt. Die Proteine in den Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und die Proteinbanden nach tryptischen Verdau anhand ihres

Peptidmassenfingerprints durch MALDI-ToF-MS identifiziert. Um einen sensitiveren Protein-Nachweis zu ermöglichen, wurden die SDS-Gele parallel einer Silberfärbung unterzogen.

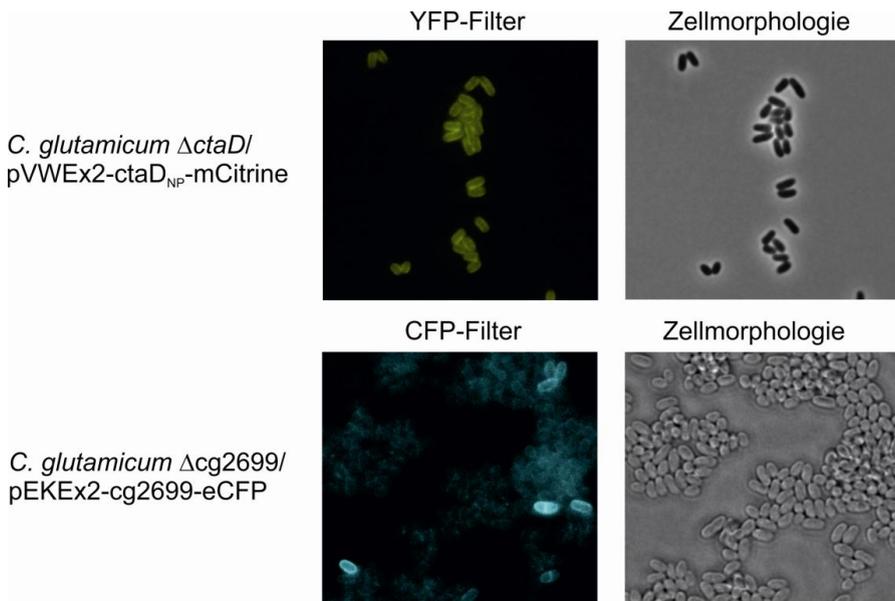
In den Elutionsfraktionen der Referenzstämmen entsprach das Bandenmuster dem Ko-Reinigungsprofil von CtaD<sub>St</sub> und QcrB<sub>St</sub> in den Studien von Niebisch and Bott, 2003. Die Proteine mit niedrigerer apparanter Masse konnten zwar nicht identifiziert werden, aber die Untereinheiten QcrB, CtaD, QcrA, CtaC und QcrC waren nachweisbar. In der Spur mit den durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteinen aus dem Stamm  $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699/pJC1-CtaD<sub>St</sub> konnte nur das CtaD-Protein und in der Spur mit  $\Delta$ cg2699/pJC1-QcrB<sub>St</sub> nur die Proteine QcrA und QcrB identifiziert werden (Abb. 17). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Fehlen von cg2699 nicht nur zu einem schnelleren Abbau von CtaD führt, sondern auch die Bildung des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes verhindert. Diese Resultate unterstützten stark die Hypothese, dass das Cg2699 Protein an der Reifung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase beteiligt ist. Eine fehlerhafte Assemblierung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase führt anscheinend zu einer Instabilität des ganzen *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Komplexes.



**Abbildung 17:** Ko-Reinigungsexperimente mit CtaD<sub>St</sub> und QcrB<sub>St</sub> aus den Stämmen  $\Delta$ ctaD/pJC1-CtaD<sub>St</sub>,  $\Delta$ ctaD $\Delta$ cg2699/pJC1-CtaD<sub>St</sub>, WT/pJC1-QcrB<sub>St</sub> und  $\Delta$ cg2699/pJC1-QcrB<sub>St</sub> (von links nach rechts). Nach der Strep-Tactin-Chromatographie wurden die Elutionsfraktionen vereint und aufkonzentriert. Je ca. 10  $\mu$ g Protein wurden in einer SDS-PAGE (12%-iges Trenngel) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend silbergefärbt. Als Proteinstandard wurde Precision Plus Protein Unstained (BioRad) verwendet. Parallel dazu wurden dieselben Proben auf ein weiteres SDS-Gel geladen, welches nach der Elektrophorese Coomassie-gefärbt wurde. Die angefärbten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau einer Peptidfingerprint-Analyse mittels MALDI-ToF-MS unterzogen. Die dabei identifizierten Proteine sind entsprechend beschriftet.

### 2.3.6 Vorbereitungen für FRET zum Nachweis einer Interaktion zwischen CtaD und Cg2699

Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen den Proteinen Cg2699 und CtaD würde die Hypothese weiterstärken, dass Cg2699 am Einbau von Kupfer in das CuB-Zentrum von CtaD beteiligt ist. Eine direkte Interaktion beider Proteine könnte möglicherweise durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Experiment nachgewiesen werden. Dazu sollten als Donor ein Fusionsprotein aus Cg2699 und eCFP und als Akzeptor ein Fusionsprotein aus CtaD und mCitrine verwendet werden. Hierzu wurden die Plasmide pEKEx2-cg2699-eCFP und pVWEx2-CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine konstruiert (s. Material und Methoden, 2.8.13.2), welche für die Fusionsproteine Cg2699-eCFP und CtaD-mCitrine kodieren. Für die Konstruktion von pEKEx2-cg2699-eCFP wurde das *eCFP*-Gen nach dem Stoppkodon von *cg2699* im pEKEx2-cg2699-Plasmid eingefügt. Anschließend wurde das Stoppcodon mittels ortsgerichteter Mutagenese verändert, sodass die Gene *cg2699* und *eCFP* zusammen transkribiert werden und das Fusionsprotein Cg2699-eCFP gebildet werden kann. Die Expression von Cg2699-eCFP steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und kann durch IPTG-Zugabe induziert werden. Das Plasmid pVWEx2-CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine wurde mit Hilfe der In-Fusion-Klonierungsmethode konstruiert, wobei die Gene *ctaD* und *mCitrine* in einer Reaktion mit dem Vektor pVWEx2 vereint wurden. Die Expression von CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine kann über den nativen Promotor vor dem *ctaD*-Gen erfolgen. Die Funktionalität der Fusionsproteine wurde durch Komplementation des Wachstumsdefektes, den die Stämme  $\Delta$ *ctaD* und  $\Delta$ *cg2699* in BHI-Medium + 2% (w/v) Glucose zeigen, nachgewiesen. Sowohl  $\Delta$ *ctaD*/pVWEx2-CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine als auch  $\Delta$ *cg2699*/pEKEx2-cg2699-eCFP wuchsen wie der WT (nicht gezeigt). Eine mikroskopische Untersuchung der beiden Stämme konnte die erfolgreichen Synthese der Fusionsproteine CtaD<sub>NP</sub>-mCitrine und Cg2699-eCFP sowie ihre Lokalisation in der Membran bestätigen (Abb. 18). Damit sind die Voraussetzungen für die FRET-Messungen erfüllt. Für die spätere FRET-Messung wurden beide Plasmide in den Stamm  $\Delta$ *ctaD* $\Delta$ *cg2699* transformiert.



**Abbildung 18:** Mikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der Stämme  $\Delta$ ctaD/pVWEx2-ctaD<sub>NP</sub>-mCitrine und  $\Delta$ cg2699/pEKEx2-cg2699-eCFP. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in BHI-Medium + 2% (w/v) Glucose + 25  $\mu$ g/ml Kanamycin + 100  $\mu$ M IPTG für  $\Delta$ cg2699/pEKEx2-cg2699-eCFP bzw. + 3  $\mu$ M Tetracyclin für  $\Delta$ ctaD/pVWEx2-ctaD<sub>NP</sub>-mCitrine.

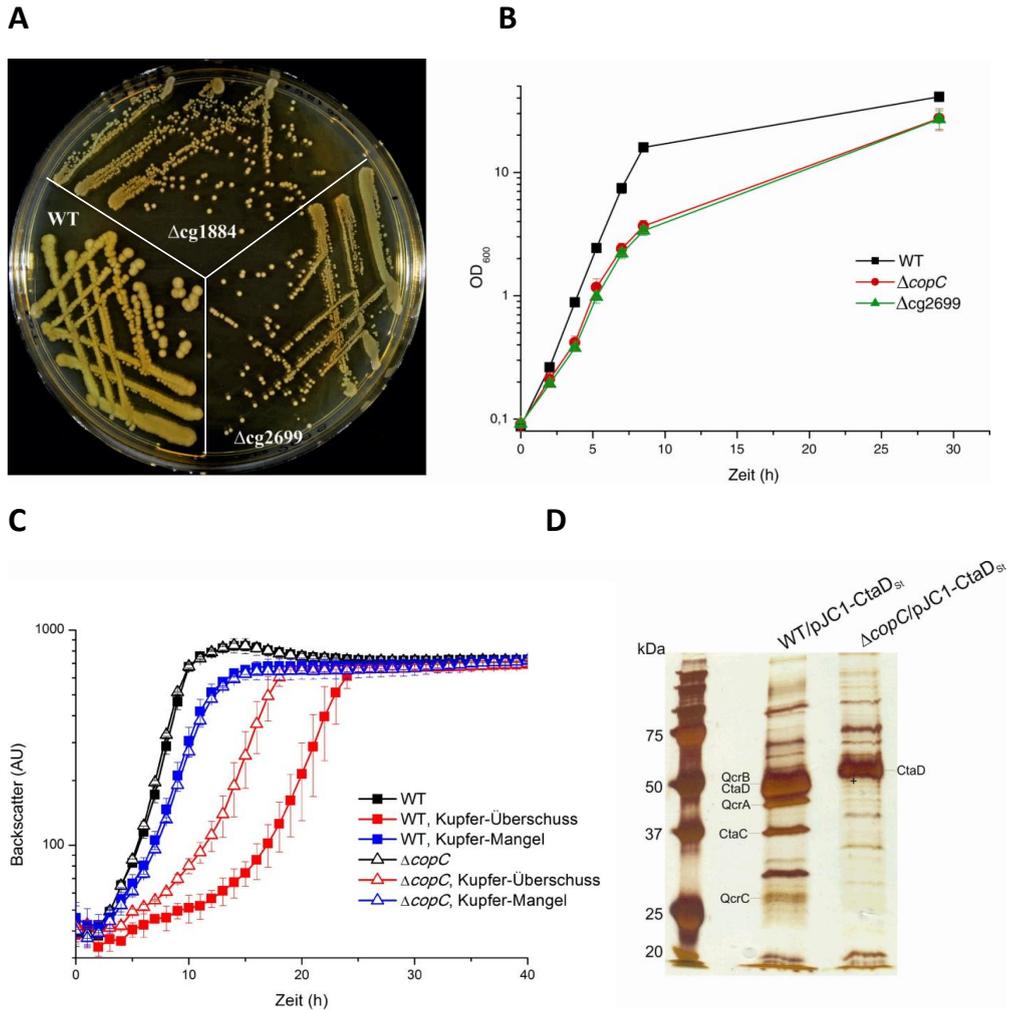
### 2.3.7 Charakterisierung der $\Delta$ copC-Deletionsmutante

Bei den Transkriptomvergleichen wurde ein erhöhter mRNA-Spiegel für die Gene aus dem Operon cg1881-cg1884 beobachtet. Das Gen cg1884 kodiert für ein Protein, welches homolog zu CopC-Proteinen aus anderen Organismen ist. Die Sequenzanalyse des CopC-Proteins ergab, dass sich am N-Terminus ein Signalpeptid befindet, welches eine Sekretion des Proteins vermuten lässt. Am C-Terminus von CopC wurde eine Transmembranhelix vorhergesagt, die für eine Verankerung in der Cytoplasmamembran zuständig sein könnte (Abb. 12C). Das Protein Cg2699 besteht aus zwei Domänen, CopD und CtaG, wobei die CopD-Domäne bzw. das CopD-Protein in anderen Organismen als Bestandteil eines Kupfer-importierenden Systems beschrieben wurde. Sowohl in *P. syringae* als auch in *B. subtilis* ist ein funktioneller Zusammenhang der beiden Proteine bzw. Domänen CopC und CopD beschrieben worden (s. Einleitung 2). In *C. glutamicum* liegen die Gene, die für CopC und Cg2699 kodieren, im Gegensatz zu anderen Organismen nicht in unmittelbarer Nähe im Genom (Abb. 12A). Da beide Gene im Kupfer-Mangel-Stimulon einen stark erhöhten mRNA-Spiegel zeigten, ist ein funktioneller Zusammenhang trotzdem möglich. Um dies zu überprüfen, wurde die  $\Delta$ copC-Deletionsmutante konstruiert und auf Wachstum unter Kupfer-limitierenden Bedingungen und unter Kupfer-Stress sowie in Vollmedium untersucht. Darüber hinaus wurden die Ko-

Reinigungsexperimente mit CtaD<sub>St</sub> in den Stämmen  $\Delta copC/pJC1-CtaD_{St}$  und WT/pJC1-CtaD<sub>St</sub> durchgeführt.

Ebenso wie bei der Konstruktion der  $\Delta cg2699$ -Deletionsmutante wurden bei der *copC*-Gendeletion auffällig kleine Kolonien nach der zweiten Rekombination beobachtet (Abb. 19A). Auf den BHI-Agarplatten dauerte es ca. zwei Tage bis die Kolonien gewachsen waren und in den Flüssigkulturen ähnelte das Wachstum der  $\Delta copC$ -Deletionsmutante dem der Stämme  $\Delta ctaD$  und  $\Delta cg2699$  (Abb. 19B). Die  $\Delta copC$ -Deletionsmutante (Wachstumsrate  $0,45 \pm 0,00 \text{ h}^{-1}$ ) wuchs langsamer als der WT (Wachstumsrate  $0,63 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) und erreichte eine geringere End-OD<sub>600</sub> als der WT ( $27 \pm 6$  vs.  $41 \pm 4$ ). Aufgrund der Wachstumsergebnisse in Vollmedium wurde erwartet, dass die  $\Delta copC$ -Deletionsmutante im Standard-CGXII-Minimalmedium, wie der  $\Delta cg2699$ -Stamm, den Kupfer-Mangel-Phänotyp des Wildtyps zeigt. Jedoch wuchs die  $\Delta copC$ -Mutante unter diesen Bedingungen wie der WT (Abb. 19C). Auch unter Kupfer-limitierenden Bedingungen wurden keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt, nur bei einer Kultivierung mit einem Kupfer-Überschuss wurde ein verbessertes Wachstum im Vergleich zum WT beobachtet (Abb. 19C). Die  $\Delta copC$ -Mutante konnte mit dem Kupfer-Stress besser umgehen als der WT, ähnlich wie es auch für die  $\Delta cg2699$ -Deletionsmutante beobachtet wurde. Die bessere Kupfer-Stress-Resistenz könnte ein Indiz dafür sein, dass das CopC-Protein am Kupfer-Import beteiligt ist und möglicherweise aufgrund der vorhergesagten Topologie Kupfer für den Transport bereitstellt. Als nächstes wurde der Ko-Reinigungsversuch mit der  $\Delta copC$ -Deletionsmutante durchgeführt, um evtl. Ähnlichkeiten zum  $\Delta cg2699$ -Stamm zu detektieren. Hierzu wurde das Plasmid pJC1-CtaD<sub>St</sub> in die Stämme  $\Delta copC$  und WT transferiert. Die Strep-Tactin-Chromatographie zur Reinigung von CtaD<sub>St</sub> ergab für den Wildtyp das typische Ko-Reinigungsmuster mit den Proteinen QcrB, CtaD, QcrA, CtaC und QcrC (s. oben). Dagegen konnte im Eluat der  $\Delta copC$ -Mutante nur CtaD identifiziert werden. Außer CtaD war auch eine Bande auf der Höhe von CtaC schwach erkennbar, diese konnte aber mittels MALDI-ToF-MS-Analyse nicht identifiziert werden. Allerdings war deutlich zu sehen, dass die Proteine QcrA und QcrB in der  $\Delta copC$ -Mutante nicht mit CtaD<sub>St</sub> ko-gereinigt wurden (Abb. 19D). Demnach verhindert die Deletion des *copC*-Gens ebenso wie die  $\Delta cg2699$ -Deletion die Bildung eines stabilen Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplexes.

Die Ergebnisse aus der Charakterisierung der  $\Delta copC$ -Deletionsmutante führen zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen: im Gegensatz zur  $\Delta cg2699$ -Mutante zeigt der  $\Delta copC$ -Stamm keinen Kupfer-Mangel-Phänotyp, ist aber wie die  $\Delta cg2699$ -Mutante resistenter gegenüber Kupfer-Stress. Darüber hinaus ist CopC essentiell für die Assemblierung eines stabilen Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplexes. Das CopC-Protein könnte zusammen mit Cg2699 sowohl für den Kupfer-Import als auch für die Reifung der Cytochrom-*aa<sub>3</sub>*-Oxidase verantwortlich sein.



**Abbildung 19:** Wachstum der  $\Delta copC$ -Deletionsmutante auf BHI-Agarplatten (A), in BHI-Vollmedium + 2% (w/v) Glucose (B), in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  bzw. + 150  $\mu\text{M}$  BCS + 1 mM Ascorbat (C) und Ko-Reinigungsexperiment mit  $\text{CtaD}_{\text{St}}$  aus der  $\Delta copC$ -Deletionsmutante (D). Die BHI-Agarplatten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert, die Kultivierung in BHI-Medium erfolgte in 500 ml-Kolben bei 30 °C und 120 Upm. Das Wachstum in CGXII-Medium bei Kupfer-Überschuss und Kupfer-Mangel-Bedingungen wurde mittels des BioLector-Systems verfolgt. Dabei wurden die Kulturen in 800  $\mu\text{l}$ -Ansätzen in 48-well-Flower-Platten bei 30 °C und 1200 Upm im BioLector kultiviert. Die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie zur Ko-Reinigung mit  $\text{CtaD}_{\text{St}}$  wurde für die Stämme WT/pJC1- $\text{CtaD}_{\text{St}}$  und  $\Delta copC$ /pJC1- $\text{CtaD}_{\text{St}}$  durchgeführt. Es wurden ca. 10  $\mu\text{g}$  Protein aus den vereinigten und aufkonzentrierten Elutionsfraktionen auf das 12%-iges SDS-Gel aufgetragen, welches nach der Elektrophorese silbergefärbt wurde. Als Proteinstandard wurde Precision Plus Protein Unstained (BioRad) verwendet. Parallel dazu wurden dieselben Proben auf ein weiteres SDS-Gel geladen, aus welchem nach Coomassie-Färbung die Proteinbanden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau einer MALDI-ToF-MS-Analyse unterzogen wurden. Die dabei identifizierten Proteine sind entsprechend beschriftet.

## Diskussion

### 1. Strukturelle Untersuchungen der Sensorkinase CopS

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren konnte bisher keine Struktur einer kompletten Sensorkinase gelöst werden. Die strukturellen Untersuchungen einzelner oder mehrerer Domänen von verschiedenen Sensorkinasen haben zum Verständnis des Wirkmechanismus beigetragen, es ist jedoch nicht gelungen, ein umfassendes Modell zur Signalübertragung einer membrangebundenen Sensorkinase zu postulieren. In dieser Arbeit sollte durch Kristallisation der Sensorkinase CopS und Festkörper-NMR eines in Proteoliposomen rekonstituierten verkürzten CopS-Derivats versucht werden, Einblicke in den Signaltransduktionsmechanismus dieser Histidinkinase zu gewinnen. CopS aus dem Zweikomponenten-System CopSR von *C. glutamicum* ist für die Erkennung toxischer Kupferkonzentrationen und die Auslösung einer entsprechenden Stress-Antwort verantwortlich.

Bei dem Versuch, die Struktur der Sensorkinase CopS mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen, konnte das vollständige CopS-Protein mit drei zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren ( $N_{\text{GHM}}\text{CopS}$ ) zwar kristallisiert werden, aber die Kristalle waren unzureichend für eine Strukturauflösung. Andere membrangebundene als auch lösliche CopS-Derivate konnten trotz vieler Ansätze nicht erfolgreich kristallisiert werden. Möglicherweise besitzt CopS eine zu hohe Mobilität, welche auf der modularen Domänen-Zusammensetzung und deren Bewegungen bei der Signalübertragung basiert. Alle Versuche diese Flexibilität zu reduzieren, nämlich (i) durch Zugabe von AMP-PNP zu den Kristallisationsansätzen, (ii) durch die Kristallisation von nicht phosphorylierbaren CopS-Derivaten  $N_{\text{GHM}}\text{CopS-H153A}$ ,  $N_{\text{GHM}}\text{CopS-H153E}$ ,  $\text{H}_3\text{-CopS-H153A}$  und  $\text{H}_3\text{-CopS153E}$  oder (iii) durch den Versuch, die lösliche Domäne von CopS mit CopR ko-zu-kristallisieren, führten auch nicht zur Bildung von Kristallen. Möglicherweise könnte eine Modifizierung der Proteinoberfläche zu einer erfolgreichen Kristallisation von CopS führen. Es wurde beschrieben, dass eine Reduzierung der Oberflächenentropie mit Hilfe eines gezielten Austauschs von Glutamat-, Lysin- und auch Glutamin-Resten gegen einen Alanin- oder in seltenen Fällen einen Arginin-Rest den Kristallisationsprozess begünstigen kann (Derewenda and Vekilov, 2006). Eine Untersuchung der CopS-Aminosäuresequenz mit dem Programm SERp (Surface Entropy Reduction prediction, <http://services.mbi.ucla.edu/SER>) hat ergeben, dass drei Cluster von Punktmutationen zu einer Reduzierung der Oberflächenentropie von CopS führen könnten: (i) E215A und E216A, (ii) Q367A und E368A, und (iii) E48A. Bei dem SERp-Programm wird zunächst eine Vorhersage zur Sekundärstruktur einer Aminosäuresequenz gemacht, das Entropie-Profil der Seitenketten berechnet und mit den bekannten homologen Sequenzen verglichen. Anschließend werden die potentiellen Kandidaten

unter den Aminosäuren ausgewählt, die vorzugsweise nicht konserviert sind, hohe Entropie-Werte besitzen und in einer Oberflächen-exponierten, Entropie-reichen Region liegen (Goldschmidt *et al.*, 2007). Darüber hinaus könnten die Erfolgchancen bei der Kristallisation von CopS durch eine Methylierung von exponierten Lysin-Resten erhöht werden. Hierbei werden die Kontakte zwischen den Proteinmolekülen begünstigt, die für eine Kristallbildung notwendig sind (Walter *et al.*, 2006, Sledz *et al.*, 2010). Allerdings ist das CopS-Protein mit nur zwei Lysin-Resten in der Sequenz (K236 und K336) für diese Methode nicht gut geeignet.

Die postulierte hohe Mobilität des Proteins wirkte sich auch auf die Festkörper-NMR-Messung der Proteoliposomen mit dem rekonstituierten CopS-Derivat  $N_{\text{GHM}}\text{CopS}_{206}$  aus. Im gemessenen Spektrum konnten nur die Aminosäuren aus den Transmembranhelices identifiziert werden. Die löslichen Teile des Proteins konnten nicht erfasst werden. Um auch die löslichen Komponenten der Probe im Spektrum sichtbar zu machen, sollte die Mobilität der Proteine in Proteoliposomen verringert werden. Dies könnte durch eine Absenkung der Messtemperatur oder durch Nutzung von kompatiblen Soluten wie Betain oder Trehalose erreicht werden. Das Einsetzen von Trehalose könnte dazu führen, dass bei der gegebenen Messtemperatur die Proteinmobilität herabgesetzt wird (Tang *et al.*, 2007). Wenn die Messung des rekonstituierten CopS-Derivats erfolgreich ist, könnte die Anordnung der Transmembranhelices in der Membran geklärt werden. Desweiteren könnte man über eine Zugabe von Kupfer-Ionen, die als Reiz für CopS postuliert werden, die Dynamik der Signalübertragung, bzw. die dynamische Verschiebung der beiden Transmembranhelices, über die Membran beobachten. Hierzu sollten die Spektren mit und ohne Kupfer-Ionen miteinander verglichen werden.

Es konnte bisher jedoch nicht experimentell nachgewiesen werden, dass Kupfer-Ionen tatsächlich direkt von CopS gebunden werden und die Autophosphorylierung auslösen (Schelder, Schuplezow, nicht gezeigte Daten). Einige Kupfer-detektierende Sensorkinasen wie CinS aus *Pseudomonas putida*, CusS aus *E. coli* und CopS aus *Pseudomonas syringae* (Quaranta *et al.*, 2009, Gudipaty *et al.*, 2012, Mills *et al.*, 1993) weisen Sequenzähnlichkeiten in deren Sensor-Domänen auf und besitzen konservierte Histidin- und Methionin-Reste, die an der Kupfer-Bindung beteiligt sein könnten. Für CinS aus *P. putida* sind das die Histidin-Reste H37 und H147 (Quaranta *et al.*, 2009). Für die Kupfer-detektierende Sensorkinase CopS aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde gezeigt, dass die gereinigte Sensor-Domäne, die keine Sequenzähnlichkeit zu den anderen Kupfer-detektierenden Sensorkinasen aufweist, *in vitro* mit hoher Affinität Cu(II) binden kann ( $K_D = 2,3 \cdot 10^{-19}$ ) (Giner-Lamia *et al.*, 2012). Dies deutet auf eine Diversität der Kupfer-Erkennungsmechanismen unter den Kupfer-detektierenden Sensorkinasen hin. Die Sensor-Domäne von CopS aus *C. glutamicum* kann aufgrund ihrer geringen Länge nicht direkt mit den anderen Sensor-Domänen der Kupfer-detektierenden

Sensorkinasen verglichen werden (s. Einleitung 3.1.1.). Die Histidin-Reste H41 und H56, die an der Signalerkennung beteiligt sind, haben gleiche Entfernungen zu der ersten bzw. der zweiten Transmembranhelix wie die Histidin-Reste H37 und H147 von CinS aus *Pseudomonas putida* und könnten ebenfalls eine Kupfer-Bindestelle bilden. Eine direkte Kupfer-Bindung von CopS konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Schelder, 2011). Für mehrere Sensorkinasen aus Zweikomponentensystemen wurde beschrieben, dass die Signalerkennung mit Hilfe anderer Proteine stattfinden kann (Zhou *et al.*, 2011, Appia-Ayme *et al.*, 2011, Moore and Hendrickson, 2012). Oft sind es Transporter-Proteine, die durch eine Interaktion mit den entsprechenden Sensorkinasen eine Signalerkennung auslösen (Gebhard and Mascher, 2011, Witan *et al.*, 2012). Für CopS aus *C. glutamicum* kann die Möglichkeit einer Interaktion mit einem anderen Protein, welches die Signalerkennung unterstützt, nicht ausgeschlossen werden. Als potentielle Kandidaten kamen zunächst Proteine infrage, die von den Genen aus dem *cop*-Operon in unmittelbarer Nachbarschaft zum *copS*-Gen kodiert werden. Diese wurden einzeln deletiert und es wurde untersucht, ob eine der Deletionen einen Einfluss auf die relative Aktivität des Antwortregulators CopR und somit auf die Signal-Erkennung durch die Sensorkinase CopS ausübt. Alle Deletionsmutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in der Aktivierung der Transkription der CopR-Zielgene. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass ein potentieller Interaktionspartner von CopS von einem der Gene aus dem *cop*-Operon kodiert wird (Schelder, 2011). Darüber hinaus konnte bei einer Reinigung des CopS-Proteins aus *C. glutamicum*-Zellen kein Interaktionspartner ko-gereinigt werden (Schelder, 2008). Dies ist zwar ein Indiz, dass kein weiteres Protein an der Signalerkennung von CopS beteiligt ist, aber wenn ein potentieller CopS-Interaktionspartner ebenfalls ein membranständiges Protein ist, könnte eine Interaktion beider Proteine während der Solubilisierung gestört oder durch die Anwesenheit der Detergenzien an hydrophoben Proteinoberflächen verhindert werden. Ein potentieller Interaktionspartner könnte das in der Membran verankerte CopC-Protein sein. In *P. syringae* liegt das *copC*-Gen im selben Operon mit den *copSR*-Genen für das Zweikomponenten System CopSR und könnte nicht nur den Kupfer-Importer CopD, sondern auch den Kupfer-Exporter CopB, die Multikupfer-Oxidase CopA und die Sensorkinase CopS mit Kupfer-Ionen beliefern (Zhang *et al.*, 2006). Wenn das CopC-Protein in *C. glutamicum* an der Signalerkennung von CopS beteiligt ist, könnte eine *in vitro* Analyse der extracytoplasmatischen Domäne von CopC mit CopS eine Interaktion zwischen den beiden Protein zeigen. Außerdem könnten weitere Proteine aus dem Kupfer-Proteom in *C. glutamicum* als Interaktionspartner von CopS fungieren (Schuplezow, 2009, Schelder, 2011). Die Fragen nach der Signalerkennung von CopS und der anschließenden Weiterleitung des Signals über die Membran bleiben weiterhin spannend.

## 2. Bedeutung von Kupfer-Mangel für *C. glutamicum*

Die Kupfer-Homöostase ist für Organismen von großer Bedeutung und wird daher streng reguliert, so dass die Zellen sowohl mit Kupfer-Überschuss als auch mit Kupfer-Mangel umgehen können. Bei erhöhten Konzentrationen wirkt Kupfer toxisch, indem es zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies führt. Um der Toxizität von Kupfer entgegenzuwirken, haben Mikroorganismen eine Reihe an Resistenz-Mechanismen entwickelt, wie bspw. einen verstärkten Kupfer-Export oder den Einsatz von Multikupfer-Oxidasen oder Kupfer-Chaperonen (Rensing and Grass, 2003, Argüello *et al.*, 2013, Solioz *et al.*, 2010). Bei Kupfer-Mangel werden Kupfer-abhängige Enzyme wie die Cytochrom-*c*-Oxidase nicht ausreichend mit Kupfer-Ionen versorgt, wodurch Beeinträchtigungen für das Wachstum entstehen können (Rensing and McDevitt, 2013). Die Anpassung von Bakterien an Kupfer-limitierende Bedingungen ist bisher wenig untersucht (Frangipani *et al.*, 2008, Serventi *et al.*, 2012). Als Bodenbakterium kann *C. glutamicum* sowohl Kupfer-Überschuss als auch Kupfer-limitierenden Bedingungen ausgesetzt sein. Die Bedeutung von Kupfer-Stress für *C. glutamicum* wurde in mehreren Studien gezeigt (Zaade, 2007, Schelder, 2008, Schelder 2011, Schelder *et al.*, 2011, Teramoto *et al.*, 2012). Erste Studien zur Untersuchung von Kupfer-Mangel in *C. glutamicum* zeigten, dass Kupfer-Ionen aus dem Medium während des Wachstums aufgenommen und in Biomasse eingebaut werden (Schuplezow, 2009). Der Kupfergehalt der Biotrockenmasse von *C. glutamicum* beträgt 0,056 mg/g bei Zellen aus einem synthetischen Nährmedium und 0,003 mg/g bei Zellen aus einem Komplexmedium (Liebl, 2005). Eine Kupfer-Limitierung verursachte eine leichte Beeinträchtigung des Wachstums des *C. glutamicum* WT und einen stärkeren Wachstumsdefekt bei der  $\Delta$ *cydAB*-Mutante ohne die Kupfer-unabhängige Cytochrom-*bd*-Oxidase (Schuplezow, 2009). In dieser Studie wurden die Untersuchungen zur Charakterisierung der Kupfer-Mangel-Antwort bzw. des Kupfer-Mangel-Phänotyps von *C. glutamicum* fortgeführt.

Das Kupfer-Mangel-Stimulon des *C. glutamicum* WT wurde durch einen Transkriptomvergleich vom *C. glutamicum* WT unter Kupfer-limitierenden Bedingungen (mit BCS zur spezifischen Komplexierung von Kupfer-Ionen) vs. *C. glutamicum* WT ermittelt. Dabei zeigte sich, dass unter Kupfer-Mangel viele Gene, die für Proteine von Atmungskettenkomponenten bzw. deren Assemblierung kodieren, einen veränderten mRNA-Spiegel aufweisen. Eine unzureichende Versorgung der Kupfer-abhängigen Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase mit Kupfer-Ionen führt anscheinend dazu, dass die Funktion des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes beeinträchtigt ist und die Kupfer-unabhängige Cytochrom-*bd*-Oxidase unter Kupfer-Mangel eine größere Rolle spielt. Dies wurde auch durch die Ergebnisse der Cytochromspektren-Analyse unterstützt, wobei unter Kupfer-limitierenden Bedingungen mehr Cytochrom *d* nachgewiesen wurde, welches nur in der Cytochrom-*bd*-Oxidase vorkommt. Ein ähnliches Ergebnis wurde für *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet: eine Kupfer-

unabhängige Oxidase wurde unter Kupfer-limitierenden Bedingungen essentiell für das Wachstum, während die Gene für die Untereinheiten einer von vier Kupfer-abhängigen Oxidasen im Transkriptomvergleich Kupfer-Mangel vs. Standard-Bedingungen verringert exprimiert wurden (Frangipani *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie mit *Bradyrhizobium japonicum* wurden ebenfalls durch Kupfer-Mangel ausgelöste Änderungen auf der Transkriptomebene untersucht (Serventi *et al.*, 2012). Dabei wurde ein durch Kupfer-Mangel induziertes Operon entdeckt, dessen Genprodukte an der Bereitstellung von Kupfer für die Kupfer-abhängigen Enzyme beteiligt sind. Insbesondere das Protein PcuC, kodiert vom *pcuC*-Gen aus dem genannten Operon, soll unter Kupfer-Mangel für den Einbau von Kupfer in das Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase und möglicherweise auch in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Cytochrom-*cbb*<sub>3</sub>-Oxidase zuständig sein (s. unten). Bei der Analyse des Kupfer-Mangel-Stimulons von *C. glutamicum* wurde ein Fokus auf die Gene mit stark verändertem mRNA-Spiegel gelegt. Neben dem *cydABDC*-Operon wiesen folgende Gene den am stärksten erhöhten mRNA-Spiegel auf: cg1881, kodierend für eine vorhergesagte Eisen-abhängige Peroxidase, cg1883, kodierend für ein putatives sekretiertes Protein (homolog zu PcuC aus *B. japonicum*) und cg1884, kodierend für ein vorhergesagtes Membranprotein (homolog zu CopC aus *Pseudomonas syringae*). Diese Gene bilden vermutlich ein Operon und unterliegen der Kontrolle des Transkriptionsregulators LexA und gehören somit zum SOS-Regulon von *C. glutamicum* (Jochmann *et al.*, 2009). Das Genprodukt von cg1881 weist eine Sequenzähnlichkeit zu einer Eisen-abhängigen Dyp-Typ-Peroxidase auf (Sugano, 2009), die Funktion des Proteins im Zusammenhang mit der Kupfer-Homöostase ist jedoch unklar. Möglicherweise ist Cg1881 als Peroxidase an einer Stress-Reaktion beteiligt, was eine Regulation der Expression des ganzen putativen Operons cg1884-cg1881 durch LexA erklären würde. Ein weiteres Gen, cg2750, mit einem erhöhten mRNA-Spiegel unter Kupfer-Mangel gehört ebenso zum SOS-Regulon von *C. glutamicum* und kodiert für ein hypothetisches Membranprotein ohne bekannte oder vorhergesagte Funktion. Weitere Gene mit erhöhtem mRNA-Spiegel sind möglicherweise an der Eisen-Homöostase von *C. glutamicum* beteiligt, hierunter cg2556, kodierend für ein Eisen-reguliertes Membranprotein, cg0924, kodierend für ein sekretiertes Siderophor-Bindeprotein, und cg0569, kodierend für eine Kation-transportierende ATPase aus dem DtxR-Regulon, sowie die Gene cg1832 und cg1833, kodierend für Komponenten eines putativen Siderophor-Transporters (Frunzke and Bott, 2008). Ein Zusammenhang zwischen Eisen- und Kupfer-Homöostase wurde bereits für andere Organismen gezeigt (Frangipani *et al.*, 2008, Kerschaw *et al.*, 2005, van Bakel *et al.*, 2005). Es stellte sich die Frage, wie die Versorgung von Zellen bzw. der Kupfer-abhängigen Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase mit Kupfer in *C. glutamicum* erfolgt und ob potentielle Assemblierungsproteine oder Kupfer-Chaperone im Kupfer-Mangel-Stimulon erfasst wurden. Dazu wurden die Gene cg2699, cg1883 und cg1884, die einen stark erhöhten mRNA-Spiegel aufwiesen, näher untersucht.

## 2.1 Evidenzen für eine duale Funktion von Cg2699 beim Kupfer-Import und -Einbau

Eine Sequenzanalyse von Cg2699 zeigte, dass es sich um ein integrales Membranprotein mit 16 Transmembranhelices und zwei vorhergesagten Domänen handelt: eine CopD-Domäne im N-terminalen Bereich und eine C-terminal lokalisierte CtaG-Domäne. Die CtaG-Domäne wies eine Sequenzähnlichkeit von 22% zu CtaG aus *Bacillus subtilis* auf (Anhang, Abb. A2). In *B. subtilis* verursachte die *ctaG*-Deletion sowie eine C-terminal verkürzte CtaG-Variante einen Aktivitätsverlust der Cytochrom-*caa*<sub>3</sub>-Oxidase, die ähnlich wie in *C. glutamicum* sowohl ein Cu<sub>A</sub>-Zentrum als auch ein Cu<sub>B</sub>-Zentrum in den Untereinheiten II und I hat. Dagegen wurde die Aktivität der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase ohne ein Cu<sub>A</sub>-Zentrum in der Untereinheit II in der  $\Delta$ *ctaG*-Mutante nicht beeinträchtigt. Die Proteinmenge der Untereinheiten II und I der Cytochrom-*caa*<sub>3</sub>-Oxidase war kaum verändert und es wurde keine starke Abnahme von Cytochrom *a* und Cytochrom *c* in der Deletionsmutante beobachtet. Die Autoren schlussfolgerten, dass CtaG an der Bildung des Cu<sub>A</sub>-Zentrums in der Untereinheit II der Cytochrom-*caa*<sub>3</sub>-Oxidase verantwortlich sein könnte (Bengtsson *et al.*, 2004). Neben der CtaG-Domäne wurde im Cg2699-Protein bei einer Sequenzanalyse eine CopD-Domäne vorhergesagt, die eine 25%-ige Sequenzidentität zum CopD-Protein aus *Pseudomonas syringae* (Anhang, Abb. A2) und eine 28%-ige Sequenzidentität zu der CopD-Domäne des YcnJ-Proteins aus *B. subtilis* aufwies. In *P. syringae* verlieh eine Plasmid-basierte Expression der Gene *copD* und *copC* aus dem Kupfer-Resistenz-Operon *copABCD* dem Stamm eine Hypersensitivität gegenüber Kupfer, d. h. das Wachstum der Zellen wurde im Vergleich zum Referenzstamm bei sehr viel niedrigeren Kupferkonzentrationen gehemmt. Außerdem wurde 40% mehr Kupfer in den Zellen akkumuliert, wenn *copC* und *copD* überexprimiert wurden. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass das periplasmatische Protein CopC und das integrale Membranprotein CopD für den Kupfer-Import in die Zelle verantwortlich sind (Cha and Cooksey, 1993). In *B. subtilis* wurde für das CopC-CopD Fusionsprotein YcnJ ebenso eine Rolle als Kupfer-Importer vorgeschlagen. Das Gen *ycnJ* wies unter Kupfer-Mangel einen stark erhöhten mRNA-Spiegel auf, die *ycnJ*-Gendeletion verursachte einen Wachstumsdefekt unter Kupfer-limitierenden Bedingungen und einen verringerten intrazellulären Kupfer-Gehalt im Vergleich zum WT (Chillappagari *et al.*, 2009). Aufgrund der Ergebnisse aus der Sequenzanalyse wurde eine duale Funktion für das Cg2699-Protein postuliert: als Kupfer-assemblierendes und -importierendes Protein.

Um beide postulierten Funktionen von Cg2699 näher zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, die Rückschlüsse auf die jeweilige Funktion erlauben. Für die importierende Funktion des Proteins sprechen die Ergebnisse, dass (i) unter Kupfer-limitierenden Bedingungen der mRNA-Spiegel des *cg2699*-Gens steigt, (ii) die  $\Delta$ *cg2699*-Deletionsmutante in Standard-CGXII-Medium den gleichen Phänotyp bzgl. des Wachstums, der Cytochromspektren und des Transkriptoms aufweist wie

der WT bei Kupfer-Mangel, und (iii) die  $\Delta cg2699$ -Deletionsmutante eine höhere Kupferresistenz aufweist als der WT. Als Kupfer-Importer wird Cg2699 unter Kupfer-Limitierung verstärkt benötigt und daher verstärkt exprimiert. Bei einer Deletion des cg2699-Gens kommt es zu einer Kupfer-Mangel-Antwort, obwohl im Medium genügend Kupfer zur Verfügung steht, da der Import von Kupfer gehemmt ist und der Zelle daher nicht genug Kupfer zur Verfügung steht. Bei der Cytochromspektren-Analyse der  $\Delta cg2699$ -Mutante und des WTs unter Kupfer-Limitierung konnte eine Verschiebung der Maxima der Peaks für Cytochrom *b* und Cytochrom *a* in den kurzwelligen Bereich festgestellt werden. Im Fall von Cytochrom *b* setzt sich der Peak aus mindestens drei bis vier unterschiedlichen Komponenten zusammen: der Cytochrom-*b*-Untereinheit des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplexes (QcrB), den Untereinheiten I und II der Cytochrom-*bd*-Oxidase (CydA, CydB), der Membranuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (SdhC) sowie aus der Membranuntereinheit der Nitrat-Reduktase (NarI). Insofern könnte sich die Verschiebung des Maximums aus einer veränderten Zusammensetzung dieser Komponenten ergeben. Die Transkriptomanalysen zeigten, dass der mRNA-Spiegel der *cydAB*-Gene 15-fach erhöht war, der mRNA-Spiegel der *qcrCAB*-Gene dagegen 3-fach erniedrigt. Für den Cytochrom *a*-Peak ist ausschließlich die Untereinheit I der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase (CtaD) verantwortlich (Bott and Niebisch, 2005). Die Verschiebung des Maximums des Peaks kann hier also nicht auf einer veränderten Zusammensetzung von Komponenten beruhen, sondern auf einer veränderten Struktur der CtaD-Untereinheit. Bratton *et al.* (2000) gelang es, die Untereinheit I aus einer unvollständig assemblierten Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase ohne die Untereinheiten II und III aus *Rhodobacter sphaeroides* zu untersuchen. Dabei war nur das Häm *a*, nicht aber das *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>-Zentrum im gereinigten Protein nachweisbar. Das Cytochromspektrum der isolierten Membranen mit der fehlerhaften Untereinheit I zeigte den Peak für Cytochrom *a* (bei der intakten Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase bei 605 nm) mit einer Verschiebung um 4 - 6 nm in den kurzwelligen Bereich. Dies war ein Indiz für eine entartete Häm-Umgebung, denn die Peak-Position wird von der Stärke einer Wasserstoffbrücke zwischen einem Arginin in der Untereinheit I und der Formylgruppe des Häms *a* stark beeinflusst. Das EPR-Spektrum dieses Proteins zeigte auch eine strukturelle Heterogenität der Häm-Bindestelle. Eine ähnliche Peak-Verschiebung bei Cytochrom *a* wurde auch bei den Untersuchungen der *ctaG*-Mutante aus *B. subtilis* (Bengtsson *et al.*, 2004) und von Sco1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson *et al.*, 2000) beobachtet, die möglicherweise an der Bildung des Cu<sub>A</sub>-Zentrums in der Untereinheit II beteiligt sind, sowie von Cox11p aus *Rhodobacter sphaeroides* (Hiser *et al.*, 2000), das als Assemblierungsfaktor für das Cu<sub>B</sub>-Zentrum in der Untereinheit I fungiert. Womöglich führt eine nicht vollständige Beladung des Cu<sub>B</sub>-Zentrums zu einer entarteten Häm-Umgebung in der Untereinheit I, die sich in einer Verschiebung des Peaks für Cytochrom *a* auswirkt. Da das Cu<sub>B</sub>-Zentrum vermutlich erst nach der Assemblierung des Cu<sub>A</sub>-Zentrums mit Kupfer-Ionen beladen wird (Hiser *et al.*, 2000, Bratton *et al.*, 2000), könnte eine unvollständige Beladung des Cu<sub>A</sub>-

Zentrums durch eine Unterbrechung der Enzym-Reifung ebenfalls zu einer entarteten Häm-Umgebung in der Untereinheit I führen. In der *C. glutamicum*  $\Delta$ cg2699-Mutante könnte sowohl eine Unterbrechung der generellen Kupfer-Versorgung der Zelle und somit der Kupfer-abhängigen Cytochrom- $aa_3$ -Oxidase als auch ein fehlendes Assemblierungsprotein für die Beladung des  $Cu_A$ -Zentrums in der Untereinheit II oder des  $Cu_B$ -Zentrums in der Untereinheit I für die beobachtete Peak-Verschiebung verantwortlich sein. Eine Cytochromspektren-Analyse der isolierten Membranen aus der  $\Delta$ cg2699-Mutante sollte allerdings erneut durchgeführt werden. Bei Kultivierungen in BHI-Medium wurde ein etwas beschleunigter Abbau von CtaD in der exponentiellen Phase beobachtet, in der stationären Phase war das CtaD-Protein nicht mehr nachweisbar. In künftigen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Menge an CtaD in der Membran auch während der Kultivierung in CGXII-Medium mit der Zeit abnimmt und wie die Cytochromspektren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung aussehen.

Die Assemblierungsfunktion von Cg2699 für die Cytochrom- $aa_3$ -Oxidase wurde durch Experimente mit Strep-getagtem CtaD näher untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass (i) CtaD<sub>St</sub> in der  $\Delta$ cg2699-Mutante in der stationären Wachstumsphase nicht mehr nachweisbar ist und (ii) die Ko-Reinigung der Untereinheiten des Cytochrom- $bc_1$ - $aa_3$ -Superkomplexes mit CtaD<sub>St</sub> und QcrB<sub>St</sub> vollständig bzw. teilweise fehlschlug. Bei den Ko-Reinigungsexperimenten mit den Stämmen WT/pJC1-QcrB<sub>St</sub> und  $\Delta$ cg2699/pJC1-QcrB<sub>St</sub> kann nicht ausgeschlossen werden, dass das native QcrB einen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Daher sollte der Versuch mit den Stämmen  $\Delta$ qcr $\Delta$ cg2699/pJC1-QcrB<sub>St</sub> und  $\Delta$ qcr/pJC1-QcrB<sub>St</sub> als Kontrolle wiederholt werden. Bei der Isolation von CtaD<sub>St</sub> mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie konnte in der  $\Delta$ cg2699-Deletionsmutante keine weitere Untereinheit des Superkomplexes ko-gereinigt werden, bei der Isolation von QcrB<sub>St</sub> konnte nur das QcrA-Protein ko-gereinigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abwesenheit des cg2699-Gens bzw. dessen Genprodukts zur Folge hat, dass die Assemblierung sowohl der Cytochrom- $aa_3$ -Oxidase als auch des Cytochrom- $bc_1$ - $aa_3$ -Superkomplexes verhindert wird. Wenn Cg2699 eine Kupfer-inserierende Rolle für die Cytochrom- $aa_3$ -Oxidase ausübt, könnte eine unvollständige Beladung der Kupfer-Zentren  $Cu_B$  in CtaD und  $Cu_A$  in CtaC dazu führen, dass diese Untereinheiten in einer präfinalen Struktur fixiert sind, welche die korrekte Interaktion mit den anderen Untereinheiten verhindert und ggf. auch zu einem Abbau der nicht-funktionellen Proteine führt.

In den Mitochondrien wird Kupfer durch das Kupfer-Chaperon Cox17 zu Scol und Cox11 geliefert, die dann das  $Cu_A$ -Zentrum bzw. das  $Cu_B$ -Zentrum der Cytochrom- $c$ -Oxidase mit Kupfer beladen (Cobine *et al.*, 2006a). Die Beladung der Cu-Zentren findet zwar im Intermembranraum der Mitochondrien statt, jedoch werden die Kupfer-Ionen hierfür vermutlich aus der Matrix geliefert. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Kupfer in der Matrix in einem proteinfreien Ligand-

Komplex gespeichert und nach Bedarf in den Intermembranraum transportiert wird (Cobine *et al.*, 2004, Cobine *et al.*, 2006b). Eine Fusion aus einem Importer- und Assemblierungsprotein könnte in *C. glutamicum* eine räumliche Nähe des intrazellulären Kupfers zum Zielprotein ermöglichen. Das Cu<sub>A</sub>-Zentrum liegt 8 Å über und das Cu<sub>B</sub>-Zentrum 13 Å unter der Membranoberfläche (Tsukihara *et al.*, 1995). Während das Cu<sub>A</sub>-Zentrum vermutlich im periplasmatischen Raum mit Kupfer beladen wird, könnte der Kupfer-Einbau in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum direkt in der Membran stattfinden. Cg2699 könnte für den Einbau sowohl vom Cu<sub>A</sub>- als auch vom Cu<sub>B</sub>-Zentrum verantwortlich sein. Möglicherweise könnte eine Messung von Kupfer nach Bratton *et al.* (2000) und Hiser *et al.* (2000) im gereinigten CtaC oder CtaD aus der Δcg2699-Mutante Hinweise darauf geben, ob Cg2699 an der Beladung des Cu<sub>A</sub>- oder des Cu<sub>B</sub>-Zentrums beteiligt ist. In diesen Studien wurde der Gehalt an Eisen und Kupfer in gereinigten Proteinen bzw. Proteinkomplexen mittels ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) gemessen. Aus einem Kupfer-Eisen-Koeffizienten hatten die Autoren Rückschlüsse auf die Menge von Kupfer-Ionen pro Oxidase-Einheit ermittelt. Eine genauere Methode zur Untersuchung der Cu-Zentren wäre die EPR-Spektroskopie (electron paramagnetic resonance spectroscopy). Damit könnte man sowohl die Cu<sub>A</sub>-Zentrum-Umgebung untersuchen als auch eine Abwesenheit von Kupfer im Cu<sub>B</sub>-Zentrum feststellen (Aasa *et al.*, 1976, Hiser *et al.*, 2000). Darüber hinaus könnten weitere Untersuchungen des Cg2699-Proteins mehr Aufschluss geben, wie die Assemblierung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase mechanistisch abläuft. Wenn Cg2699 für die Beladung des Cu<sub>B</sub>-Zentrums verantwortlich ist, sollten die beiden Proteine Cg2699 und CtaD miteinander interagieren. Um dies zu untersuchen, wurden Expressionsplasmide konstruiert, die Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen kodieren. Eine anschließende FRET-Messung könnte eine potentielle Interaktion zwischen den beiden Proteinen verifizieren. Wenn Cg2699 an dem Kupfer-Einbau in das Cu<sub>A</sub>-Zentrum beteiligt ist, sollte eine Interaktion zwischen Cg2699 und CtaC getestet werden. FRET-Messungen könnten desweiteren auch für den Nachweis weiterer potentieller Interaktionen von Cg2699 genutzt werden, z. B. mit CopC.

Das Cg2699-Protein ist aus den Domänen CopD und CtaG zusammengesetzt. Die Fusion der beiden Domänen in einem Protein könnte eine optimale Kopplung zwischen Kupfer-Import und -Einbau in die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase ermöglichen. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, unterstützen eine duale Rolle des Proteins als Kupfer-Importer und Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase-Assemblierungsfaktor. Deswegen wird ein neuer Name für das Protein Cg2699 vorgeschlagen: CtiP für „copper transport and insertion protein“.

## 2.2 Beteiligung der Proteine CopC und PcuC an der Kupfer-Homöostase in *C. glutamicum*

Neben dem Cg2699-Protein wurden in dieser Studie zwei weitere Proteine CopC und PcuC identifiziert, die an der Kupfer-Homöostase in *C. glutamicum* beteiligt sein könnten. In *P. syringae* ist CopC zusammen mit CopD am Kupfer-Import beteiligt, wobei CopC als periplasmatisches Protein Kupfer bindet und zum membranintegralen CopD zwecks Import in die Zelle weiterleitet (Cha and Cooksey, 1993, Puig *et al.*, 2002). CopC aus *P. syringae* besitzt hochaffine Kupfer-Bindestellen sowohl für Cu(I) ( $10^{-7} \geq K_D \geq 10^{-13}$ ) als auch für Cu(II) ( $K_D = 10^{-13}$ ) und könnte die Ionen nicht nur für CopD, sondern auch für andere Proteine wie die Multikupfer-Oxidase CopA oder den Kupfer-Transporter CopB bereitstellen (Arnesano *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2006). Die Cu(I)-Bindestelle wird aus einem Histidin und mindestens 2 von 4 in Frage kommenden Methionin-Resten (H48, M40, M43, M46 und M51) gebildet, für die Cu(II)-Bindestelle werden zwei Histidin-Reste, ein Glutamat- und ein Aspartat-Rest benötigt (H1, H91, E27 und D89) (Arnesano *et al.*, 2003). Während der Austausch H1F eine Kupfer-Bindung verhindert, führt der Austausch H91F zu einer niedrigeren Cu(II)-Affinität und E27G zu einer etwas höheren Cu(II)-Affinität (Zhang *et al.*, 2006). Bei der Sequenzanalyse des CopC-CopD-Fusionsproteins YcnJ aus *B. subtilis* konnten in der N-terminal lokalisierten CopC-Domäne alle vier Aminosäuren identifiziert werden, die an der Cu(II)-Bindung beteiligt sind (Chillappagari *et al.*, 2009). In *C. glutamicum* wird das CopC-homologe Protein vom *copC*-Gen (cg1884) kodiert und weist eine Sequenzidentität von 30% zu CopC aus *P. syringae* und von 25% zur CopC-Domäne des YcnJ-Proteins aus *B. subtilis* auf. Allerdings sind nur drei der vier Aminosäuren für die Cu(II)-Bindung in der Aminosäuresequenz von CopC aus *C. glutamicum* vorhanden: H1, D85 und H87 (s. Anhang, Abb. A3). Anstelle eines Glutamat-Restes befindet sich an Position 28 ein Glycin-Rest, dadurch sollte die Kupfer-Bindung jedoch nicht beeinträchtigt werden (s. oben). Sowohl in YcnJ aus *B. subtilis* als auch in CopC aus *C. glutamicum* konnte keine Methionin-reiche Region gefunden werden, die für die Cu(I)-Bindung benötigt wird. Aufgrund der Daten aus *P. syringae* und *B. subtilis* wurde vermutet, dass CopC in *C. glutamicum* zusammen mit Cg2699 für den Kupfer-Import verantwortlich sein könnte. Eine Charakterisierung der  $\Delta copC$ -Deletionsmutante hat ergeben, dass diese eine höhere Resistenz gegenüber Kupfer-Stress aufweist, aber in Standard-CGXII-Medium keinen Wachstumsdefekt wie die  $\Delta cg2699$ -Mutante zeigt. Dies deutet darauf hin, dass CopC in *C. glutamicum* am Kupfer-Import zwar beteiligt ist, aber vermutlich eine zweitrangige Rolle spielt. Möglicherweise kann in der  $\Delta copC$ -Mutante der Kupfer-Import unter Standard-Bedingungen allein durch Cg2699 bewerkstelligt werden, wodurch keine Kupfer-Mangel-Antwort ausgelöst wird. Im Vollmedium zeigte die  $\Delta copC$ -Mutante überraschenderweise ein ähnlich gehemmtes Wachstum wie die  $\Delta cg2699$ -Mutante. Eine mögliche Erklärung ist, dass es im Vollmedium nicht genug Kupfer gibt und die Zellen unter Kupfer-Mangel-Bedingungen wachsen. Der Kupfergehalt in der *C. glutamicum*-Biotrockenmasse von Zellen aus

Komplexmedium war um ein vielfaches niedriger im Vergleich zu Zellen aus einem synthetischen Medium (s. oben). CopC wird anscheinend nur unter Kupfer-Mangel-Bedingungen benötigt, indem es die wenigen zur Verfügung stehenden Kupfer-Ionen bindet und an Cg2699 weiterleitet. Bei der Affinitätsreinigung von CtaD<sub>St</sub> aus Membranen des Stammes  $\Delta copC/pJC1-CtaD_{St}$  gab es keine Ko-Reinigung von weiteren Untereinheiten des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes. Dies ist ein Hinweis darauf, dass CopC ebenso wie Cg2699 an der Assemblierung des Superkomplexes beteiligt ist. Allerdings sollte noch überprüft werden, ob dieses Ergebnis nicht auf Kupfer-Mangel im BHI-Vollmedium beruht. Wenn CopC nur eine Helfer-Rolle für Cg2699 unter Kupfer-Mangel-Bedingungen ausübt, sollte eine Ko-Reinigung der Untereinheiten des Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplexes aus der  $\Delta copC$ -Mutante bei einer Kultivierung in Standard-CGXII-Medium wie beim Wildtyp möglich sein.

Ein weiteres Protein, welches zum Kupfer-Mangel-Stimulon gehört und an der Kupfer-Homöostase in *C. glutamicum* beteiligt sein könnte, ist das PcuC- bzw. PCu<sub>A</sub>C-homologe Protein Cg1883. Mit Hilfe von NMR-Studien wurde gezeigt, dass PCu<sub>A</sub>C aus *Thermus thermophilus* (37% Sequenzidentität zu PcuC aus *C. glutamicum*) *in vitro* das Cu<sub>A</sub>-Zentrum der Untereinheit II mit Kupfer beladen kann. PCu<sub>A</sub>C bindet ein Cu(I)-Ion ( $K_D = 2,2 \cdot 10^{-13}$  M) und kann in einem Verhältnis zum unbeladenen Cu<sub>A</sub>-Zentrum von 2:1 beide Kupfer-Ionen für das Cu<sub>A</sub>-Zentrum liefern. Die Kupfer-Bindung wird durch die Reste H46, M61, H83 und M85 koordiniert (Abriata *et al.*, 2008). In *B. japonicum* verursachte eine Deletion von *pcuC* einen Aktivitätsverlust der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase, der durch einen Kupfer-Überschuss im Nährmedium aufgehoben werden konnte. In der symbiotischen Form von *B. japonicum* beeinträchtigte die *pcuC*-Deletion die Aktivität der Cytochrom-*cbb*<sub>3</sub>-Oxidase, die kein Cu<sub>A</sub>-Zentrum, sondern nur das Cu<sub>B</sub>-Zentrum enthält. Daraus haben die Autoren geschlossen, dass PcuC an der Beladung sowohl des Cu<sub>A</sub>-Zentrums der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase, als auch des Cu<sub>B</sub>-Zentrums der Cytochrom-*cbb*<sub>3</sub>-Oxidase beteiligt sein könnte (Serventi *et al.*, 2012). Thompson *et al.* (2012) zeigten sogar, dass PCu<sub>A</sub>C aus *Rhodobacter sphaeroides* zum Teil auch Kupfer für die Beladung des Cu<sub>B</sub>-Zentrums der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase bereitstellen kann, obwohl das Assemblierungsprotein Cox11 vorhanden war. In *R. sphaeroides* beeinträchtigte die *pCu<sub>A</sub>C*-Deletion die Aktivität sowohl der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase als auch der Cytochrom-*cbb*<sub>3</sub>-Oxidase bei ausreichenden Kupferkonzentrationen, unter Kupfer-Mangel war der Anteil der vollständig assemblierten Cytochrom-Oxidase in der Membran stark minimiert im Vergleich zum Wildtyp. EPR-Spektren der isolierten Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase aus der  $\Delta pCu_A C$ -Mutante zeigten, dass die Menge an Cu<sub>A</sub> um 15% im Vergleich zur Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase aus dem Wildtyp abgenommen hatte. Ausserdem konnten Signale detektiert werden, die auf eine Abwesenheit von Cu<sub>B</sub> hindeuten. Ein Vergleich mit einem anderen Assemblierungsprotein PrrC, das einen ähnlichen Effekt auf die beiden Cytochrom-Oxidase ausübt, hat ergeben, dass die Rolle von PCu<sub>A</sub>C zweitrangig war. Es wurde vermutet, dass PCu<sub>A</sub>C als Kupfer-Chaperon *in vivo* nicht direkt an der Beladung des Cu<sub>A</sub>- oder Cu<sub>B</sub>-

Zentrums beteiligt ist, sondern Kupfer zu den Assemblierungsproteinen PrrC und Cox11 liefert, die anschließend Kupfer in das Cu<sub>A</sub>- bzw. das Cu<sub>B</sub>-Zentrum einbauen (Thompson *et al.*, 2012). In *C. glutamicum* kodiert das *pcuC*-Gen für ein sekretiertes Protein, welches drei von vier Aminosäuren aufweist, die an der Cu(I)-Bindung beteiligt sind: H77, H107 und M109 (s. Anhang, Abb. A4). An Stelle von Methionin befindet sich an Position 86 ein Glutamat-Rest, jedoch könnte stattdessen Methionin an Position 84 an der Kupfer-Bindung mitwirken. Möglicherweise fungiert PcuC in *C. glutamicum* unter Kupfer-limitierenden Bedingungen als ein Assemblierungsprotein für die Beladung vom Cu<sub>A</sub>- oder Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase oder als Kupfer-Chaperon für Cg2699 oder andere Kupfer-Assemblierungsproteine. Allerdings übt PcuC wahrscheinlich eine zweitrangige Rolle aus, denn die  $\Delta pcuC$ -Mutante zeigte keinen Wachstumsdefekt auf BHI-Agarplatten (Daten nicht gezeigt).

Die Gene *copC* und *pcuC* gehören zum putativen Operon cg1884-cg1883 und zeigten einen gleich stark erhöhten mRNA-Spiegel in beiden Transkriptomvergleichen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Bei den Untersuchungen der  $\Delta copC$ -Mutante konnten Defekte im Wachstum und der Assemblierung des Superkomplexes nur in BHI-Medium beobachtet werden, wobei in BHI-Medium wahrscheinlich eine Kupfer-Limitierung vorliegt. Für die PcuC-Homologen aus anderen Organismen wurde auch gezeigt, dass diese unter Kupfer-Mangel verstärkt benötigt werden (Serventi *et al.*, 2012 Thompson *et al.*, 2012). Dies führt zu der Annahme, dass in *C. glutamicum* die Proteine CopC und PcuC auch nur unter Kupfer-Mangel eine wichtige Rolle als Kupfer-Lieferanten für Cg2699 und/oder Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase spielen.

### **2.3 Möglicher Mechanismus des Kupfer-Imports und der Kupfer-Insertion in die Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase**

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und der Sequenzanalysen der Proteine Cg2699, CopC und PcuC wird ein Modell zur Rolle dieser Proteine bei der Kupfer-Homöostase in *C. glutamicum* vorgeschlagen, das davon ausgeht, dass (i) die CtaG-Domäne von Cg2699 für den Einbau von Kupfer in das Cu<sub>A</sub>- oder Cu<sub>B</sub>-Zentrum der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase verantwortlich ist, (ii) der Kupfer-Import in die Zelle ausschließlich mit Hilfe von Cg2699 erfolgt und (iii) die Proteine PcuC und CopC als Kupfer-Chaperone fungieren, die primär unter Kupfer-Mangel-Bedingungen benötigt werden (Abb. 20). Bei ausreichenden Kupferkonzentrationen im Nährmedium ist Cg2699 sowohl für den Kupfer-Import als auch für die Assemblierung der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Oxidase durch Einbau von Kupfer-Ionen in das Cu<sub>A</sub>- oder Cu<sub>B</sub>-Zentrum zuständig. Nachdem Kupfer in die Zelle importiert wird, werden die Kupfer-Ionen vermutlich von einem intrazellulären Kupfer-Chaperon gebunden. Im Genom von *C. glutamicum* wurden sechs Gene für putative Kupfer-Chaperone ohne ein vorhergesagtes Signalpeptid gefunden (cg1328, cg3282, cg3292, cg3300, cg3402 und cg3411, Schuplezow, 2009). Der Einbau der Kupfer-Ionen in das Cu<sub>A</sub>-Zentrum erfolgt vermutlich im



## Literaturverzeichnis

- Aasa**, R., Albracht, P.J., Falk, K.E., Lanne, B., and Vänngard, T. (1976) EPR signals from cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* **422(2)**: 260-72
- Abe**, S., Takayama, K., and Kinoshita., S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**:279-301
- Abriata**, L.A., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gkazonis, P., Spyroulias, G.G., Vila, A.J., and Wang, S. (2008) Mechanism of Cu<sub>A</sub> assembly. *Nat Chem Biol* **4(10)**: 599-601
- Albanesi**, D., Martin, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D., and Buschiazzo, A. (2009) Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *PNAS* **106 (38)**: 16185-16190
- Appia-Ayme**, C., Hall, A., Patrick, E., Rajadurai, S., Clarke, T.A., and Rowley, G. (2012) ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochem J* **442**: 85-93
- Arnesano**, F., Banci, L., Bertini, I., Mangani, S., and Thompsett, A.R. (2003) A redox switch in CopC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites. *PNAS* **100 (7)**: 3814-3819
- Argüello**, J.M., Raimunda, D., and Padilla-Benavides, T. (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3(73)**: 1-14
- Bengtsson**, J., von Wachenfeld, C., Winstedt, L., Nygaard, P., and Hederstedt, L. (2004) CtaG is required for formation of active cytochrome *c* oxidase in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **150**: 415-425
- Bertani**, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62 (3)**: 293-300
- Birnboim**, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Blum**, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Bott**, M. and Brocker, M. (2012) Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Appl Microbiol Biotechnol* **94 (5)**: 1131-50
- Bott**, M. and Niebisch, A. (2003) The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 129-153
- Bott**, M. and Niebisch, A. (2005) Respiratory Energy Metabolism. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L. and Bott, M. (ed.): CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida

- Bradford**, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54
- Bratton**, M.R., Hiser, L., Antholine, W.E., Hoganson, C., and Hosler, J.P. (2000) Identification of the structural subunits required for formation of the metal centers in subunit I of cytochrome c oxidase of *Rhodobacter spheroides*. *Biochemistry* **39**: 12989-12995
- Brocker**, M. (2006) MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Brown**, N.L., Barrett, S.R., Camakaris, J., Lee, B.T., and Rouch, D.A. (1995) Molecular genetics and transport analysis of the copper resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol* **17**: 1153–1166
- Bussmann**, M., Baumgart, M., and Bott, M. (2010) RosR (Cg1324), a hydrogen peroxide-sensitive MarR-type transcriptional regulator of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **285** (38): 29305-18
- Casino**, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009) Structural insights into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**: 325-336
- Casino**, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology* **20**: 763-771
- Castiglioni**, E., Grilli, E., and Sanguinetti, S. (1997) A new simple and low cost scattered transmission accessory for commercial double beam ultraviolet-visible spectrophotometers. *Rev Sci Instrum* **68**: 4288-4289
- Chayen**, N.E., Stewart, P.D.S., Maeder, D.L., and Blow, D.M. (1990) An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. *J Appl Cryst* **23**: 297-302
- Chillappagari**, S., Miethke, M., Trip, H., Kuipers, O.P., and Marahiel, M.A. (2009) Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **191** (7): 2362-2370
- Cha**, J-S. and Cooksey, D.A. (1993) Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon. *Appl Environ Microbiol* **59** (5): 1671-1674
- Cho**, U.S., Bader, M.W., Amaya, M.F., Daley, M.E., Klevit, R.E., Miller, S.I., and Xu, W. (2006) Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J Mol Biol* **356**: 1193-1206
- Cobine**, P.A., Ojeda, L.D., Rigby K.M., and Winge D.R. (2004) Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* **279**(14): 14447-55
- Cobine**, P.A., Pierrel, F., and Winge, D.R. (2006a) Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochym Biophys Acta* **1763**(7): 759-72
- Cobine**, P.A., Pierrel, F., Bestwick, M.L., and Winge, D.R. (2006b) Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem* **281**(48): 36552-9

- Cremer, J., Eggeling, L., und Sahm, H. (1990)** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **220**: 478-480
- Derewenda, Z.S. and Vekilov, P.G. (2006)** Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Cryst* **62**: 116-124
- Dickinson, E.K., Adams, D.L., Schon, E.A., and Glerum, D.M. (2000)** A human *SCO2* mutation helps define the role of Sco1p in the cytochrome oxidase assembly pathway. *J Biol Chem* **275**: 26780-26785
- Eggeling, L. and Sahm, H. (2001)** The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J Biosci Bioeng* **92**: 201-213
- Eggeling, L. and Bott, M. (2005)** *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998)** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS* **95 (25)**: 14863-8
- Eikmanns, B. J., E. Kleinertz, W. Liebl, and Sahm, H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**: 93-8
- Engström, S., Alfons, K., Rasmusson, M., and Ljusberg-Wahren, H. (1998)** Solvent-induced sponge (L<sub>3</sub>) phases in the solvent-monoolein-water system. *Prog Colloid Polym Sci* **108**: 93-98
- Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., Becker, S., Unden, G., and Baldus, M. (2008)** Plasticity of the PAS domain and a potential role for signal transduction in the histidine kinase DcuS. *Nat Struct Mol Biol* **15 (10)**: 1031-9
- Ferris, H.U., Dunin-Horkawicz, S., Mondejar, L.G., Hulko, M., Hantke, K., Martin, J., Schultz, J.E., Zeth, K., Lupas, A.N., and Coles, M. (2011)** The mechanisms of HAMP-mediated signaling in transmembrane receptors. *Structure* **19**: 378-385
- 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
- Frangipani, E., Slaveykova, V.I., Reimann, C., and Haas, D. (2008)** Adaptation of aerobically growing *Pseudomonas aeruginosa* to copper starvation. *J Bacteriol* **190 (20)**: 6706-6717
- Frunzke, J. and Bott, M. (2008)** Regulation of iron homeostasis in *Corynebacterium glutamicum*. In *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Burkowski, A. (ed.): Caister Academic Press, Norfolk
- Gao, R. and Stock, A.M. (2009)** Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133-54
- Gebel, L. (2006)** Untersuchungen der Proteine PknG, GlnH, GlnX aus *Corynebacterium glutamicum*. **Diplomarbeit**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

- Gebhard, S.** and Mascher, T. (2011) Antimicrobial peptide sensing and detoxification modules: unravelling the regulatory circuitry of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **81** (3): 581-587
- Giner-Lamia, J.,** Lopez-Maury, L., Reyes, J.C., and Florencio, F.J. (2012) The CopRS two-component system is responsible for resistance to copper in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant physiol* **159**: 1806-1818
- Goldschmidt, L.,** Cooper, D.R., Derewenda, Z.S., and Eisenberg, D. (2007) Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci* **16** (8): 1569-1576
- Gudipaty, S.A.,** Larsen, A.S., Rensing, C., and McEvoy, M.M. (2012) Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. *FEMS Microbiol Lett* **330** (1): 30-37
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hanahan, D.** (1985) Techniques of Transformation of *E. coli*. In *DNA-Cloning*. D. M. Glover (ed.): IRL-Press
- Hiser, L.,** Di Valentin, M., Hamer, A.G., and Hosler, J.P. (2000) Cox11p is required for stable formation of the CuB and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **275** (1): 619-23
- Hulko, M.,** Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N., and Coles, M. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**: 929-940
- Imlay, J.A.** (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418
- Jäger, W.,** Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G., and Wohlleben, W. (1992) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**: 5462-5465
- Jochmann, N.,** Kurze, A-K., Czaja, L.F., Brinkrolf, K., Brune, I., Hüser, A.T., Hansmeier, N., Pühler, A., Borovok, I., and Tauch, A. (2009) Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and *in vitro* DNA band shift assays. *Microbiology* **155**: 1459-1477
- Kabus, A.** (2006) Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Kabus, A.,** Niebisch, A., and Bott, M. (2007) Role of cytochrome *bd* oxidase from *Corynebacterium glutamicum* in growth and lysine production. *Appl Environ Microbiol* **73** (3): 861-8
- Karlin, K.D.** (1993) Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* **261**: 701-708
- Keilhauer, C.,** Eggeling, L., and Sahm, H. (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**: 5595-5603

- Kensy, F., Zang, E., Faulhammer, C., Tan, R.K., and Büchs, J. (2009)** Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb Cell Fact* **8 (1)**: 31
- Kershaw, C.J., Brown, N.L., Constantinidou, C., Patel, M.D., and Hobman, J.L. (2005)** The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology* **151 (4)**: 1187-98
- Khodurski, 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*. *PNAS* **97 (22)**: 121170-5
- Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957)** Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**: 193-205
- Kneuper, H. (2005)** Struktur- und Funktionsuntersuchungen des C<sub>4</sub>-Decarboxylat-Sensors DcuS von *Escherichia coli*. **Dissertation**, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Kocan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorgen-Herrmann, U., Wendish, V.F., and Bott, M. (2006)** Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188 (2)**: 724-732
- Koch-Körffges, A. (2011)** Novel insights into the energy metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by comprehensive analysis of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Krämer, J. (2008)** Der C<sub>4</sub>-Dicarboxylat- und Citratsensor DcuS aus *Escherichia coli* - Signalerkennung und Regulation. **Dissertation**, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Krawczyk, S. (2011)** Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*: Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Krug, A. (2004)** Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227 (5259)**: 680-5
- Landau, E.M. and Rosenbusch, J.P. (1996)** Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *PNAS* **93**: 14532-14535
- Liebl, W. (2005)** *Corynebacterium* Taxonomy. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L. and Bott, M. (ed.): CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- 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

- Lowe, E.C., Basle, A., Czjzek, M., Firbank, S.J., and Bolam, D.N.** (2012) A scissor blade-like closing mechanism implicated in transmembrane signaling in a *Bacteroides* hybrid two-component system. *PNAS* **109** (19): 7298-7303
- Macomber, L. and Imlay, J.A.** (2009) The iron-sulfur clusters of dehydrogenases are primary intracellular targets of copper toxicity. *PNAS* **106** (20): 8344-8349
- Magnani, D. and Solioz, M.** (2007) How bacteria handle copper. In *Microbiol Monogr.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Mattatal, N.R., Jazairi, J., and Hill, B.C.** (2000) Characterization of YpmQ, an accessory protein required for the expression of cytochrome *c* oxidase in *Bacillus subtilis*. *JBiol Chem* **275**: 28802-28809
- Marina, A., Waldburger, C.D., and Hendrickson, W.A.** (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine kinase protein. *The EMBO Journal* **24**: 4247-4259
- McGregor, C.-L., Chen, L., Pomroy, N.C., Hwang, P., Go, S., Chakrabarty, A., and Prive, G.G.** (2003) Lipopeptide detergents designed for the structural study of membrane proteins. *Nat Biotechnol* **21**: 171-176
- McPherson, A.** (1985) Crystallization of macromolecules: general principles. *Methods Enzymol* **114**: 112-120
- Mehring, M.** (1983) *Principles of high resolution NMR in solids.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Miller, J.H.** (1992) *A short course in bacterial genetics.* Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, New York. Cold Spring Habor Laboratory Press
- Mills, S. D., Jasalavich, C. A., and Cooksey, D. A.** (1993) A two component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **175**: 1656-1664
- Möker, N., Reihlen, P., Krämer, R., and Morbach, S.** (2007) Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **282**: 27666-27677
- Moore, J.O. and Hendrickson, W.A.** (2012) An asymmetry-to-symmetry switch in signal transmission by the histidine kinase receptor for TMAO. *Structure* **20**: 729-741
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50
- Niebsch, A.** (2002) Molekulare Charakterisierung des Cytochrom-*bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>*-Superkomplexes aus *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Niebsch, A. and Bott, M.** (2001) Molecular analysis of the cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c<sub>1</sub>*. *Arch Microbiol* **175**: 282-294

- Niebisch, A.** and Bott, M. (2003) Purification of a cytochrome *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub> supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome *aa*<sub>3</sub> oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome *c*<sub>1</sub>. *J Biol Chem* **278**: 4339-4346
- Ostuni, M.A.,** latmanen, S., Teboul, D., Robert, J.-C., and Lacapere, J.-J. (2010) Characterization of membrane protein preparations: measurement of detergent content and ligand binding after proteoliposomes reconstitution. In *Membrane protein structure determination. Methods and protocols*. Lacapere, J.-J. (ed.): Humana Press, a part of Springer Science + Business Media
- Ottemann, K.M.,** Xiao, W., Shin, Y.K., and Koshland, D.E. Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* **285 (5434)**: 1751-4
- Otten, A.** (2008) Untersuchungen zum stoffwechsel in *Corynebacterium glutamicum*. **Masterarbeit**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Otten, A.** (2012) Metabolic Engineering von *Corynebacterium glutamicum* für die Produktion einer Dicarbonsäure. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Pappalardo, L.,** Janausch, I.G., Vijayan, V., Zientz, E., Junker, J., Peti, W., Zweckstetter, M., Unden, G., and Griesinger, C. (2003) The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-component fumarate sensor (histidin protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 39185-39188
- Pappin, D.J.,** Hojrup, P., and Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* **3**: 327-332
- Perkins, D.N.,** Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567
- Polen, T.** and Wendisch, V.F. (2004) Genomwide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* **118 (1-3)**: 215-32
- Porath, J.,** Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258 (5536)**: 598-9
- Prive, G.G.** (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* **41**: 388-397
- Prive, G.G.** (2009) Lipopeptide detergents for membrane protein studies. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 379-385
- Puig, S.,** Rees, E.M., and Thiele, D.J. (2002) The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure* **10**: 1292-1295
- Quaranta, D.,** McEvoy, M.M., and Rensing, C. (2009) Site-directed mutagenesis identifies a molecular switch involved in copper sensing by the histidine kinase CinS in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **191 (16)**: 5304-5311

- Rademacher, C.** and Masepohl, B. (2012) Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology* **158**: 2451-2464
- Reinelt, S.,** Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M., and Madden, D.R. (2003) The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J Biol Chem* **278**: 39189-39196
- Rensing, C.** and Grass, G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 197-213
- Rensing, C.** and McDevitt, S.F. (2013) The copper metallome in prokaryotic cells. *Met Ions Life Sci* **12**: 417-450
- Rigaud, J.L.,** Pitard, B., and Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochem Biophys Acta* **1231**: 223-246
- Rosenow, E.C.** (1919) Studies on selective localization. Focal infection with special reference to oral sepsis. *J Dental Research* **1**: 205-249
- Sambrook, J.** (1989) *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Samorsky, M.,** Müller-Newen, G., and Büchs, J. (2005) Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnol Bioeng* **92 (1)**: 61-68
- Sanger, F.,** Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467
- 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
- Schelder, S.** (2008) Sensorische Eigenschaften des Zweikomponentensystems CopSR aus *Corynebacterium glutamicum*. **Masterarbeit**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Schelder, S.** (2011) CopRS and CsoR: two regulatory systems involved in copper homeostasis of *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Schelder, S.,** Zaade, D., Litsanov, B., Bott, M., and Brocker, M. (2011) The two-component signal transduction system CopRS of *Corynebacterium glutamicum* is required for adaptation to copper-excess stress. *PLoS ONE* **6 (7)**: e22143
- Schuplezow, X.** (2009) Regulation der Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*. **Diplomarbeit**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

- Schweitzer, J.** (2007) analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Seidel, K., Lange, A., Becker, S., Hughes, C.E., Heise, H., and Baldus, M.** (2004) Protein solid-state NMR resonance assignments from (C-13, C-13) correlation spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys* **6**: 5090-5093
- Serventi, F., Youard, Z.A., Murset, V., Huwiler, S., Bühler, D., Richter, M., Luchsinger, R., Hans-Martin Fischer, H-M., Brogioli, R., Niederer, M., and Hennecke, H.** (2012) Copper starvation-inducible protein for cytochrome oxidase biogenesis in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* **287 (46)**: 38812-38823
- Sevvana, M., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Reinelt, S., Madden, D.R., Herbst-Irmer, R., Scheldrick, G.M., Bott, M., Griesinger, C., and Becker, S.** (2008) A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J Mol Biol* **377**: 512-523
- 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 (7)**: 639-45
- 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
- Sledz, P., Zheng, H., Murzyn, K., Chruszcz, M., Zimmerman, M.D., Chordia, M.D., Joachimiak, A., and Minor, W.** (2010) New surface contacts formed upon reductive lysine methylation: Improving the probability of protein crystallization. *Protein Sci* **19**: 1395-1404
- Solioz, M., Abicht, H.K., Mermod, M., and Mancini, S.** (2010) Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *J Biol Inorg Chem* **15 (1)**: 3-14
- Solioz, M. and Stoyanov, J.V.** (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 183-195
- Stewart, R.C.** (2010) Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr Opin Microbiol* **13**: 133-141
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N.** (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215
- Studier, F.W. and Moffat, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Sugano, Y.** (2009) DyP-Type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1387-1403
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A.** (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* **376**: 952-965
- Szurmant, H., White, R.A., and Hoch, J.A.** (2007) Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 706-715

- Tang, M.**, Waring, A.J., and Hong, M. (2007) Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. *J Magn Reson* **184**: 222-227
- Teramoto, H.**, Inui, M., and Yukawa, H. (2012) *Corynebacterium glutamicum* CsoR acts as a transcriptional repressor of two copper/zinc-inducible P(1B)-type ATPase operons. *Biosci Biotechnol Biochem* **76 (10)**: 1952-8
- Thompson, A.K.**, Gray, J., Liu, A., and Hosler, J.P. (2012) The roles of *Rhodobacter sphaeroides* copper chaperones PCu<sub>A</sub>C and Sco (PrrC) in the assembly of the copper centers of the aa<sub>3</sub>-type and cbb<sub>3</sub>-type cytochrome c oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1817 (6)**: 955-964
- Towbin, H.**, Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76 (9)**: 4350-4
- Tsukihara, T.**, Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269 (5227)**: 1069-74
- van Bakel, H.**, Strengman, E., Wijmenga, C., and Holstege, F.C.P. (2005) Gene expressing profiling and phenotype analyses of *S. cerevisiae* in response to changing copper reveals six genes with new roles in copper and iron metabolism. *Physiol Genomics* **22**: 356-367
- van der Rest, M.E.**, Lange, C., and Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 541-545
- Walter, T.S.**, Meier, C., Assenberg, R., Au, K.-F., Ren, J., Verma, A., Nettleship, J.E., Owens, R.J., Stuart, D.I., and Grimes, J.M. (2006) Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. *Structure* **14**: 1617-1622
- Wendisch, V. F.**, Spies, M., Reinscheid, D. J., Schnicke, S., Sahm, H., and Eikmanns, B. J. (1997) Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch Microbiol* **168**: 262-269
- Wendisch, V.F.**, Zimmer, D.P., Khodurski, A., Peter, B., Cozzarelli, N., and Kustu, S. (2001) Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal Biochem* **290 (2)**: 205-13
- White, S.H.** (2004) The progress of membrane protein structure determination. *Protein Sci* **13**: 1948-1949
- Witan, J.**, Bauer, J., Wittig, I., Steinmetz, P.A., Erker, W., and Unden, G. (2012) Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol Microbiol* **85 (5)**: 846-61
- Wöhri, A.B.**, Johansson, L.C., Wadsten-Hindricsen, P., Wahlgren, W.Y., Fischer, G., Horsefield, R., Katona, G., Nyblom, M., Öberg, F., Young, G., Codgell, R.J., Fraser, N.J., Engström, S., and Neutze, R. (2008) A lipidic-sponge phase screen for membrane protein crystallization. *Structure* **16**: 1003-1009

**Yoshida, Y., Furuta, S., and Niki, E. (1993)** Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim biophys Acta* **1210**: 81-88

**Zaade, D. (2007)** Charakterisierung der Zwei-Komponentensysteme CgtSR5 und CgtSR9 von *Corynebacterium glutamicum*. Masterarbeit, Technologie-Transfer-Zentrum, Hochschule Bremerhaven

**Zhang, L., Koay, M., Maher, M.J., Xiao, Z. and Wedd, A.G. (2006)** Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu<sup>I</sup>Cu<sup>II</sup> forms. *J Am Chem Soc* **128**: 5834-5850

**Zhou, X., Keller, R., Volkmer, R., Krauss, N., Scheerer, P., and Hunke, S. (2011)** Structural basis for two-component system inhibition and pilus sensing by the auxiliary CpxP protein. *J Biol Chem* **286 (11)**: 9805-9814

## Anhang

### 1. Initiale Kristallisationsbedingungen für N<sub>GHM</sub>CopS

**Tabelle A1:** Initiale Bedingungen und erfolgreiche Optimierungen für Kristallisation von N<sub>GHM</sub>CopS.

Bed.	Screen	Zusammensetzung	Additiv	Methode
A6	JBScreen 1	20% (w/v) PEG 550 MME, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5		Microbatch
A6-b	-	20% (w/v) PEG 550 MME, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5	0,075% (w/v) Dextransulfat	Microbatch
A6-c	-	20% (w/v) PEG 550 MME, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5	0,075% (w/v) Dextransulfat	<i>hanging drop</i>
A6-d	-	20% (w/v) PEG 550 MME, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5	0,075% (w/v) Dextransulfat, 0,025 mg/ml AMP-PNP	<i>hanging drop</i>
C6	JBScreen 2	30% (w/v) PEG 4000		
C4	JBScreen 2	22% (w/v) PEG 4000, 50 mM Tricine, pH 8,0		
B2	JBScreen 1	35% (w/v) PEG 600		

### 2. Transkriptomvergleiche *C. glutamicum* WT unter Kupfer-Mangel vs. WT und $\Delta$ cg2699 vs. WT

**Tabelle A2:** Liste der Gene mit einem mindestens 2-fach veränderten mRNA-Level in den Transkriptomvergleichen WT kultiviert unter Kupfer-Mangel vs. WT kultiviert unter Standardbedingungen oder  $\Delta$ cg2699 vs. WT (beide kultiviert unter Standardbedingungen). Wenn die Werte in einem Transkriptomvergleich weniger als 2-fach verändert wurden, wurden diese aufgeführt. Beide Transkriptomvergleiche wurden für die Zellen aus der späten exponentiellen Phase ( $OD_{600} = 20$ ) durchgeführt. Die Stämme wurden in Standard-CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose (= Standardbedingung) bzw. in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose + 150  $\mu$ M BCS + 1 mM Ascorbat (Kupfer-Mangel) kultiviert. mRNA-Verhältnisse repräsentieren Mittelwerte aus je drei unabhängigen Versuchen ( $n = 3$ ), die von verschiedenen Kultivierungen ausgehen. n. b.: p-Wert konnte nicht bestimmt werden ( $n = 1$ ).

Locus tag	Gen-Name	Beschreibung	WT Cu-Mangel/WT		$\Delta$ cg2699/WT	
			Mittelwert	p-Wert	Mittelwert	p-Wert
cg0133		<i>p</i> -Aminobenzoyl-Glutamat Transporter	0,27	0,07	0,25	0,00
cg0175		Putatives sekretiertes Protein	2,03	0,05	2,02	0,02
cg0197	<i>iolC</i>	Carbohydrat-Kinase			0,49	0,04
cg0198		Hypothetisches Protein	0,18	n. b.	0,42	0,04
cg0199	<i>msmA</i>	Aldehyd-Dehydrogenase	0,38	0,06	0,46	0,02
cg0303	<i>leuA</i>	2-Isopropyl-Malat-Synthase	0,72	0,01	0,49	0,00
cg0316		Putatives sekretiertes	2,07	0,07	4,09	0,02

cg0405		Protein Cobalamin/Fe <sup>3+</sup> -Siderophor- Lipoprotein			0,49	0,03
cg0508		Sekretiertes Lipoprotein	0,35	0,03	0,44	0,00
cg0569		Kation-transportierende ATPase	4,74	0,04	4,19	0,06
cg0706		Membranprotein	1,47	0,02	2,58	0,05
cg0759	<i>prpD2</i>	Hypothetisches Protein, Propionat-Katabolism	4,66	n. b.	0,12	0,00
cg0760	<i>prpB2</i>	Methylisocitrat-Lyase	6,11	n. b.	0,15	0,00
cg0762	<i>prpC2</i>	2-Methylcitrat-Synthase	9,45	n. b.	0,15	0,00
cg0898		Hypothetisches Protein, Pyridoxin-Biosynthese	0,53	0,00	0,35	0,01
cg0899		Glutamin-Amidotransferase, Pyridoxin-Biosynthese	0,45	0,02	0,33	0,01
cg0924		Sekretiertes Siderophor- Bindeprotein	0,27	0,02	0,18	0,08
cg0927		Siderophor-ABC-Transporter, Permease-Komponente	0,45	0,05	0,37	0,10
cg0933		DNA- oder RNA-Helikase	2,03	0,04	1,72	0,11
cg0952		Putatives integrales Membranprotein	0,31	0,03	0,23	0,00
cg0953		Monocarboxylat-Transporter	0,31	0,05	0,23	0,00
cg0957	<i>fas-IB</i>	Fettsäure-Synthase	0,42	0,01	0,98	0,44
cg1083	<i>cgtS10</i>	Putative Sensorkinase, Zweikomponenten-System	2,32	0,09	1,92	0,01
cg1085		Hypothetisches Protein	0,50	0,03	0,43	0,00
cg1090	<i>ggtB</i>	Gamma-Glutamyl- Transpeptidase	0,42	0,16	0,46	0,01
cg1092		Putatives sekretiertes Protein	1,85	0,05	2,85	0,01
cg1101		ABC-Typ Multidrug/Protein/Lipid Transportsystem, Membran- komponente	2,28	0,03	1,65	0,03
cg1214		Cystein-Sulfinat- Desulfinase/Cystein- Desulfurase	1,05	0,29	2,36	0,01
cg1215	<i>nadC</i>	Nicotinatnucleotid- Pyrophosphorylase	1,10	0,18	2,30	0,00
cg1216	<i>nadA</i>	Guinolinat-Synthetase	1,78	0,02	2,41	0,00
cg1218		ADP-Ribose- Pyrophosphatase	1,64	0,02	2,51	0,02
cg1289		Permease			0,40	0,01
cg1290	<i>metE</i>	5-Methyltetrahydropteroyl- triglutamat-Homocystein Methyltransferase	0,45	0,23	0,37	0,01
cg1291		Hypothetisches Protein	2,15	0,00	3,06	0,04
cg1292		Flavin-haltige Monoxygenase	0,41	0,04	0,50	0,02
cg1293	-	Putatives sekretiertes Protein	0,32	0,01	0,43	0,00

cg1298	<i>cydC</i>	ABC-Typ Transportsystem, ATPase Komponente	27,79	0,01	8,79	0,00
cg1299	<i>cydD</i>	ABC-Typ Transportsystem, ATPase Komponente	10,54	0,02	16,09	0,00
cg1300	<i>cydB</i>	Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase, Untereinheit II	14,55	0,03	12,55	0,00
cg1301	<i>cydA</i>	Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase, Untereinheit I	14,99	0,01	14,03	0,00
cg1424	<i>lysE</i>	Lysin-Efflux-Permease	3,30	0,01	2,16	0,01
cg1612		Acetyltransferase			0,49	0,00
cg1613	<i>sseA2</i>	Rhodanase-verwandte Sulfurtransferase	0,77	0,29	0,44	0,01
cg1626		Hypothetisches Protein	1,12	0,36	2,36	0,02
cg1628		Hydrolase	1,19	0,33	2,90	0,03
cg1744	<i>pacL</i>	Kation-transportierende ATPase	4,01	0,09	3,27	0,01
cg1769	<i>ctaA</i>	Häm- <i>a</i> -Synthase, Häm- <i>o</i> - Monooxygenase	2,75	0,01	5,90	0,01
cg1773	<i>ctaB</i>	Häm- <i>o</i> -Synthase, Protohäm IX-Farnesyl-Transferase	8,49	0,07	5,83	0,00
cg1809		DNA-abhängige RNA- Polymerase, Omega- Untereinheit	2,13	0,01	1,13	0,34
cg1832		Permease eines ABC- Transporters	6,69	0,00	1,58	0,01
cg1833		ABC-Typ Cobalamin/Fe <sup>3+</sup> - Siderophor-Transport- System, sekretierte Komponente	8,56	0,00	2,51	0,03
cg1836		Sekretiertes Solut-bindendes Protein	0,33	0,09	0,67	0,12
cg1881		Vorhergesagte Eisen- abhängige Peroxidase, sekretiertes Protein	12,84	0,02	15,37	0,00
cg1883		Putatives sekretiertes Protein	12,01	0,02	16,49	0,00
cg1884		Hypothetisches Protein	12,94	0,01	16,99	0,00
cg2094		Hypothetisches Protein			2,19	0,03
cg2403	<i>qcrB</i>	Cytochrom- <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex, Cytochrom <i>b</i> Unterheit	0,31	0,01	0,58	0,03
cg2404	<i>qcrA</i>	Cytochrom- <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex, Rieske Eisen-Schwefel Protein	0,34	0,01	0,63	0,04
cg2405	<i>qcrC</i>	Cytochrom- <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex, Cytochrom <i>c</i> <sub>1</sub> Untereinheit	0,35	0,02	0,66	0,01
cg2406	<i>ctaE</i>	Cytochrom- <i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase, Untereinheit III	0,31	0,00	0,66	0,02
cg2407		Hypothetisches Protein	1,35	0,13	1,97	0,04

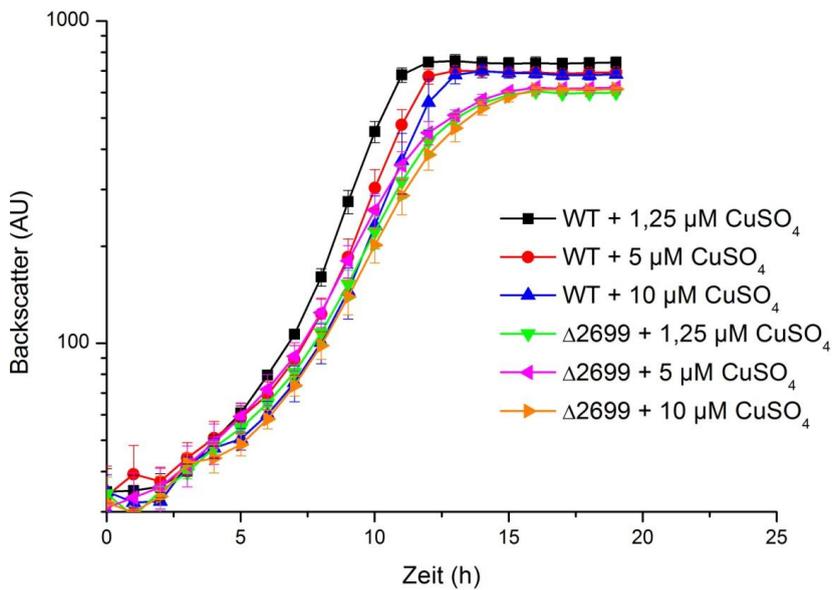
cg2408	<i>ctaF</i>	Hypothetisches Protein	0,45	0,23	1,44	0,24
cg2409	<i>ctaC</i>	Cytochrom- <i>aa</i> <sub>3</sub> -oxidase, Untereinheit II	0,58	0,2	1,35	0,17
cg2438		Hypothetisches Protein	0,47	0,01	0,30	0,00
cg2467		ABC-Transporter, ATP- Bindeprotein	0,43	0,04	0,46	0,05
cg2468		ABC-Transportsystem für verzweigte Aminosäuren, Permease- Komponente	0,43	0,04	0,47	0,01
cg2470		ABC-Transporter, Substrat- Bindeprotein	0,42	0,04	0,44	0,00
cg2545		Putatives sekretiertes Protein oder Membranprotein	0,02	0,16	0,39	0,01
cg2546		Hypothetisches Protein	0,03	0,08	0,34	0,00
cg2556		Eisen-reguliertes Membranprotein	10,04	0,03	6,49	0,00
cg2557		Vorhergesagter Na <sup>+</sup> - abhängiger Transporter	0,29	0,01	0,43	0,02
cg2560	<i>aceA</i>	Isocitrat-Lyase	0,56	n. b.	0,39	0,00
cg2636	<i>catA1</i>	Catechol 1,2-Dioxygenase	0,58	0,09	0,49	0,02
cg2677		ABC-Typ Dipeptid/Oligopeptid/Nickel Transportsystem, Permease- Komponente	0,99	0,44	2,19	0,02
cg2678		ABC-Typ Dipeptid/Oligopeptid/Nickel Transportsystem, sekretierte Komponente	0,80	0,33	2,11	0,02
cg2687	<i>metB</i>	Cystathionin-Gamma- Synthase	0,38	0,13	0,47	0,01
cg2697		Einzelstrang-DNA Bindeprotein			12,37	0,00
cg2699		Membranprotein	4,94	0,01	0,05	0,01
cg2748		Hypothetisches Protein	1,87	0,04	2,37	0,02
cg2750		Hypothetisches Protein	6,88	0,01	6,28	0,00
cg2780	<i>ctaD</i>	Cytochrom- <i>aa</i> <sub>3</sub> -Oxidase, Untereinheit I	0,91	0,40	1,45	0,11
cg2782	<i>ftn</i>	Ferritin-ähnliches Protein	2,43	0,03	3,53	0,08
cg2836	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA-Synthetase, $\alpha$ - Untereinheit	6,58	n. b.	0,26	0,00
cg2837	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Synthetase, $\beta$ - Untereinheit	1,03	0,48	0,22	0,01
cg2890		Putatives Aminosäuren- Processorprotein	2,46	0,03	2,03	0,01
cg2929	<i>nagA1</i>	pN-Acetylglucosamin-6- Phosphat- Deacetylase	2,15	0,03	1,80	0,00
cg2958	<i>butA</i>	L-2,3-Butandiol- Dehydrogenase/Acetoin- Reduktase	2,75	0,09	2,16	0,04
cg2962		Hypothetisches Protein,	1,72	0,18	2,19	0,02

---

		Biosynthese von extrazellulären Polysacchariden				
cg3022		Acetyl-CoA-Acetyltransferase			0,26	0,01
cg3096	<i>ald</i>	Alcohol-Degydrogenase	0,63	0,08	0,48	0,03
cg3138		Putativer membrangebundener Protease-Modulator	1,20	0,21	4,83	0,00
cg3139		Hypothetisches Protein	1,33	0,09	3,57	0,01
cg3140	<i>tagA1</i>	DNA-3-Methyladenin-Glycosylase	1,10	0,33	3,50	0,00
cg3141	<i>hmp</i>	Flavohämoprotein	0,48	0,05	1,15	0,04
cg3195		Flavin-haltige Monooxygenase	0,58	0,12	0,23	0,00
cg3227	<i>lldA</i>	Putative L-Lactatdehydrogenase	0,51	0,06	0,48	0,02
cg3267		Hypothetisches Protein	0,45	0,03	0,74	0,13
cg3335		Malat-Dehydrogenase	0,35	0,02	0,11	0,00
cg3367		ABC-Transporter, ATPase-Komponente	2,18	0,00	2,57	0,01
cg3368		ABC-transporter, Permease-Komponente	2,55	0,03	2,45	0,01
cg3372		Hypothetisches Protein	0,59	0,18	0,46	0,00
cg3374		Putative NADH-abhängige Flavin-Oxidoreduktase	0,12	0,20	0,44	0,02

---

### 3. Wachstum der $\Delta cg2699$ -Mutante bei leichtem Kupfer-Überschuss



**Abbildung A1:** Wachstum von *C. glutamicum* WT und  $\Delta cg2699$ -Mutante in Standard-CGXII-Medium (1,25  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ), in CGXII-Medium mit 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  und mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . Die Kultivierung erfolgte in CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose im BioLector-System in 800  $\mu\text{l}$  CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose bei 1200 Upm und 30 °C. Die Vorkultivierung der beiden Stämme erfolgte in 100 ml Schüttelkolben mit 20 ml CGXII-Medium + 4% (w/v) Glucose. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung.

## 4. Sequenzvergleiche

```

1           10          20          30          40          50
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      MDEQVVAEGSGGVSSPVNKSQVKSSKVRITWPFYVLFVAFVAGLVGVILAWG

60          70          80          90          100         110         120
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      FLSES L AALGIPDPGPMTTAGLPFLRAVGWIVAALSAGSFMATTFFLSPRETKRSAEDGPOKASYLNRSY
CopD_P.s.   MHTALIVCLRVLVHFVTVLMLFGLCLARMLPLGLSLE

130         140         150         160         170         180         190
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      LSV DGS TAARTGSFAAICFGLVAIVMIPMVMSDLSGQPFEALKLQNWAI AFEQVALAKAWAWVAGFAFTI
CopD_P.s.   RAVPRFTAARLTPALCLVALLSAVGVLLLTAA SMAGN-WADGFDRDTLLLVLGNTSFGKIWA WHLCLNLL

200         210         220         230         240         250         260
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      TGIAGLFCRTWLAQPIIFLAGSIIIMTVPLGLEGHS AAGG--DHDYGTNSLLMHLVLMLLVWGGLMALIAHA
CopD_P.s.   LLII-LAAADTPSPILRLALAFSLLATLAPIGHVAMFDGLSGQLMILNQLHLCAVGAQLGGGLLSQL

270         280         290         300         310         320         330
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      FRI G---PNMDMAVRYSIIATYAVIGMAISGVVNALLRMDFSDLF----TTNYGLVFAKAVGVVVVG
CopD_P.s.   RCLGAVAADMRAILIRFSSLGYLLVALIATGLIN V---RAMSGAFWPQPALSGGLILIGIKASMVLCML

340         350         360         370         380         390         400
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      MFGLAHRFTTIPKLEKDPKNSAIFTRITAI VEVLAMAAVTGV AISMGRTPPPAPEIQDLSVMALEMGSYLE
CopD_P.s.   ALAIFNRMLNLN---RRDLPTGVLRITSIIFESLFGVAALLAVSL-LGTLPP LQAG

410         420         430         440         450         460         470
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      KEPTLLNVF---TMRFDIMLGTIGIMLAFYVMGLVALRRQAKKWNHM---RTFWVWLGCIITLVVTVSS
CtaG_B.s.   MNQLDVEGFRAMNSPYLFCILLGITVLYLYFY----RRMSSKPNRITGKEMVCFLSAMLFLYAAEGS

480         490         500         510         520         530         540
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      GIGMNPATFSMHMVAHMLLSMVVVPVFLVLCALSLIMEAVAPGEPGRPLGHEWAAVMTDNP LLKIMHP
CtaG_B.s.   PVDLLGHIMFSAHMVQMAVLYLVVPP LLIAGIPAWLNEKVIF----RPAI-----KVFVFSFTKP

550         560         570         580         590         600         610
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      AVNTIQFIITIFALYLTPI-YDLMVSEHAGHLLMNFV FVISGYVYYWEMIGPDPKPEERTHVSRILAWLTF
CtaG_B.s.   LIALLLNGIE-SLYHVPLIFDITVKTDSLYHTIMTWVIFVLAFLMWWPLVHKVERLRQLSGLMKLGYIMA

620         630         640         650         660         670         680
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      SMPFHLFFGVYLMQLQVITAEDEFYTKLNLPWEVDL AYDQLVGGGI AWAS-GSFPLIVVFGYLFRCGNFREE
CtaG_B.s.   DGMLLTPACALIMFSGAPLYATYTDPSAWAEAMKLCVPADMMGQVPLTGPEMNTLPLEDQQLGAVMMK

690         700         710         720         730
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cg2699      RIVKKNYQARAEATGYADAEYNRMLARMNEGHDMHGDY YOEITFEPKDKDKDKE
CtaG_B.s.   IIQIVYGTFLAIVFFQWVKKE----REKDGQEEP-PY IQQITIS

```

**Abbildung A2:** Sequenzvergleich zwischen Cg2699 aus *C. glutamicum* und CopD aus *P. syringae* (CopD\_P.s.) bzw. CtaG aus *B. subtilis* (CtaG\_B.s.). Die Sequenzen von Cg2699 und CopD\_P.s. waren zu 25%, von Cg2699 und CtaG\_B.s. zu 22% identisch (NCBI BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.com>).





## Danksagung:

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Bott für die Vergabe des spannenden Themas, für sehr gute Betreuung und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Georg Groth danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Unterstützung bei den Kristallisationsversuchen.

Bei Prof. Dr. Henrike Heise bedanke ich mich für die Einführung in die spannende Methode der Festkörper-NMR.

Dr. Melanie Brocker danke ich für sehr gute Betreuung, viele wertvolle Tipps und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Bei der NRW Forschungsschule BioStruct bedanke ich mich für die Vergabe des Stipendiums und die Finanzierung in den ersten drei Jahren

Bei Dr. Daniel Schlieper, Mariana Grieben, Dr. Astrid Höppner und anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Groth möchte ich mich für die Hilfe bei den Kristallisationsansätzen, Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung im Labor bedanken.

Dr. Santhosh Ayalur-Karunakaran gilt ein besonderer Dank für die Durchführung der Festkörper-NMR-Messungen und seine Hilfsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die schöne Zeit im Labor und Büro bedanken. Ein besonderer Dank gilt Tina für ihre tolle Unterstützung im letzten Abschnitt dieser Arbeit.

Nurije, Boris und Andreas danke ich fürs Gesellschaftsleisten bei Mittagessen und Kaffeepausen und für ihre Freundschaft, die sicherlich auch nach der Zeit am IBT bestehen bleibt.

Freunden und Familie danke ich für ihre Unterstützung und dafür, dass sie an mich geglaubt haben.

Juri und Alina danke ich einfach für alles.

Band / Volume 65

**Rapid Development of Small-Molecule producing Microorganisms based on Metabolite Sensors**

S. Binder (2013), 138 pp

ISBN: 978-3-89336-872-3

Band / Volume 66

**Increasing the NADPH supply for whole-cell biotransformation and development of a novel biosensor**

S. Solvej (2013), 130 pp

ISBN: 978-3-89336-900-3

Band / Volume 67

**Expression, purification and biophysical characterization of human Presenilin 2**

G. Yang (2013), 159 pp

ISBN: 978-3-89336-928-7

Band / Volume 68

**Modifikationen der Atmungskette in *Corynebacterium glutamicum* und Rolle des Flavohämoproteins Hmp**

L. Platzen (2013), IV, 119 pp

ISBN: 978-3-89336-931-7

Band / Volume 69

**L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse**

K. Hoffmann (2014),vi, 83 pp

ISBN: 978-3-89336-939-3

Band / Volume 70

**Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the adipate precursor 2-oxoadipate**

M. Spelberg (2014), 118 pp

ISBN: 978-3-89336-954-6

Band / Volume 71

**Design and application of metabolite sensors for the FACS-based isolation of feedback-resistant enzyme variants**

G. Schendzielorz (2014), 129 pp

ISBN: 978-3-89336-955-3

Band / Volume 72

**The development and application of a single cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids**

N. Mustafi (2014), 137 pp

ISBN: 978-3-89336-956-0

Band / Volume 73

**Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of L-leucine and 2-ketoisocaproate**

M. Vogt (2014), VI, 92 pp

ISBN: 978-3-89336-968-3

Band / Volume 74

**Pupplierung in *Corynebacterium glutamicum***

A. Küberl (2014), VI, 163 pp

ISBN: 978-3-89336-969-0

Band / Volume 75

**Tat-translocase composition in *Corynebacterium glutamicum* and the effect of TorD coexpression**

D. Oertel (2014), v, 117 pp

ISBN: 978-3-89336-996-6

Band / Volume 76

**The 6C RNA of *Corynebacterium glutamicum***

J. Pahlke (2014), II, 144 pp

ISBN: 978-3-95806-003-6

Band / Volume 77

**Anaerobes Wachstum von *Corynebacterium glutamicum* durch gemischte Säurefermentation**

A. Michel (2014), 145 pp

ISBN: 978-3-95806-010-4

Band / Volume 78

**Engineering of *Corynebacterium glutamicum* towards utilization of methanol as carbon and energy source**

S. Witthoff (2015), V, 113 pp

ISBN: 978-3-95806-029-6

Band / Volume 79

**Interaction of the two-component systems HrrSA and ChrSA in *Corynebacterium glutamicum***

E. Hentschel (2015), V, 118 pp

ISBN: 978-3-95806-053-1

Band / Volume 80

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum***

X. Schuplezow (2015), 114 pp

ISBN: 978-3-95806-085-2



**Gesundheit / Health**  
**Band / Volume 80**  
**ISBN 978-3-95806-085-2**

