

MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator
aus *Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Melanie Brocker

aus Willich

Oktober 2006

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Forschungszentrum Jülich GmbH unter Anleitung von Prof. Dr. M. Bott durchgeführt.

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

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

Korreferent: Prof. Dr. Johannes H. Hegemann
Institut für Mikrobiologie
Lehrstuhl für funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2006

Ausschnitte der vorliegenden Dissertation erschienen in den folgenden Publikationen:

Möker, N.*, Brocker, M.*, Schaffer, S., Krämer, R., Morbach, S., and Bott, M. (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**: 420-438.

Brocker, M. and Bott, M. (2006) Evidence for activator and repressor functions of the response regulator MtrA from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 205-212.

* Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

I	Abstract	1
II	Zusammenfassung	3
III	Einleitung	5
1	Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in <i>C. glutamicum</i>	6
2	Das MtrAB-Zweikomponentensystem	7
3	Das Thema der Arbeit	11
IV	Material und Methoden	12
1	Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen)	12
2	Nährmedien	12
3	Oligonukleotide	13
4	Plasmide	20
5	Bakterienstämme	22
6	Stammhaltung von Bakterienstämmen	22
7	Kultivierung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	23
8	Expressionskulturen	23
9	Molekularbiologische Methoden	24
9.1	DNA-Isolierung.....	24
9.2	DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung	25
9.3	Agarose-Gelelektrophorese	25
9.4	Rekombinante DNA-Techniken.....	25
9.5	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
9.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	27
9.7	Konstruktion von Deletionsmutanten.....	28
9.8	Polymerasekettenreaktion.....	29
9.9	Southern-Blot-Analyse	29
9.10	DNA-Sequenzierung	30
10	Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays	31
10.1	Isolierung von RNA	31
10.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	31
10.3	DNA-Chip-Hybridisierung	32
10.4	Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips	33
10.5	Auswertung der DNA-Microarray-Experimente.....	34
11	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts	34
11.1	„Primer-Extension“-Experimente	34
11.2	5`-RACE	35

12	Transmissionselektronenmikroskopie	36
13	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)	36
14	Proteinbiochemische Methoden	37
14.1	Zellaufschluß mit einer French-Press-Zelle und Zellfraktionierung	37
14.2	Affinitätschromatographie mittels „Ni ²⁺ -Nitrilotriacetic acid“ (NTA)-Agarose.....	37
14.3	Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz	38
14.4	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen	38
14.5	Proteinverdau mittels Thrombin.....	38
14.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
14.7	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen	39
14.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
14.9	Western-Blot	40
14.10	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	41
15	Phosphorylierungsexperimente	42
16	DNA-Protein-Interaktionsstudien	43
16.1	ChIP-to-chip	43
16.2	DNA-Affinitätsreinigungen	44
16.3	Gelretardationsexperimente	45
17	Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed-phase</i> HPLC	46
V	Ergebnisse	48
1	Die $\Delta mtrAB$-Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp	48
2	Konstruktion und Charakterisierung der $\Delta mtrA$-, $\Delta mtrB$-, $\Delta mtrAB\Delta mepA$- und $\Delta mtrAB\Delta ppmA$-Mutanten	52
3	Vergleichende Transkriptomanalyse von $\Delta mtrA$ und <i>C. glutamicum</i> Wildtyp	56
4	<i>In-vitro</i> Charakterisierung von MtrA+N_{GSH}	58
4.1	Heterologe Überproduktion, Reinigung und Verdau von MtrA+NHis ₆	59
4.2	Bestimmung des nativen Molekulargewichts	61
4.3	<i>In-vitro</i> -Phosphorylierung von MtrA+N _{GSH} durch verschiedene Sensorkinase- Derivate	63
5	DNA-Protein-Interaktionsstudien mit MtrA	67
5.1	ChIP-to-chip-Experimente	67
5.2	Affinitätsreinigungen.....	68
5.3	Gelretardationsexperimente	72
5.3.1	Identifizierungen von MtrA-Bindestellen und Herleitung eines Konsensusmotivs	72

5.3.2	Vergleich der Affinität von unphosphoryliertem und phosphoryliertem MtrA+N _{GSH} zu verschiedenen Promotorregionen.....	77
5.4	Identifizierung weiterer direkter Zielgene von MtrA.....	79
VI	Diskussion.....	86
1	Phänotypische Charakterisierung verschiedener <i>C. glutamicum</i> -Mutanten	86
2	Identifizierung direkter Zielgene von MtrA.....	91
3	Funktion des MtrAB-Zweikomponentensystems.....	98
VII	Literaturverzeichnis.....	101
VIII	Anhang.....	108
A1	Alignment von MtrA aus verschiedenen Corynebakterien und Mykobakterien.....	108
A2	Alignment von MtrB aus verschiedenen Corynebakterien und Mykobakterien.....	110
A3	Restriktionskarten der konstruierten Plasmide.....	116
A4	PCR-Fragmente für Gelretardationsexperimente.....	121
A5	Auflistung aller möglichen Zielgene und die zugehörigen Ergebnisse aus den Transkriptomchip- und den CHIP-to-chip-Experimenten.....	124

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
λ	Lambda, Wellenlänge
μ	mikro (10^{-6}) oder Wachstumsrate
A	Ampère oder Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
Amp ^R	Ampicilinresistenz
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion – Sorbitol
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ChIP-to-chip	chromatin immunoprecipitation-to-microarray
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EDTA	siehe Na ₂ EDTA
F	Farad
g	Gramm
<i>g</i>	-fache Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)
G	Guanin
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactopyranosid
k	Kilo (10^3)
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli- (10^{-3}) oder Meter
M	molar (mol/l) oder mega- (10^6)
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight
MIC	minimal inhibitory concentration

min	Minute(n)
MOPS	3- <i>N</i> -Morpholinopropansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidiert
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
NCBR	Cyanobromid
NTA	nitrilotriacetic acid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
orf	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium Saline Citrate
T	Thymin
TAE	Tris base - Acetic acid - EDTA
TBE	Tris base - Boric acid - EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris base – EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TES	Tris base - EDTA - Sodium chlorid
TNI	Tris base – NaCl - Imidazol
Triton X-100	4-Octylphenolpolyethoxylat
U	Unit (1 Unit = 1 μ mol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

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

I Abstract

The membrane-bound sensor kinase MtrB and the response regulator MtrA form one of 13 two-component systems in the gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum*. The MtrAB system is highly conserved in actinomycetes and therefore presumably plays an important role in the adaptation of these bacteria to the environment. In this work the function of the MtrAB system was studied by the analysis of different mutant strains and by the identification of direct target genes of MtrA. The following results were obtained:

1. Cells of a $\Delta mtrAB$ mutant showed an abnormal morphology and an altered antibiotics susceptibility. They were more sensitive to penicillin, vancomycin and lysozyme but more resistant to ethambutol. A comparable phenotype was observed for $\Delta mtrA$ and $\Delta mtrB$ mutants. Only the sensitivity of $\Delta mtrB$ to ethambutol was comparable to that of the wild type.

2. Transcriptome comparisons with DNA microarrays disclosed genes with an altered mRNA level in the $\Delta mtrAB$ and the $\Delta mtrA$ mutant. Amongst others, the mRNA concentration of *mepA* and *nlpC*, encoding cell wall peptidases, was increased whereas the mRNA level of *betP* and *proP*, encoding importers for betaine and proline, respectively, was decreased.

3. Deletion of *mepA* or *ppmA* in the $\Delta mtrAB$ mutant resulted in strains with the same morphology, growth behaviour and antibiotics susceptibility as $\Delta mtrAB$. Thus, elevated expression of *mepA* or *ppmA* alone is not responsible for the phenotype of the $\Delta mtrAB$ strain.

4. To identify direct target genes of the response regulator MtrA, ChIP-to-chip-analysis, DNA affinity chromatography and gel retardation assays were performed. With latter method, the MtrA binding sites in the promoter regions of *nlpC*, *mepA*, *proP* and *betP* were determined. The binding sites upstream of the repressed genes *mepA* and *nlpC* overlap with the “-10” region, whereas those upstream of the activated genes *betP* and *proP* are located more than 40 bp upstream of the transcriptional start sites. The *in vitro* affinity of unphosphorylated MtrA to repressed genes was twofold higher compared to activated genes.

5. The identified binding sites in the promoter regions of *mepA*, *nlpC*, *betP* and *proP* were used to derive a consensus motif. A search for this motif within the *C. glutamicum* genome and further gel retardation assays revealed 12 additional promoter regions to which MtrA binds, e.g. the promoter region of *ppmA* (putative protease-modulator), *csbD* (putative stress induced protein), *katA* (catalase), *rpf2* (growth factor) and *dnaA* (replication initiation protein).

6. The majority of genes activated by MtrA are involved in different types of stress, e.g. *betP* and *proP* in hyperosmotic stress or *katA* in oxidative stress. Genes repressed by MtrA encode, among others, three putative cell wall peptidases (*mepA*, *nlpC*, *mepB*) and a growth factor (*rpf2*). Moreover MtrA binds to some genes (e.g. *dnaA*) that showed no altered expression in the microarray experiments. These observations suggest that the MtrAB system may play a role in the coordination of stress responses, cell division and growth.

II Zusammenfassung

Die Sensorkinase MtrB und der Antwortregulator MtrA bilden eines von 13 Zweikomponentensystemen in dem Gram-positiven Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum*. Das MtrAB-System ist in Actinomyceten hoch konserviert und spielt daher vermutlich eine wichtige Rolle bei der Anpassung dieser Bakterien an ihre Umwelt. In dieser Arbeit wurde die Funktion des MtrAB-Systems in *C. glutamicum* durch Analyse von Mutanten und die Identifizierung direkter MtrA-Zielgene untersucht und dadurch folgende Resultate erhalten:

1. Zellen einer $\Delta mtrAB$ -Mutante zeigten eine abnormale Morphologie und eine veränderte Antibiotika-Sensitivität. Sie waren sensitiver gegenüber Penicillin, Vancomycin und Lysozym, aber resistenter gegenüber Ethambutol. Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch für $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Mutanten beobachtet werden, mit Ausnahme der Ethambutol-Sensitivität der $\Delta mtrB$ -Mutante, die ähnlich der des Wildtyps war.

2. Durch Transkriptomanalysen mit DNA-Microarrays wurden Genen mit veränderter Expression in der $\Delta mtrAB$ und der $\Delta mtrA$ -Mutante identifiziert. Unter anderem zeigten *mepA* und *nlpC*, die für Zellwandpeptidasen kodieren, eine erhöhte mRNA-Konzentration, *betP* und *proP*, die Importer für Betain und Prolin kodieren, dagegen eine erniedrigte mRNA-Konzentration.

3. Die Deletion von *mepA* bzw. *ppmA* in der $\Delta mtrAB$ -Mutante resultierte in Stämmen, die sich bzgl. Morphologie, Wachstum und Antibiotika-Sensitivität wie die $\Delta mtrAB$ -Mutante verhielten. Die erhöhte Expression von *mepA* bzw. von *ppmA* alleine ist also nicht für den Phänotyp der $\Delta mtrAB$ -Mutante verantwortlich.

4. Um die direkten Zielgene des Antwortregulators MtrA zu identifizieren, wurden ChIP-to-chip-Experimente, DNA-Affinitätschromatographie und Gelretardationsstudien durchgeführt. Mit letztgenannter Methode konnten die MtrA-Bindestellen in den Promotorregionen von *nlpC*, *mepA*, *proP* und *betP* identifiziert werden. Bei den reprimierten Genen *mepA* und *nlpC* überlappten sie mit der "-10"-Region, während sie bei den aktivierten Genen *betP* und *proP* mehr als 40 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte lagen. Die *in vitro*-Affinität von unphosphoryliertem MtrA zu *mepA* und *nlpC* war etwa zweifach höher als zu *betP* und *proP*.

5. Von den identifizierten Bindestellen aus *mepA*, *nlpC*, *betP* und *proP* wurde ein Konsensusmotiv abgeleitet und zur Suche nach Bindungsstellen im *C. glutamicum*-Genom eingesetzt. So konnten 12 weitere Promotorregionen identifiziert werden, an die MtrA bindet, darunter die Promotorregionen von *ppmA* (putative membrangebundene Protease-Modulator), *csbD* (putatives stressinduziertes Protein), *katA* (Katalase), *rpf2* (Wachstumsfaktor) und *dnaA* (Replikationsinitiations-Protein).

6. Die Mehrzahl der durch MtrA aktivierten Gene sind an der Antwort auf verschiedene Arten von Stress beteiligt, z.B. *betP* und *proP* an hyperosmotischem Stress oder *katA* an oxidativem Stress. Die durch MtrA reprimierten Gene kodieren u. a. drei putative Zellwandpeptidasen (*mepA*, *nlpC*, *mepB*) sowie einen Wachstumsfaktor (*rpf2*). Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Genen (u. a. *dnaA*), an deren Promotorregion MtrA bindet, die aber in Microarray-Experimenten keine veränderte Expression zeigten. Dies deutet daraufhin, dass das MtrAB-System eine übergeordnete Funktion bei der Koordination von Stressantwort, Zellteilung und Wachstum haben könnte.

III Einleitung

Bakterien sind in der Lage, Änderungen in ihrer Umwelt wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Die zunächst in Eubakterien identifizierten Zweikomponentensysteme, die inzwischen auch in Archaea (z. B. *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997)) und einigen Eukaryonten (z. B. *Candida albicans* (Chauhan *et al.*, 2003) und *Arabidopsis thaliana* (Mizuno, 2005; Oka *et al.*, 2002)) nachgewiesen werden konnten, spielen dabei eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu Eukaryonten sind Zweikomponentensysteme in Bakterien weit verbreitet, jedoch nicht ubiquitär. In *Escherichia coli* z. B. wurden 62 Gene für Proteine von Zweikomponentensystemen identifiziert, in *Streptococcus pneumoniae* 27, in *Bacillus subtilis* 70, in *Mycoplasma genitalium* jedoch keines (Robinson *et al.*, 2000).

Zweikomponenten-Regulationssysteme bestehen im typischen Fall aus zwei modularen Proteinen: einer membrangebundenen Sensorkinase, die als Homodimer vorliegt, und einem cytoplasmatischen Antwortregulator. Die Sensorkinase ist aus einer variablen Sensor-Domäne und einer konservierten Kinase-Domäne zusammengesetzt. Der Antwortregulator besteht ebenfalls aus zwei Domänen: der konservierten Regulator-Domäne sowie der variablen Effektor-Domäne (Robinson *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2000).

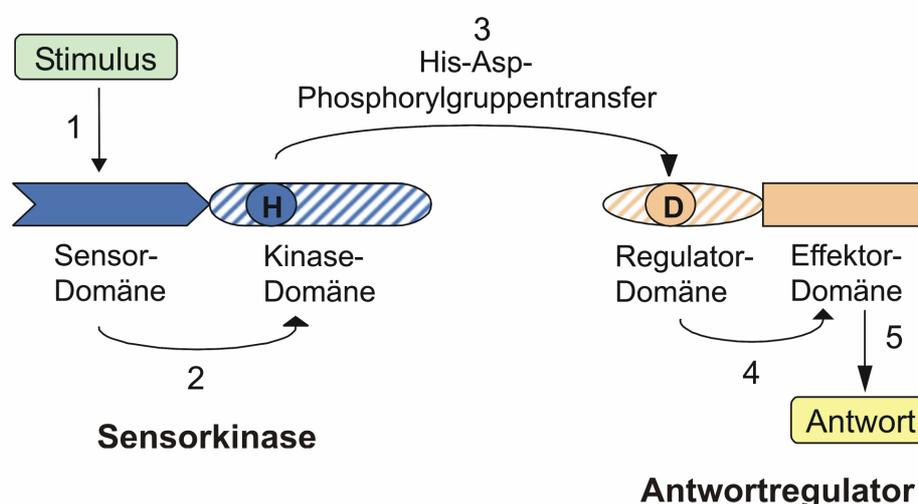


Abb. 1: Funktionsweise eines prototypischen Zweikomponentensystems. Die Erkennung eines bestimmten Stimulus durch die Sensor-Domäne der Sensorkinase (1) löst die Phosphorylierung an einem spezifischen Histidin-Rest eines Monomers durch das andere Monomer des Sensor-Dimers aus (2). Die Phosphorylgruppe wird dann auf einen Aspartat-Rest des Antwortregulators übertragen (3), der durch eine Konformationsänderung die Effektor-Domäne aktiviert (4), welche wiederum die Antwort auslöst (5), meistens die Regulation der Expression von spezifischen Zielgenen.

Die Erkennung eines spezifischen Signals durch die Sensorkinase führt zu einer Phosphorylierungskaskade (vgl. Abb. 1). Zuerst wird die γ -Phosphorylgruppe von ATP auf

einen konservierten Histidin-Rest der Sensor kinase übertragen. Dies geschieht durch Transphosphorylierung eines Monomers durch das andere. Im Anschluss daran katalysiert der Antwortregulator den Transfer der Phosphorylgruppe vom Histidin-Rest der Kinase-Domäne auf einen konservierten Aspartat-Rest innerhalb der eigenen Regulator-Domäne. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Antwortregulators führt zu einer Aktivierung der Effektor-Domäne, welche wiederum die Antwort auslöst. Bei der Antwort handelt es sich meistens um eine Regulation der Expression spezifischer Zielgene. Schließlich wird die Phosphorylgruppe vom Aspartat-Rest auf Wasser übertragen. Für die Autophosphorylierung, den Phosphotransfer und die Dephosphorylierung sind divalente Metallionen, wie z. B. Mg^{2+} , nötig (Robinson *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 2000).

1 Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme in *C. glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein apathogenes, Gram-positives, schnell wachsendes Bodenbakterium. Es ist unbeweglich und bildet keine Sporen. Seinen Namen (koryne bedeutet „Keule“) verdankt es seiner stäbchen- bis keulenartigen Form. Es wurde 1956 bei der Suche nach Glutamat-produzierenden Bakterien von Dr. Shukuo Kinoshita und Mitarbeitern von der Firma Kyowa Hakko Kogyo in Japan isoliert und charakterisiert (Kinoshita *et al.*, 1957). In der Industrie übernimmt es seither eine entscheidende Rolle in der biotechnologischen Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere von L-Glutamat und L-Lysin (Eggeling and Sahm, 2001; Eggeling and Bott, 2005). Darüber hinaus dient *C. glutamicum* als Modellorganismus für seine pathogenen Verwandten wie z. B. *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Sowohl die Mycobakterien als auch die Corynebakterien gehören zur Unterordnung *Corynebacterineae* innerhalb der Ordnung *Actinomycetales*.

Im Genom (3,7 Mbp) von *C. glutamicum* konnten Gene für 13 Sensor kinasen und 13 Antwortregulatoren identifiziert werden, wobei jeweils ein Sensor kinase-Gen unmittelbar neben einem Antwortregulator-Gen lokalisiert war (Kocan *et al.*, 2006). Alle Antwortregulatoren besitzen ein *helix-turn-helix*-Motiv in ihrer Effektor-Domäne, was vermuten lässt, dass es sich um DNA-bindende Proteine handelt, die wahrscheinlich als Transkriptionsregulatoren fungieren. Über die Funktion der Zweikomponenten-Systeme von *C. glutamicum*, die von ihnen detektierten Signale und die von ihnen regulierten Zielgene ist relativ wenig bekannt. Das CitA/CitB-System aktiviert Gene für den Citrat-Transport in die Zelle (Schaffer, Mack und Bott, unveröffentlicht). Das PhoS/PhoR-System ist beteiligt am Auslösen der Phosphatmangel-Antwort (Kocan *et al.*, 2006). Für das CgtS4/CgtR4-System

gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Funktion bei der Phosphatmangel-Antwort sowie bei der Antwort auf oxidativen Stress (Wessel, 2003; Wingens, 2004). Das CgtS9/CgtR9-System spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Kupfer-Homöostase (Brocker und Bott, unveröffentlicht). Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht das MtrA/MtrB-Zweikomponentensystem, für das es Hinweise auf eine Funktion bei der Regulation von Osmostress-Genen sowie von Genen des Zellwandmetabolismus gibt (Brocker, 2003; Brocker and Bott, 2006; Möker *et al.*, 2004).

2 Das MtrAB-Zweikomponentensystem

Das MtrAB-Zweikomponentensystem wurde in *M. tuberculosis* identifiziert, wobei MtrAB für *Mycobacterium tuberculosis* regulator **A** bzw. **B** steht. Wie bei einem prototypischen Zweikomponentensystem ist sowohl die Sensorkinase MtrB als auch der Antwortregulator MtrA modular aufgebaut. Die Tatsache, dass die Effektor-Domäne von MtrA ein *helix-turn-helix*-Motiv enthält, lässt vermuten, dass es sich dabei um ein DNA-bindendes Protein handelt, das als Transkriptionsregulator fungiert. MtrAB war das erste in *M. tuberculosis* vollständig sequenzierte und biochemisch untersuchte Zweikomponentensystem. Zahrt und Deretic konnten durch transkriptionelle Fusion des *mtrA*-Promotors mit dem *gfp*-Gen (kodiert für das grünfluoreszierende Protein GFP) zeigen, dass *mtrA* in *M. bovis* BCG konstitutiv aktiv ist, wohingegen das *mtrA*-Gen in dem pathogenen Stamm *M. tuberculosis* H37Rv während der Infektion von Makrophagen induziert wird. Der Antwortregulator MtrA scheint in *M. tuberculosis* H37Rv essentiell zu sein, da die Deletion des chromosomalen *mtrA*-Gens nur in Anwesenheit einer plasmidkodierten *mtrA*-Kopie möglich war. „Primer-Extension“-Analysen deuten darauf hin, dass das 5`-Ende der mRNA mit dem Translationsstart für MtrA zusammenfällt (Haydel and Clark-Curtiss, 2004; Via *et al.*, 1996; Zahrt and Deretic, 2000).

Die Überproduktion von MtrA, aber nicht die Überproduktion von MtrA und MtrB zusammen, inhibiert die Zellteilung von *M. tuberculosis* in Makrophagen. Vergleiche des mRNA-Levels von *dnaA*, einem essentiellen Replikationsgen, zeigten, dass auch die Expression von *dnaA* nur durch die Überproduktion von MtrA alleine stark induziert wird. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit MtrA-spezifischen Antikörpern bestätigte, dass MtrA *in vivo* an den Promotor von *dnaA* bindet und somit *dnaA* ein Zielgen von MtrA sein könnte. Die Tatsache, dass nur die Überproduktion von MtrA alleine die Zellteilung in Makrophagen inhibierte und zu einem erhöhten mRNA-Level von *dnaA* führte, deutet an, dass das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem MtrA, das durch MtrB kontrolliert wird, eine entscheidene Rolle bei der Regulation der Transkription durch MtrA spielt (Fol *et al.*, 2006).

Kürzlich wurde eine *Mycobacterium avium*-Mutante beschrieben, in der das *mtrB*-Gen durch Insertion einer Kanamycin-Kassette inaktiviert wurde. Diese Mutante ist sensitiver gegenüber Penicillin, Ciprofloxacin (ein Gyraseinhibitor) und Clarithromycin (inhibiert die Proteinbiosynthese) und zeigt eine erhöhte Zellwand-Permeabilität. Darüber hinaus sind die Zellen dieser Mutante verlängert. Verglichen mit dem Wildtyp konnte die Mutante nicht in THP1-Zellen überleben und eine Reihe von Genen, die für Mce-Proteine (mce steht für „mammalian cell entry“) kodieren, zeigten einen erniedrigten mRNA-Level. Mce-Proteine sind auf der Außenseite der mycobakteriellen Zellen lokalisiert und stehen mit der Virulenz in Zusammenhang (Cangelosi *et al.*, 2006).

Die Gene für den Antwortregulator MtrA und die Sensor kinase MtrB in *Corynebacterium glutamicum* liegen wie in Abb. 2 gezeigt unmittelbar benachbart zueinander und werden durch eine intergene Region von 87 bp getrennt. Die *mtrAB*-Gene von *C. glutamicum* sind innerhalb der Actinomycetales und somit auch in den Corynebakterien und Mykobakterien bzgl. Genanordnung (Abb. 2) und Sequenz hochkonserviert (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Das gleiche gilt für ihre Proteinsequenzen (vgl. Anhang A1, Abb. 32 und Anhang A2, Abb. 33).

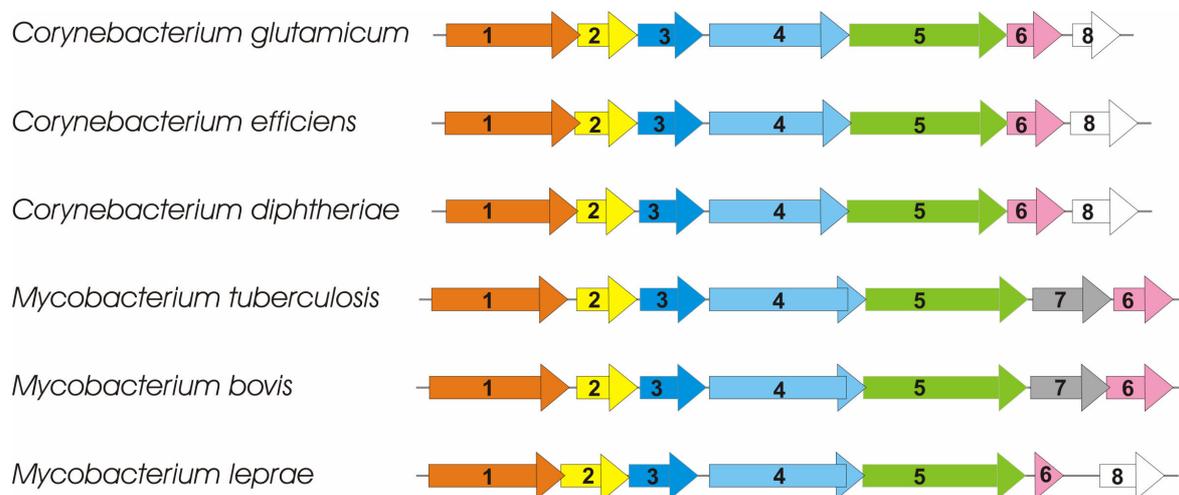


Abb. 2: Vergleich der *mtrAB*-Genregion in verschiedenen Actinomyceten. 1, Gen für die S-Adenosylhomocysteinase (*sahH*); 2, Gen für die Thymidylatkinase (*tmk*); 3, Gen für den Antwortregulator MtrA (*mtrA*); 4, Gen für die Sensor kinase MtrB (*mtrB*); 5, Gen für das Lipoprotein LpqB (*lpqB*); 6, Gen für ein cytosolisches Protein unbekannter Funktion; 7, Gen für eine AAA-ATPase; 8, Gen für das ribosomale Protein S30.

Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* war es in *C. glutamicum* möglich *mtrA* zu deletieren (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Dies und die Tatsache, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem in den Actinomycetales hoch konserviert ist, macht *C. glutamicum*

zu einem idealen Modellorganismus, um das MtrAB-Zweikomponentensystem zu untersuchen.

Erste Hinweise auf die Funktion des MtrAB-Zweikomponentensystems aus *C. glutamicum* wurden durch Vergleiche einer $\Delta mtrAB$ -Deletionsmutante mit dem Wildtypstamm erzielt. In dieser Mutante sind die für MtrA und MtrB kodierenden Genregionen bis auf die ersten sechs *mtrA*-Codons und letzten 12 *mtrB*-Codons deletiert (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Die Zellen der $\Delta mtrAB$ -Mutante sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlängert und an den Enden keulenförmig verdickt (vgl. Abb. 3). Darüber hinaus war die $\Delta mtrAB$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp sensitiver gegenüber Penicillin, Vancomycin und Lysozym, aber resistenter gegenüber Ethambutol. Bei Wachstum der $\Delta mtrAB$ -Mutante auf CGXII-Minimalmedium kam es zu einer starken Ansäuerung des Mediums. Diese hatte zur Folge, dass das Wachstum der Mutante vollständig gehemmt wurde, obwohl noch Glucose im Medium vorhanden war.

Genomweite Transkriptomanalysen mittels DNA-Microarrays zeigten, dass drei Gene einen mehr als 3-fach erhöhten mRNA-Level in der Mutante aufwiesen, nämlich *lpqB*, *mepA* und *ppmA*. Das *lpqB*-Gen, das unmittelbar stromabwärts von *mtrB* lokalisiert ist (siehe Abb. 2), kodiert für ein putatives Lipoprotein mit unbekannter Funktion, *mepA* für eine putative membrangebundene Zellwand-Metalloprotease, deren carboxyterminale Metallopeptidase-Domäne extracytoplasmatisch lokalisiert zu sein scheint und *ppmA* für ein Membranprotein, das möglicherweise die Aktivität von Proteasen moduliert. Darüber hinaus zeigten unter anderem zwei Gene einen mehr als 3-fach erniedrigten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ -Mutante, nämlich *proP* und *betP*. Sie kodieren sekundäre Transporter für den Import von Prolin bzw. Betain und Ectoin. Ihre Aktivität wird bei hyperosmotischem Stress induziert, was zu einer Aufnahme der oben genannten osmotisch aktiven Substanzen führt (Peter *et al.*, 1998). Dot-blot-Experimente zeigten außerdem, dass auch der mRNA-Level von *mscL* und *lcoP* verändert war. *mscL* kodiert für einen mechanosensitiven Kanal und zeigte einen erhöhten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ -Mutante, wohingegen *lcoP* einen weiteren Transporter für die Aufnahme kompatibler Solute kodiert und einen erniedrigten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ -Mutante aufwies. Im Gegensatz dazu war der mRNA-Level von *proB*, das für ein Protein aus dem Prolin-Biosyntheseweg sowie *otsA*, *treS* und *treY*, die für Enzyme aus der Trehalose-Biosynthese kodieren, unverändert.

Die veränderte Zellmorphologie zusammen mit der unterschiedlichen Antibiotika-Sensitivität deutet darauf hin, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem im Zellwandmetabolismus eine Rolle spielt. Die Ergebnisse des genomweiten Transkriptomvergleichs lassen darüber hinaus vermuten, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem auch an der Regulation ausgewählter Osmostress-Gene beteiligt ist (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004).

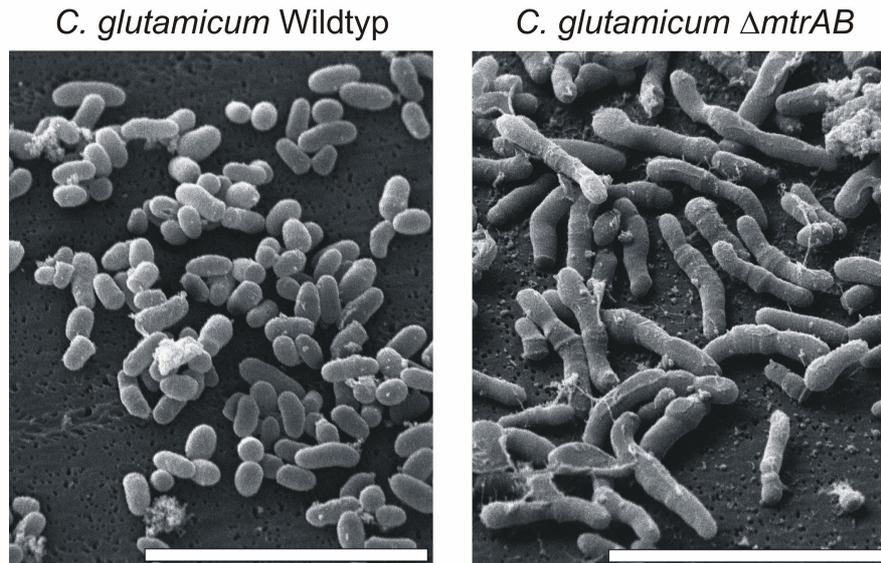


Abb. 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* $\Delta mtrAB$. Die Zellen wurden 15 Stunden bei 30 °C auf MMI-Minimalmediumplatten kultiviert. Der weiße Balken hat eine Länge von 10 μm .

Mit Hilfe der DNA-Microarray-Experimente wurden Gene identifiziert, die in Abwesenheit von MtrAB eine veränderte Expression zeigten. Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, welche dieser Gene unter der direkten Kontrolle von MtrA stehen und welche indirekt durch MtrA reguliert werden. Aus diesem Grunde wurden folgende drei Varianten der MtrAB-Funktion diskutiert (Möker *et al.*, 2004): (1) MtrAB spielt direkt bei der Regulation der Zellwandsynthese eine Rolle und die veränderte Expression der Gene, die an der Osmoregulation beteiligt sind, ist ein indirekter Effekt. (2) MtrAB ist direkt in die Osmoregulation involviert und der Effekt auf die Expression der Zellwand-Gene ist indirekt. (3) MtrAB ist direkt an der Regulation der Zellwandsynthese und der Osmoregulation beteiligt. Um zu entscheiden, ob und wenn ja, welche dieser Möglichkeiten *in vivo* zutrifft, ist die Identifizierung der direkten Zielgene von MtrA mittels DNA-MtrA-Interaktionsstudien nötig.

3 Das Thema der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte das Zweikomponentensystem MtrAB aus *C. glutamicum* funktionell charakterisiert werden. Wie oben erläutert deuten die bisherige phänotypische Charakterisierung einer *mtrAB*-Deletionsmutante sowie genomweite Transkriptomvergleiche zwischen dem Wildtyp und der $\Delta mtrAB$ -Mutante darauf hin, dass MtrAB direkt oder indirekt am Zellwandmetabolismus und an der Osmostressregulation beteiligt ist. Zunächst sollte der Phänotyp der $\Delta mtrAB$ -Mutante in weitergehenden Experimenten detaillierter charakterisiert werden und, um sicherzugehen, dass dieser Phänotyp auf die Deletion der *mtrAB*-Gene zurückzuführen ist, sollte überprüft werden, ob durch die Anwesenheit einer plamidkodierten Kopie der *mtrAB*-Gene eine Komplementation möglich ist. Durch Konstruktion und phänotypische Charakterisierung von $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Mutanten sowie genomweite Transkriptomvergleiche der $\Delta mtrA$ -Mutante mit dem Wildtyp sollten die bereits erhaltenen Ergebnisse überprüft und bestätigt werden. Die Konstruktion und phänotypische Charakterisierung von $\Delta mtrAB\Delta lpqB$, $\Delta mtrAB\Delta mepA$ - und $\Delta mtrAB\Delta ppmA$ -Mutanten sollte Aufschluss darüber geben, ob die erhöhte Expression von *lpqB*, *mepA* oder *ppmA* in der $\Delta mtrAB$ -Mutante für den pleiotropen Phänotyp verantwortlich ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte zwischen direkten und indirekten Zielgenen von MtrA unterschieden werden. Dazu wurden verschiedene DNA-MtrA-Interaktionsstudien durchgeführt, nämlich CHIP-to-chip-Experimente, DNA-Affinitätschromatographie und Gelretardationsstudien. Mit Hilfe der Gelretardationsstudien sollte außerdem die Bindestelle von MtrA in verschiedenen Zielpromotoren identifiziert und untersucht werden, ob die Phosphorylierung des Antwortregulators eine veränderte Affinität zu seinen Zielgenen zur Folge hat.

IV Material und Methoden

1 Pufferlösungen und Antibiotika (Stammlösungen)

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

Biotin:	100 mg/l (sterilfiltriert), 0,4 mM
BS-Puffer	50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM Na ₂ EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5
Calciumchlorid:	10 g/l (sterilfiltriert), 68 mM
Glucose:	50 % (w/v) (autoklaviert), 2,8 M (550 g/l Glucose · H ₂ O)
Kanamycin:	50 mg/ml (sterilfiltriert)
SDS:	10 % (w/v)
20xSSC:	88,23 g/l Na ₃ Citrat · 2H ₂ O, 175,32 g/l NaCl, pH 7,0
“Strip“-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 100 mM Na ₂ EDTA, autoklaviert, entgast mit einer Vakuumpumpe bei einem Vakuum von ca. 840 mbar (Vacuum Pump XF 5423050 von Millipor, Eschborn)
50xTAE-Puffer:	37,2 g/l Na ₂ EDTA · 2H ₂ O, 242 g/l Tris, mit Eisessig <i>ad</i> pH 8,5
10xTBE-Puffer:	55 g/l Borsäure, 7,44 g/l Na ₂ EDTA · 2H ₂ O, 108 g/l Tris
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA
TGED-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl und 1 mM DTT (frisch zusetzen)
TKMD-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT (frisch zusetzen), entgast
TNix-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 300 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin, x mM Imidazol, sterilfiltriert, entgast

2 Nährmedien

SOC-Medium:	20 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 0,6 g/l NaCl (Merck), 0,2 g/l KCl (Merck), nach dem Autoklavieren 1 g/l MgCl ₂ (Merck) (sterilfiltriert) und 4 g/l Glucose (Merck) (separat autoklaviert) zugeben
LB-Medium:	10 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 10 g/l NaCl (Merck)
BHI-Medium:	37 g/l BHI (Difco)
BHIS-Medium:	37 g/l BHI (Difco) und 182 g/l Sorbitol (Merck) (separat autoklaviert)

CGXII-Medium:	20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), 5 g/l Harnstoff (Merck), 1 g/l KH_2PO_4 (Merck), 1 g/l K_2HPO_4 (Merck), 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 10 mg/l CaCl_2 (Merck), 42 g/l MOPS (Roth), 0,2 mg/l Biotin (Merck), pH 7 (mit NaOH 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 (Merck) zugeben
MMI-Medium	5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), 5 g/l Harnstoff (Merck), 2 g/l KH_2PO_4 (Merck), 2 g/l K_2HPO_4 (Merck), 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 10 mg/l CaCl_2 (Merck), 0,2 mg/l Biotin (Merck), pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Spurensalzlösung und 40 g/l Glucose (Merck) zugeben
Spurensalzlösung:	10 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 10 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck), 1 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 0,2 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 20 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1)

Für entsprechende Nährböden wurde den Medien 15 g/l Agar-Agar (Difco) zugesetzt. Wenn erforderlich wurde den Nährmedien Kanamycin zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml (*E. coli*) oder 25 µg/ml (*C. glutamicum*) bzw. Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml (*E. coli*) zugesetzt.

3 Oligonukleotide

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Die mit den Oligonukleotiden eingeführten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Komplementäre Sequenzen der „Crossover“-PCR-Oligonukleotide sind kursiv dargestellt. Die fettgedruckten Sequenzen sind identisch zu der des Biotin-Primers. Die mit Oligonukleotiden eingeführten Mutationen sind fett und unterstrichen dargestellt. Das „*“-Symbol kennzeichnet Oligonukleotide, die am 5'-Ende IRD800-markiert sind. Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies oder MWG Biotech bezogen. IRD-800 markierte Oligonukleotide wurden ausschließlich von MWG Biotech bezogen.

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
Konstruktion und Überprüfung der $\Delta mtrA$-Mutante:	
Delta mtrAB-1	GCG <u>CCC CGG</u> GTG GTG CTG CTC GAC CGA TAC G (XmaI)
Delta mtrAB-2	<i>CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GAG AAT TTT CTG TGA CAT GAG AAT C</i>
Delta mtrA-3	<i>TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GTC CGC GGT GTT GGC TAC AAA AC</i>
Delta mtrA-4	CAA <u>TTC TAG ACA</u> CAG GTC ATC GTT GTT CAC CAA C (XbaI)
Delta mtrAB-out-fw	CCG CCA CTT CGC GAT TGA TGA CTT

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
Delta mtrAB-out-rv	GTT CCG CAT TCG TCG AAC CTG GCA
Konstruktion und Überprüfung der $\Delta mtrB$-Mutante:	
Delta mtrB-1	GCG <u>CCC GGG</u> GCT GAG ATT TCC TTG ACC CCA C (Xmal)
Delta mtrB-2	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GAG CAC GCG AAC CTG CAG TG
Delta mtrAB-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG ATC GCT CCA GAG ACA CCG TGG G
Delta mtrAB-4	CAA <u>TTC TAG ACA</u> AAA TAC GAG TCG ACG CAG CCG G (Xbal)
Delta mtrAB-out-fw	CCG CCA CTT CGC GAT TGA TGA CTT
Delta mtrAB-out-rv	GTT CCG CAT TCG TCG AAC CTG GCA
Konstruktion und Überprüfung der $\Delta mtrAB\Delta mepA$-Mutante:	
Delta mepA-1	GCG <u>CCC GGG</u> CCT TAA AGC CTC AGG CAA GTC C (Xmal)
Delta mepA-2	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GCG TGC GAT GTT TAG CAT GAG AAT C
Delta mepA-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG CCA CAG GCA TGG CTC GCA AAC
Delta mepA-4	CAA <u>TTC TAG ACT</u> GGA ATC TTG ACC ACT GCC AC (Xbal)
Delta mepA-out-fw	CAT TTT GCG CTA TAC GTT CGT CGG
Delta mepA-out-rv	GGT TTT GGA AAG TTC CAG ACC CG
Konstruktion und Überprüfung der $\Delta mtrAB\Delta ppmA$-Mutante:	
Delta ppmA-1	GCG <u>CCC GGG</u> CTT GCT GCC ATA GAG GAC TAA TAG (Xmal)
Delta ppmA-2	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA CTC TTC TAT GGT GCT CAT GGT GG
Delta ppmA-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GCT CAG CCA ATC GTC AAC GCC
Delta ppmA-4	CAA <u>TTC TAG ACT</u> GCG CGG AAA CTA TCG CGC TTG (Xbal)
Delta ppmA-out-fw	GGT CTA GTG CTG GAT AGG CTC C
Delta ppmA-out-rv	TGC GAC TAA TTC CGG ATC AAA CTG
Konstruktion und Überprüfung der $\Delta mtrAB\Delta lpqB$-Mutante:	
Delta lpqB-1	GCG <u>CCC CGG</u> GTG GTG CTG CTC GAC CGA TAC G (Xmal)
Delta lpqB-2	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA CGT CGA AAT TTT ACT CAC TGC TGC
Delta lpqB-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG TTG CTG GGC ACG CGT GCG GC
Delta lpqB-4	CAA <u>TTC TAG ACC</u> TGT TGC GCA GTT TGA CCG ACG (Xbal)
Delta mtrAB lpqB-1	GCG <u>CCC CGG</u> GTG GTG CTG CTC GAC CGA TAC G (Xmal)
Delta mtrAB lpqB-2	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GAG AAT TTT CTG TGA CAT GAG AAT C
Delta mtrAB lpqB-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG TTG CTG GGC ACG CGT GCG GC

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
Delta mtrAB lpqB-4	CAA <u>TTC TAG ACC</u> TGT TGC GCA GTT TGA CCG ACG (XbaI)
Delta lpqB-out-fw	CCG CCA CTT CGC GAT TGA TGA CTT
Delta lpqB-out-rv	GGT TGT CGG ACT AAC TCC ACT CG
Kolonie-PCR und Sequenzierung verschiedener pEKEx2-Derivate	
pEKEx2-fw	CGG CGT TTC ACT TCT GAG TTC GGC
pEKEx2-rv	GAT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC
ChIP-to-chip-Experimente	
Primer A	GTT TCC CAG TCA CGA TCN NNN NNN NN
Primer B	GTT TCC CAG TCA CGA TC
Affinitätsreinigungen	
betP_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC T TGG CAG AAT GGG CAC AAG ATG G
betP_Promotor_rv	CTC TGG CTG AGC ATC CTC CAC
proP_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC T TGG AGC AAA ATC CGA TTC TTG CC
proP_Promotor_rv	TCA TCG ACT GTT AGT CTT GGT TCG
mepA_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC C AGA GAC ATC CGA AAA CCG TGC
mepA_Promotor_rv	ACG AAA GCA GCA ATT GCT AGT CG
nlpC_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC A TGT CAC ATA GTG AGA TCA TTG CTG
nlpC_Promotor_rv	CTG CTA CAG CCT TGC GAG TTG C
nrdH_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC C TGG TTG TTT TTA TGC ATG CGA AAG
nrdH_Promotor_rv	GTG GCA TTG CAC TGG ACG CAA G
icd_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC G CGT CCA GCG AGT GAA ATG TCC
icd_Promotor_rv	CAC GTT CAG GCG ACT ACT ACT GG
odhA_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC T CTG GAA CTG CTG GAA CAT CTC G
odhA_Promotor_rv	GCA ACC TGT CAT CCG GAC AGC G
sucCD_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC C GCC TCT GGT GTT GAT GCC AC
sucCD_Promotor_rv	GTC GCA GCA ATG TGA TAA CAG AGG
sdhCAB_Promotor_fw	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC G CCA TGG TCA GCT TCA TTG CCC
sdhCAB_Promotor_rv	AAC TAT AGC GTG ATC ACC ATC ACC
biotin primer	GAG GAG TCG TCG ATG TGG AGA CC

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
Konstruktion von pET28b-<i>mtrA</i>+<i>NHis6</i>	
<i>mtrA</i> -NdeI	TAT ACA TAT GTC ACA GAA AAT TCT CGT GGT TG (NdeI)
<i>mtrA</i> -stop- <i>rv</i>	TAT ACT CGA GTT AAT CGT TGT GGC CAG TTT TGT AGC C (XhoI)
Konstruktion von pMalc-<i>mtrBK</i>	
<i>mtrB</i> -pMal_BamHI- <i>fw</i>	TAT AGG ATC CTT GGA GGA ATA CGG CAA TCT GCA ACG (BamHI)
<i>mtrB</i> -pMal_BamHI- <i>rv</i>	TAT AGG ATC CTC ACT GCT GCT CCC CTT CCC ACG G (BamHI)
“Primer extension“- Analyse	
PE_nlpC_1	*GTT TGC TGA CCG AGT TAG CTG TCG GGT TCG GAG CGG
PE_nlpC_2	*CTC ACC CCA GGA ACA CGT TTG GTT CCC CGG CTC GC
nlpC_Prom_ <i>fw</i> 2	ATG TCA CAT AGT GAG ATC ATT GCT G
Prom_nlpC_ <i>rv</i> 2	TGG GGA GGC GAT AGC TGC GG
5'-RACE-Experimente	
nlpC_RACE_1	CTG CAT CAA CGA TTG CCT GAC CG
nlpC_RACE_2	GTG CTT GCT GCA GGT GCA GCC
nlpC_RACE_3	CTG CAG GTG CAT CAA TGA CGG C
Gelretardationsexperimente	
nlpC_1_ <i>fw</i>	ATG TCA CAT AGT GAG ATC ATT GCT G
nlpC_1_ <i>rv</i>	CTG CTA CAG CCT TGC GAG TTG C
nlpC_2_ <i>rv</i>	TTA TCG CGG ATT AAT TTG ACC GAG
nlpC_3_ <i>fw</i>	CGG TTC GAT AAC GAC CAA TTT TTT C
nlpC_3_ <i>rv</i>	CAG GAA CAC GTT TGG TTC CCC G
nlpC_4_ <i>fw</i>	CGG GGA ACC AAA CGT GTT CCT G
nlpC_5_ <i>fw</i>	GTC ATC TAG CCT TCT CAG GGT TC
nlpC_5_ <i>rv</i>	GCT GGC GGA AAT TCG GTG TCC
nlpC_6_ <i>fw</i>	GGA CAC CGA ATT TCC GCC AGC
nlpC_6_ <i>rv</i>	TAG CTG TCG GGT TCG GAG CGG
nlpC_7_ <i>rv</i>	GAA AAA ATT GGT CGT TAT CGA ACC G
nlpC_8_ <i>fw</i>	TTG GGC TAG ACA AGT GTT GTT GC
mepA_1_ <i>fw</i>	CAG AGA CAT CCG AAA ACC GTG C
mepA_1_ <i>rv</i>	ACG AAA GCA GCA ATT GCT AGT CG
mepA_2_ <i>fw</i>	CGA GCT CAT AGC CCG GGA TCG
mepA_2_ <i>rv</i>	CAC GCC GTG CTA GGG GTG TC
mepA_3_ <i>fw</i>	GAC ACC CCT AGC ACG GCG TG

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
mepA_4_fw	GTT CGG CAT GCA CAT CCG CTA C
mepA_4_rv	GCC ATT TAT TAA CCA GTC CGT TAT C
proP_1_fw	TTG GAG CAA AAT CCG ATT CTT GCC
proP_1_rv	TCA TCG ACT GTT AGT CTT GGT TCG
proP_2_rv	GAG CTG GAA GAA TGC AAA AAG ACC
proP_3_fw	GGT CTT TTT GCA TTC TTC CAG CTC
proP_4_rv	GGG AAA GTT ACT GTT TTC GGT GCC
proP_5_fw	GGC ACC GAA AAC AGT AAC TTT CCC
proP_6_rv	CAT TTC CAG ATC TGT CTG AAA AAT C
proP_7_fw	GAT TTT TCA GAC AGA TCT GGA AAT G
betP_1_fw	T TGG CAG AAT GGG CAC AAG ATG G
betP_1_rv	CTC TGG CTG AGC ATC CTC CAC
betP_2_fw	GTT GAA AGC GGT GTG CGC AGA C
betP_2_rv	GGT CTT TTA CAT AGC TGT TAC TTA AG
betP_3_fw	CTT AAG TAA CAG CTA TGT AAA AGA CC
betP_4_fw	CGA TGC GGT TAT TTC TGC CAG GG
betP_4_rv	CTG GAA AGC AAA CCG AAA AAT GGG
betP_5_fw	CGT CGA TTC GCT TAT CGA CGC C
betP_5_rv	CCC TGG CAG AAA TAA CCG CAT CG
nlpC1_M_fw	GTC ATC TAG CCT TCT CAG GGT TC
nlpC1_M_rv	AAA AAT TGG TCG TTA TCG AAC CGT TAT CGC GGA TTA ATT TGA CCG AGA CGC
nlpC1_M1_rv	AAA AAT TGG TCG TTA TCG AAC CGT <u>TCG ATC</u> GGA TTA ATT TGA CCG AGA CGC G
nlpC1_M2_rv	AAA AAT TGG TCG TTA TCG AAC <u>CTG GAT</u> CGC GGA TTA ATT TGA CCG AGA C
nlpC1_M3_rv	AAA AAT TGG TCG TTA TCG <u>ACA</u> AGT TAT CGC GGA TTA ATT TGA CCG AG
nlpC1_M4_rv	AAA AAT TGG TCG TTA <u>TAT CAC</u> CGT TAT CGC GGA TTA ATT TGA C
nlpC1_M5_rv	AAA AAT TGG TCG <u>GGC GCG</u> AAC CGT TAT CGC GGA TTA ATT TG
nlpC1_M6_rv	AAA AAT <u>TGT GAT</u> TTA TCG AAC CGT TAT CGC GGA TTA A
nlpC1_M7_rv	AAA <u>AAG GTG</u> TCG TTA TCG AAC CGT TAT CGC G
nlpC2_M_rv	CAG GAA CAC GTT TGG TTC CCC G
nlpC2_M_fw	AGT GTT GTT GCG GTT TCG TAA CCT TAT TGA GAC ATT GCG GGA CGG ACA CC
nlpC2_M1_fw	AGT <u>GTG TGT</u> GCG GTT TCG TAA CCT TAT TGA GAC
nlpC2_M2_fw	AGT GTT <u>GT TAT</u> GTT TCG TAA CCT TAT TGA GAC ATT G
nlpC2_M3_fw	AGT GTT GTT GCG <u>TGG GCG</u> TAA CCT TAT TGA GAC ATT GCG G
nlpC2_M4_fw	AGT GTT GTT GCG GTT <u>TAT GAA</u> CCT TAT TGA GAC ATT GCG GGA C
nlpC2_M5_fw	AGT GTT GTT GCG GTT TCG <u>TCC</u> ACT TAT TGA GAC ATT GCG GGA CGG

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
nlpC2_M6_fw	AGT GTT GTT GCG GTT TCG TAA CAG G AT TGA GAC ATT GCG GGA CGG AC
nlpC1_M7_fw	AGT GTT GTT GCG GTT TCG TAA CCT TCG GTA GAC ATT GCG GGA CGG ACA CC
nlpC1_M8_fw	AGT GTT GTT GCG GTT TCG TAA CCT TAT TGC TCC ATT GCG GGA CGG ACA CCG AAT
mepA_M_rv	CTA GTC GAC GCT TCA TGT TGC GG
mepA_M_fw	GTG GTC ACA ACT TGA TAA CGG AC
mepA_M1_fw	CCC CTA CTT TGG TCA CAA CTT GAT AAC GGA CTG
mepA_M2_fw	GGT TTC ACA ACT TGA TAA CGG ACT GGT TAA TAA ATG G
mepA_M3_fw	GTG GGA CCA ACT TGA TAA CGG ACT GGT TAA TAA ATG G
mepA_M4_fw	GTG GTC AAC CCT TGA TAA CGG ACT GGT TAA TAA ATG G
mepA_M5_fw	GTG GTC ACA AAG TGA TAA CGG ACT GGT TAA TAA ATG GCC AAT C
mepA_M6_fw	GTG GTC ACA ACT GTA TAA CGG ACT GGT TAA TAA ATG GCC AAT C
mepA_M7_fw	GTG GTC ACA ACT TGC GAA CGG ACT GGT TAA TAA ATG GCC AAT C
mepA_M8_fw	GTG GTC ACA ACT TGA TCC CGG ACT GGT TAA TAA ATG GCC AAT C
mepA_M9_fw	GTG GTC ACA ACT TGA TAA ATG ACT GGT TAA TAA ATG GCC AAT C
mepA_M10_fw	GTG GTC ACA ACT TGA TAA CGT CCT GGT TAA TAA ATG GCC AAT C
mepA_M11_fw	GTG GTC ACA ACT TGA TAA CGG AAG GGT TAA TAA ATG GCC AAT CT
proP_M_rv	TGT TAA CTT CTT CCT GTA AGA CTC C
proP_M_fw	ATC TGG AAA TGT GAC CAA TTT GTA AC
proP_M1_fw	GAT TTT TCA GAC AGA TCT TTC CAT GTG ACC AAT TTG TAA CCC ACC C
proP_M2_fw	ATC TGG AAC GTG GAC CAA TTT GTA ACC CAC CCC C
proP_M3_fw	ATC TGG AAA TGT TCA AAA TTT GTA ACC CAC CCC CGC TC
proP_M4_fw	GAT TTT TCA GAC AGA TCT GGA AAT GTG AAA CCT TTG TAA CCC ACC CCC GCT CAC
proP_M5_fw	ATC TGG AAA TGT GAC CAA GGG GTA ACC CAC CCC CGC TCA CC
proP_M6_fw	ATC TGG AAA TGT GAC CAA TTT TGC CCC CAC CCC CGC TCA CCT GC
proP_M7_fw	ATC TGG AAA TGT GAC CAA TTT GTA AAA ACC CCC CGC TCA CCT GCA TGA G
proP_M8_fw	ATC TGG AAA TGT GAC CAA TTT GTA ACC CAA AAC CGC TCA CCT GCA TGA GTG TG
betP_M_fw	GTT GAA AGC GGT GTG CGC AGA C
betP_M_rv	CGG GAG CAT CAC AAT GAC ATA AC
betP_M1_rv	CGG GAG CAT CAC AAT GAC ATA ACG ATG CGG TTT CCC TGG CAG AAA TAA CC
betP_M2_rv	CGG GAG CAT CAC AAT GAC ATA AAT CGT AAT TTT CCC TGG CAG AAA TAA CC
betP_M3_rv	CGG GAG CAT CAC AAT GAC CGC CCG ATT AAT TTT CCC TGG CAG AAA TAA CC
betP_M4_rv	CGG GAG CAT CAC ACG TCC ATA ACG ATT AAT TTT CCC TGG CAG AAA TAA CC
betP_M5_rv	CGG GAG CAT ACA CAT GAC ATA ACG ATT AAT TTT CCC TGG CAG AAA TAA CC
betP_M6_rv	CGG GAG ACG CAC AAT GAC ATA ACG ATT AAT TTT CCC
betP_M7_rv	CGG TCT CAT CAC AAT GAC ATA ACG ATT AAT TTT CCC

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
nadE-nrdH_fw	CCA CGT TTC AAG GCT CGC CAG
nadE-nrdH_rv	GTC ATT TAC GCA GTT CGC CAC C
NCgl0381_fw	TCT GAG GCG AAT TTA CCC TCC G
NCgl0381_rv	GCG GAT CCC GTG AGA GCA ACG
csbD_fw	ACC GAA TTT TTC GAA CTT CAC AGG
csbD_rv	TTC TTT AGC CTT ACC TGT GAG GTC
katA_fw	GCC AGC TCG GTG ACG TGG GC
katA_rv	TGG ACG CAT TCC GCG ATC TAC G
NCgl1291/1290_fw	TCA TCG AAG GGC TCC CAA TCT G
NCgl1291/1290_rv	TTC CTC ATG TCA CAT TCC AAT CGG
NCgl1368_fw	GGA CGA AGT TAC TTT AAG AGA AGT C
NCgl1368_rv	CAG TGA GCG GTA CGA GGA TCA G
dps_fw	CCC AGC TAG TCG ATG AAT CAC G
dps_rv	CTT TGC GTC ATT CTC GTT GAT TCC
lcoP_fw	CAT CCG TGA ATA CTA GGG AGT CC
lcoP_rv	GGG TGA CTC TTG GGA TTC AGG C
mtrA_fw	CGT GGT TGC CCC TGA TGA AGA C
mtrA_rv	CGG GAT CAT CAT CAA CCA CGA G
lpqB_fw	CAT GGA AAT TAT CGT GAA GCA CCG
lpqB_rv	GTC ACA GAC AGC ACC GCG GTG
ppmA_fw	GTG GTG AGA ATT TGA TCA GCA ACC
ppmA_rv	ACT GGT TCT GTG GCG ACA GCT C
mscL_fw	CGG AGA CAG AGC AGA TAA TTA CAC
mscL_rv	AGT TCA ATG ACA TTT CCG CGA AGG
dnaA_1_fw	CCC TTT GCC ATG TGA AAC ACT CC
dnaA_1_rv	TGT TTT CGC AGG TCG TTT TCC CG
dnaA_2_fw	ACG GGA AAA CGA CCT GCG AAA AC
dnaA_2_rv	CCT CAA ATT CGC TCT CAC CTG C
dnaA_3_fw	GCA GGT GAG AGC GAA TTT GAG G
dnaA_3_rv	CGC CAG GTT TCG AGC AAA GAA G
NCgl2561_fw	CTT GAT CGC GAA GTC TTT TTG GAG
NCgl2561_rv	TTT TTG AAA TCA TTT CAG AAA ATG CAC
NCgl0532_fw	GAC ACT TAT CCT CCT GGC CTC C
NCgl0532_rv	GCT TTT CGC ACC TAT GAT GCG TC
rpf2_fw	CGT GAG GTA GCT CAC AGT CAA TC

Name	Sequenz (5' → 3') und Eigenschaften
rpf2_rv	GTT GAT CCG TGA CTT CTG ATG GG
yggB_fw	GAC GAC TTG GAA GGC CGT TAC G
yggB_rv	ATG GGT ACG CCT AAA ATC ATG AGC
NCgl0717_fw	GGG CTC GTC GAG TTT CTG TTT TC
NCgl0717_rv	TGC ATC GTC CCA TGC ACC CAT G
NCgl0825_fw	CGC AGC AAC TTT GAT TGC TGA GC
NCgl0825_rv	GCT TCT GCA ATT TCG CCT GCT TC
NCgl0103/0102_fw	GGT GGA TGA ATG TGG AGC GTG C
NCgl0103/0102_rv	CCA ACA CAG TCC GTT CAG GCT G
Mt_dnaA_1_fw	GGT CCT TTT GCC CTT GGT CAC G
Mt_dnaA_1_rv	GGC GCG TAA GTA CCC TCG AAC
Mt_dnaA_2_fw	GTT CGA GGG TAC TTA CGC GCC
Mt_dnaA_2_rv	GCT TGA TTG TCG AGT GCC GTT TC
Mt_dnaA_3_fw	GAA ACG GCA CTC GAC AAT CAA GC
Mt_dnaA_3_rv	CCT GAA CCG GGG TCA TCG GTC
Mt_Rv0867c_fw	TAC CCC CTT TCG CCG GCG GC
Mt_Rv0867c_rv	TCA TTT TGG GTT AGG TTG ACG AGC
Mt_Rv0951_fw	TAC GGT GAT GAT GCG GCC AAC G
Mt_Rv0951_rv	GAT CCA ACT CAC AAT CAC AGC CG

4 Plasmide

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
pCR2.1-TOPO	Amp ^R , Kan ^R ; Klonierungsvektor für PCR-Produkte mit 3'-Adenosin-Überhängen	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1-TOPO- <i>mtrAB</i>	pCR2.1-TOPO-Derivat, enthält ein 2342-bp-PCR-Fragment mit den <i>mtrAB</i> -Genen aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pCR2.1-TOPO-RACE- <i>nlpC</i>	pCR2.1-TOPO-Derivat, enthält die Produkte der 2. PCR bei der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von <i>nlpC</i> mittels der 5'-RACE-Methode (vgl. unten)	Diese Arbeit
pEKEx2	Kan ^R ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor für die regulierte Genexpression (P_{tac} , lac^R , pBL1 $oriV_{C.g.}$, pUC18 $oriV_{E.c.}$), MCS im Vergleich zum pEKEx1 invertiert	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)

Plasmid	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
pEKEx2- <i>mtrAB</i>	Kan ^R ; pEKEx2-Derivat, enthält ein 2324-bp-BamHI-Fragment aus pCR2.1-TOPO- <i>mtrAB</i> mit den <i>C. glutamicum</i> <i>mtrAB</i> -Genen einschließlich der <i>mtrA</i> -RBS	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R ; mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>mtrA</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 871-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>mtrA</i> flankierenden Bereiche umfasst und mittels der XbaI- und XmaI-Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>mtrB</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 707-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>mtrB</i> -flankierenden Bereiche umfasst und mittels der XbaI- und XmaI-Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>mepA</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 925-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>mepA</i> -flankierenden Bereiche umfasst und mittels der XbaI- und XmaI-Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>ppmA</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 883-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>ppmA</i> -flankierenden Bereiche umfasst und mittels XbaI- und XmaI-Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>lpqB</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 982-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>lpqB</i> -flankierenden Bereiche (in der Δ <i>mtrAB</i> -Mutante) umfasst und mittels XbaI- und XmaI-Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>mtrAB</i> Δ <i>lpqB</i>	Kan ^R ; pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 908-bp-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>mtrAB</i> / <i>lpqB</i> -flankierenden Bereiche umfasst und mittels XbaI- und XmaI-Schnittstellen kloniert wurde	Diese Arbeit
pET28b	Kan ^R ; P _{7T} ; <i>lacI</i> , Vektor zur Überproduktion von Genen in <i>E. coli</i> , der das Anfügen eines abspaltbaren N-terminalen Tags aus sechs Histidin-Resten ermöglicht.	Novagen, Darmstadt
pET28b- <i>mtrA</i> +NHis ₆	Kan ^R ; pET28b-Derivat für die heterologe Überproduktion des Antwortregulators MtrA aus <i>C. glutamicum</i> , der am N-Terminus 20 zusätzliche Aminosäure-Reste enthält (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH).	Diese Arbeit
pET224b	Kan ^R ; P _{7T} ; <i>lacI</i> , Vektor zur Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , der das Anfügen eines C-terminalen Tags aus 6 Histidin-Resten an das Protein ermöglicht; pET24b-Derivat, bei dem das pBR322-Replikon durch das p15A-Replikon aus dem Plasmid pACYC184 ersetzt wurde.	(Schneider <i>et al.</i> , 2000)
pET224b-MtrA+CHis ₁₀	Kan ^R ; pET224b-Derivat zur heterologen Überproduktion des Antwortregulators MtrA aus <i>C. glutamicum</i> mit 12 zusätzlichen Aminosäure-Resten am C-Terminus (HHHHLEHHHHH).	(Brockner, 2003)
pMalc	Amp ^R ; Vektor mit <i>tac</i> -Promotor zur Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , der die Konstruktion eines Fusionsproteins mit dem Maltose-Bindeprotein aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid ermöglicht.	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Plasmid	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
pMalE-CitAC	Amp ^R ; pMalc-Derivat zur Überproduktion eines Fusionsproteins aus der Kinase-Domäne (Aminosäuren 357-547) von CitA aus <i>K. pneumoniae</i> und dem Maltose-Bindeprotein aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid.	(Kaspar <i>et al.</i> , 1999)
pMalE-MtrBK	Amp ^R ; pMalc-Derivat zur Überproduktion eines Fusionsproteins aus der Kinase-Domäne (Aminosäuren 250-503) von MtrB aus <i>C. glutamicum</i> und dem Maltose-Bindeprotein aus <i>E. coli</i> ohne dessen Signalpeptid.	(Brocker, 2003)

5 Bakterienstämme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp-Stamm, Biotin-auxotroph	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
ATCC 13032 Δ <i>mtrAB</i>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion der <i>mtrAB</i> -Gene	(Brocker, 2003)
ATCC 13032 Δ <i>mtrA</i>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion des <i>mtrA</i> -Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ <i>mtrB</i>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion des <i>mtrB</i> -Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ <i>mtrAB</i> Δ <i>ppmA</i>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion der <i>mtrAB</i> -Gene und des <i>ppmA</i> -Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ <i>mtrAB</i> Δ <i>mepA</i>	Derivat von ATCC 13032, „in-frame“-Deletion der <i>mtrAB</i> -Gene und des <i>mepA</i> -Gens	Diese Arbeit
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ <i>thi-1 endA1 hsdR17</i> (r ⁻ , m ⁻) <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 gyrA96 relA1</i> ; Stamm für Klonierungen	Bethesda Research Laboratories
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (λ clts857 <i>ind1</i> Sam7 <i>nin5 lacUV5-T7</i> gene 1); Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen λ DE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des <i>lacUV5</i> -Promotors trägt.	(Studier and Moffatt, 1986) Novagen Inc., Madison, USA
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

6 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Die Kultivierung von Bakterien zur Stammhaltung erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml BHI-Medium, die 12-15 h mit 170 Upm bei 30 °C (*C. glutamicum*) bzw. bei 37 °C (*E. coli*)

geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in 1 ml BHI-Medium resuspendiert, mit 1 ml sterilem Glycerin gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde bei -20 °C, das andere bei -75 °C gelagert.

7 Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum wurde standardmäßig in 500-ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen kultiviert, die 60 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose (222 mM) enthielten und bei 30 °C und 150 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 LB-Medium mit 2 % (w/v) Glucose und anschließend für 16 h in 60 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, bevor die 60-ml-Hauptkultur zu einer OD_{600} von 1 inokuliert wurde. Bei Kultivierungen zur Gesamt-RNA-Isolierung wurde wie oben beschrieben verfahren, die Hauptkultur enthielt jedoch nur 2 % (w/v) Glucose. Die Zellen für die RNA-Isolierung wurden bei einer OD_{600} von ca. 6 geerntet.

Für die Affinitätsreinigungen wurden die Zellen unter drei verschiedenen Bedingungen kultiviert. In Bedingung A wurden 600 ml CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose in einem 2-l Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen auf eine OD_{600} von 1 angeimpft und die Zellen bei einer OD_{600} von ca. 6-8 geerntet. In Bedingung B wurden die Zellen in einem 7,5-l Fermenter mit 5 l modifiziertem CGXII-Medium kultiviert. Das Medium enthielt kein MOPS, aber 1 ml Antifoam-204 (Sigma, Taufkirchen). Der Fermenter wurde mit 0,3 l Luft/min begast und eine Sauerstoffsättigung von 70 % wurde durch Variation der Rührergeschwindigkeit erreicht. Durch Zugabe von 2 N NaOH bzw. 2 N HCl wurde der pH konstant auf 7 geregelt. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von ca. 6 geerntet. In Bedingung C wurden die Zellen aerob in einem 30-l Fermenter mit 20 l modifiziertem CGXII-Medium und anfangs 4 % (w/v) Glucose kultiviert. Der pH wurde durch Zugabe von 25 %iger Ammoniumlösung bzw. 20 %iger Phosphorsäure auf 7,5 geregelt. Nach 7,5 Stunden Kultivierung wurde eine Glucosefütterung von 70 g/h gestartet, die nach 23 Stunden auf 105 g/h erhöht wurde. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 121 geerntet. Die Zellen hatten eine mittlere Wachstumsrate von $0,1 \text{ h}^{-1}$.

8 Expressionskulturen

100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin wurde mit 1 ml einer ÜN-Kultur des *E. coli*-Stammes (BL21(DE3) bzw. DH5α) mit dem gewünschten Expressionsplasmid angeimpft. Die Kulturen wurden zunächst bei 37 °C und 140 Upm

inkubiert, bis sie eine OD_{600} von ca. 1,0 erreicht hatten. Die Expression des Zielgens wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Danach wurden die Zellen bei 30 °C und 130 Upm 3 bis 4 Stunden weiter inkubiert. Anschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (10 min, 5300 g, 4 °C). Die sedimentierten Zellen wurden einmal in 50 ml Aufschlusspuffer (TNI5 für pET-Derivate, TKMD für pMalc-Derivate) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor Induktion sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden danach wurde die OD_{600} bestimmt sowie 150- μ l-Proben entnommen und abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in ($OD_{600} \times 30$) μ l 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

9 Molekularbiologische Methoden

9.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim and Doly, 1979). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* erfolgte ebenfalls mit dem QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden). Aufgrund des im Vergleich zu *E. coli* dickeren Mureinsacculus wurden die *C. glutamicum*-Zellen zunächst 1-2 h mit 15 mg/ml Lysozym im Puffer P1 (Qiagen, Hilden) unter Schütteln bei 37 °C inkubiert (Schwarzer and Pühler, 1991).

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurden Zellen einer 5-ml-LB-Übernachtskultur mit 2 % (w/v) Glucose vollständig sedimentiert, in 400 μ l Lysispuffer (2,42 g/l Tris, 0,74 g/l Na_2EDTA , 1,2 % Triton X-100, pH 8,0) mit 20 mg/ml Lysozym (frisch zugesetzt) resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 80 μ l 10 % (w/v) SDS und 25 μ l Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer) zugegeben, kurz gevortext und 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; pH 7,5 - 8,0) und vortexen wurden die Phasen durch 3 min Zentrifugation bei 16100 g getrennt, die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml eiskaltem abs. Ethanol versetzt, gevortext und 10 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, das Ethanol vollständig abgenommen, die DNA luftgetrocknet und in 250 μ l EB-Puffer (Qiagen, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst. Die Ausbeute bei dieser Methode beträgt ca. 0,5 mg DNA. Für die Isolierung von chromosomaler DNA im großen Maßstab wurden Zellen aus einer 200-ml-Übernachtskultur eingesetzt. Alles wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Volumina der verwendeten Lösungen wurden der Zellmenge angepaßt (40-fach).

9.2 DNA- bzw. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook, 1989):

doppelsträngige DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 ng/ μ l.

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

Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen liegt der Wert unter 1,8.

9.3 Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Für die Gele wurde 1-2 %-ige (w/v) Agarose (GibcoBRL Ultra Pure Agarose) in 1xTAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung zwischen 120 und 160 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch mindestens 10-minütige Inkubation des Gels in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 μ g/ml) mit anschließendem Waschen in bidest. H₂O. 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 je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente der DNA-Längenstandard XIV¹ von Roche Diagnostics oder ein Gemisch aus HindIII- und HindIII/EcoRI-verdauter λ -DNA² verwendet.

9.4 Rekombinante DNA-Techniken

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder Roche Diagnostics bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte standardmäßig in 20 μ l-Ansätzen unter Verwendung eines geeigneten „SuRE/Cut Buffers for Restriction Enzymes“ (Boehringer Mannheim) und 5 U Enzym. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden mindestens 2 h, chromosomale DNA über Nacht bei 37 °C inkubiert.

¹ Der DNA-Längenstandard XIV enthält Fragmente folgender Größen: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp, 1300 bp, 1400 bp, 1500 bp und 2642 bp

² Der λ -DNA Längenstandard ist ein 1:1 Gemisch der Molecular Weight Marker II und III (beide Roche Diagnostics) mit folgenden Fragmentgrößen: 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1375 bp, 1584 bp, 1904 bp, 2027 bp, 2322 bp, 3530 bp, 4268 bp, 4361 bp, 4973 bp, 5148 bp, 6557 bp, 9416 bp, 21226 bp und 23130 bp

Für Ligationen wurde in der Regel der „Rapid DNA Ligation-Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Ansätze wurden dabei 30 min bei RT inkubiert. Alternativ wurde der „TOPO TA Cloning-Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der im „TOPO TA Cloning-Kit“ enthaltene linearisierte Vektor pCR2.1 TOPO besitzt singuläre 3'-Thymidinüberhänge, deren 3'-Phosphatgruppe kovalent über einen Tyrosylrest mit dem Enzym Topoisomerase I verknüpft ist. PCR-Produkte mit singulären 3'-Adenosinüberhängen, die durch die Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase erzeugt werden, können effektiv mit dem Vektor ligieren. Durch Angriff der 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produktes auf die Phosphotyrosyl-Bindung kommt es unter Freisetzung der Topoisomerase I zur Verknüpfung des PCR-Produktes mit dem Vektor (Shuman, 1994). Zur Erzeugung singulärer 3'-Adenosinüberhänge an den PCR-Produkten wurden die gereinigten PCR-Fragmente in 20- μ l-Ansätzen mit *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs und geeignetem Puffer 20 min bei 72 °C inkubiert. Dieser Schritt war nötig, da das zur Erzeugung der PCR-Fragmente verwendete Gemisch aus *Taq*- und *Tgo*-DNA-Polymerase nur wenige 3'-Adenosinüberhänge erzeugt. Zur Ligation wurden 4 μ l des modifizierten PCR-Produktes mit jeweils 1 μ l Salzlösung (1,2 M NaCl und 0,06 M MgCl₂) und pCR2.1 TOPO-Vektor gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Für die Transformation der „One Shot[®] Chemically Competent TOP10“ *E. coli*-Zellen wurden 2 μ l des Ligationsansatzes verwendet.

9.5 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine RbCl₂-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 1 ml SOC-Medium resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50-ml-Falcontubes überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 16000 g und 4 °C geerntet, in 1/3 Kulturvolumen eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1/12,5 Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in 50- bzw. 100- μ l Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

RF1-Lösung

RbCl ₂	100	mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	50	mM
K-Acetat	30	mM

CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	mM
Glycerin	15	%

mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8

RF2-Lösung

Morpholinopropansulfonsäure	10	mM
RbCl ₂	10	mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75	mM
Glycerin	15	%

mit 6 M NaOH auf pH 6,8

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 µl der Zellen mit bis zu 10 µl Ligationsansatz für 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 440 µl SOC-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz für weitere 45 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Plasmids wurden 20 µl und 100 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Ggf. wurde den Nährböden 40 µl X-Gal (20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid) pro Platte zugesetzt.

9.6 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest (van der Rest *et al.*, 1999). Aus einer Übernachtskultivierung in LB-Medium mit 2 % (w/v) Glucose wurde die Hauptkultur in 200 ml EPO-Medium (2 g Trypton, 2 g NaCl, 1 g Hefeextrakt, in 160 ml H₂O lösen und autoklavieren, 800 mg Isonicotinsäure-Hydrazid, 5 g Glycin und 0,2 ml Tween 80 in 40 ml H₂O lösen, sterilfiltrieren und zum Medium hinzugeben) auf OD₆₀₀ = 0,3 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 18 °C für 28 h. Die Kulturen wurden 30 min auf Eis inkubiert, die Zellen anschließend dreimal mit eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen und dann in 2 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert. 200 µl Aliquots wurden bei -75 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen mit etwa 1 µg Plasmid in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette gemischt. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 600 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 800 µl BHIS-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46 °C) und abschließend 1 h bei 30 °C inkubiert. 20 µl und 100 µl des Ansatzes sowie der Rest wurden auf BHIS-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert.

9.7 Konstruktion von Deletionsmutanten

C. glutamicum-Deletionsmutanten wurden nach Niebisch und Bott (Niebisch and Bott, 2001) in Anlehnung an die von (Link *et al.*, 1997) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) konstruiert. Hierbei wurden in einer ersten PCR zwei etwa 500 bp große Fragmente, die den 5'- und den 3'-flankierenden Bereich des/der zu deletierenden Gens/Gene enthalten, mit den Primern $\Delta...1$ -fw und $\Delta...2$ -rv bzw. $\Delta...3$ -fw und $\Delta...4$ -rv amplifiziert. Die Primer $\Delta...1$ -fw und $\Delta...4$ -rv wurden für die Klonierung in das Plasmid pK19*mobsacB* mit 5'-terminalen Restriktionsschnittstellen ergänzt. Die Primer $\Delta...2$ -rv und $\Delta...3$ -fw besitzen am 5'-Ende eine 21 bp lange komplementäre Sequenz. In einer anschließenden Crossover-PCR mit den Primern $\Delta...1$ -fw und $\Delta...4$ -rv sowie den beiden ~500 bp großen Fragmenten der ersten PCR als Matrize konnten die komplementären Sequenzen hybridisieren und verlängert werden. Die so erhaltenen Fusionsprodukte (~1 kb) wurden mit XmaI und XbaI verdaut, aufgereinigt und in den entsprechend geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Nach Sequenzierung des klonierten Crossover-PCR-Produkts (vgl. Kapitel 9.10) wurden fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert und auf BHIS-Nährböden mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* wird in *C. glutamicum* nicht repliziert. Daher sollte bei kanamycinresistenten Klonen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert worden sein. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden kanamycinresistente Klone zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % Glucose und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und danach mindestens 6 h in 5 ml CGXII-Medium ohne N- und P-Quelle inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl einer 1:10- und 1:100-Verdünnung der Kulturen auf BHIS-Nährböden mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, 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 lethal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.*, 1992). Daher sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein. Bei diesem zweiten Rekombinationsereignis kann entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt werden. Klone, die sowohl saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern $\Delta...out$ _fw und $\Delta...out$ _rv analysiert. Klone der $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Mutanten, die aufgrund der Kolonie-PCR-Analyse die gewünschte Deletion enthielten, wurden außerdem durch Southern-Blot-Analyse mit dem Biotin-markierten Crossover-PCR-Produkt als Sonde überprüft.

9.8 Polymerasekettenreaktion

Die PCR (Mullis and Faloona, 1987) wurde sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanden und Deletionsmutanten) als auch präparative Zwecke (*in-vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) genutzt. Falls im Text nicht anders vermerkt wurde für präparative PCR-Ansätze der Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics) verwendet, der neben *Taq*-DNA-Polymerase auch *Tgo*-DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität beinhaltet. Durch Kombination der beiden Polymerasen und die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der *Tgo*-DNA-Polymerase wird die Fehlerrate der DNA-Synthese um den Faktor 3 reduziert. Für analytische PCR-Ansätze wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Reaktionen wurden in einem Primus Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden bei Verwendung des Expand High Fidelity Kit entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt gewählt: Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielten 0,1 - 0,75 µg Matrizen-DNA, je 300 nM der beiden Primer, 2,6 U *Taq/Tgo*-DNA-Polymerase sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C wurden 30 Zyklen mit folgenden Parametern durchlaufen: 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s „Annealing“ bei $T_m - 5^\circ\text{C}$ 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 $T_m [^\circ\text{C}] = [(G + C) \cdot 4] + [(A + T) \cdot 2]$ abgeschätzt werden. Als Elongationszeit wurde 1 min pro 1,5 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Zur Kontrolle von *C. glutamicum*-Transformanden wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher zunächst auf eine neue Agarplatte ausgestrichen und der am Zahnstocher verbliebene Rest der Zellen als Matrize direkt in die PCR-Ansätze gegeben. Zur Analyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Reinigung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel mit dem QIAEX II Gel Extraction-Kit (Qiagen) eluiert und gereinigt oder alternativ mit dem QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) gereinigt, wenn die Gelelektrophorese keine Nebenprodukte erkennen ließ.

9.9 Southern-Blot-Analyse

Bei der Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975) der $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Mutanten wurde genomische DNA (~10 µg pro Spur), die mit *HincII* bzw. *NcoI* ($\Delta mtrA$) und *MfeI* bzw. *NarI* ($\Delta mtrB$) über Nacht verdaut worden war, über ein 1,2 %-iges Agarosegel aufgetrennt und wie im Folgenden beschrieben mittels Vakuumblot auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Nylonmembran, Maske und Agarosegel

wurden luftblasenfrei auf der Blotting-Apparatur (Amersham Biosciences LKB VacuGene XL) positioniert. Das Gel wurde mit Depurinierungslösung (0,2 N HCl) vollständig beschichtet, und nach Anlegen des Vakuums (etwa 50 mbar; Pumpe: Bromma LKB 2016 Vacugene Vacuum Blotting Pump) wurde der Aufbau auf Dichtigkeit überprüft. Nach etwa 20 min (Farbumschlag nach Gelb) wurde das Gel für weitere 20 min mit Denaturierungslösung (0,5 N NaCl, 0,5 N NaOH) inkubiert (Farbumschlag nach Blau). Im Anschluss erfolgte nochmals eine 20-minütige Inkubation mit Neutralisationslösung (1,5 N NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 7,5) und daraufhin 1 h Inkubation mit Transferpuffer (20xSSC). Abschließend wurden die auf die Nylonmembran transferierten DNA-Fragmente durch 3 min Bestrahlung mit UV-Licht kovalent an der Membran fixiert. Die Markierung des Standards (λ -DNA-Längenstandard) und des als Sonde eingesetzten „Crossover“-PCR-Fragments mit Biotin erfolgte mit dem BiotinULS Labeling Kit (Fermentas GmbH) nach Angaben des Herstellers. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 – 4 Stunden bei 68 °C in 2 ml Prähybridisierungslösung pro 10 cm² Nylonmembran und die Hybridisierung mit 50 ng Sonde/ml Prähybridisierungslösung über Nacht bei 68 °C. Anschließend wurde die Membran 2 x 5 min mit 100 ml 2xSSC mit 0,1 % (w/v) SDS bei RT und 2 x 15 min mit 100 ml 0,5xSSC mit 0,1 % (w/v) SDS bei 68 °C gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem CPD-Star, ready-to-use-Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers mit der Ausnahme, dass Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat an Stelle von anti-digoxigenin-AP verwendet wurde.

9.10 DNA-Sequenzierung

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde das „BigDyeTerminator Kit V3.1“ (Applied Biosystems), das „DyeEx-Kit“ (Qiagen) sowie ein ABI PRISM[®] 3100 Avant-Kapillarsequenziergerät (Applied Biosystems) nach Angaben der Hersteller genutzt. Es wurde eine 50 cm lange Kapillare mit dem Polymer POP-6 verwendet. Vergleiche der in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen mit DNA-Sequenzen aus Datenbanken wurden mit Hilfe des Programmes „Blast-Blast 2 Sequences“ (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Clone Manager 7“ für Windows XP (Version 7.03, Scientific & Educational Software).

10 Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays

10.1 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 β -Mercaptoethanol, die zu einer sofortigen Inaktivierung der RNasen führt und somit die Isolierung intakter RNA gewährleistet. Anschließend wird die RNA in Gegenwart von Ethanol und einer speziellen, hochkonzentrierten Salz-Puffer-Lösung (RNeasy, Qiagen) an eine 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} zwischen 5 und 6) wurden in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlte, mit 10 g Eis beladene 50-ml Falcon-Gefäße gefüllt und abzentrifugiert (3 min, 5500 g , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die sedimentierten Zellen wurden sofort in 350 μl eiskaltem RLT-Puffer (RNeasy, Qiagen) mit 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol resuspendiert und in Gegenwart von 250 mg Zirkonium/Silica-Perlen (\varnothing 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, 16100 g) wurde der Überstand mit 250 μl Ethanol abs. (eiskalt) vermischt, auf die RNeasy-Säulchen aufgetragen und 15 s bei 11200 g zentrifugiert. Die Membran wurde mit 350 μl RW1-Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) gewaschen (15 s, 11200 g) und anschließend wurde ein Mix aus 10 μl DNase I (RNase-free DNase-Set, Qiagen) und 70 μl RDD-Puffer (RNase-free DNase-Set, Qiagen) auf die Säulchenmembran gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 350 μl RW1-Puffer wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß überführt und mit 500 μl RPE Puffer (RNeasy-Kit, Qiagen) gewaschen. Die Säulchen wurden 15 s bei 11200 g zentrifugiert und erneut mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen (2 min, 16100 g). Nach einer weiteren Zentrifugation (30 s, 16100 g) zur Entfernung von Ethanol-Resten wurde die RNA zwei Mal mit 40 μl Nuklease-freiem H_2O eluiert (1 min, 11200 g). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 9.2). Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen (20-25 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 (20-25 μg Gesamt-RNA in 14 μl H_2O gelöst) wurde mit 1 μl einer 500 ng/ μl Zufallshexanukleotid-Primer-Lösung (in bidest. H_2O 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_2 , 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 (7 min, 13000 g) auf etwa 20 μl eingeeengt. Danach wurden die für eine Hybridisierung vorgesehenen Cy3- bzw. Cy5-markierten Sonden vereinigt und es erfolgten, wie oben beschrieben, zwei weitere Ultrafiltrationszentrifugationen (8 min, 13000 g). Die so erhaltene cDNA-Sonde (14 μl) wurde sofort für die DNA-Chip-Hybridisierungen eingesetzt.

10.3 DNA-Chip-Hybridisierung

Auf den in diesen Experimenten verwendeten DNA-Chips waren 3530 PCR-Produkte (ca. 300-500 bp) gespottet, die offene Leseraster (ORFs) im *C. glutamicum*-Genom repräsentieren. Als Matrize für die Amplifizierung dieser ORF-Fragmente mittels PCR diente *C. glutamicum* 13032. Zusätzlich zu diesen ORF-Sonden wurden Hybridisierungskontrollen (Lambda-DNA, PCR-Produkt eines Gens aus *E. coli*, welches kein Homolog in *C. glutamicum* besitzt und genomische DNA aus *E. coli*) sowie 196-mal genomische DNA von *C. glutamicum* an verschiedenen Stellen auf dem Chip angeordnet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Chips wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Volker Wendisch zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Zu den vereinigten und aufgereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden (14 μl) wurden 20 μg PolyA, 3 μl 20xSSC, 0,48 μl 1 M HEPES (pH 7,0) und 0,45 μl 10 % (v/v) SDS hinzugefügt, und mit H_2O auf 20 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 2 min bei 100 °C denaturiert und anschließend 5 - 10 min bei RT inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). PolyA diente als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz und die Endkonzentration von 3xSSC sicherte stringente

Hybridisierungsbedingungen (Zimmer *et al.*, 2000). Vor der Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA (2 cm x 2 cm) ein Spezialdeckglas (LifterSlip, Erie Scientific) gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung über der DNA-Chip-Fläche sicherzustellen. Damit die Probenlösung während der Hybridisierung bei 65 °C nicht austrocknet, wurden zur Gewährleistung einer ausreichend hohen Feuchtigkeit in der Kammer mehrfach kleine Tropfen 3xSSC-Lösung am Rand des DNA-Chips aufgetragen, dann die vorbereitete Probenlösung unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer wasserdichten Hybridisierungskammer (Die Tech Inc.) über Nacht bei 65 °C im Wasserbad inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Um die Probenlösung und unspezifisch gebundene fluoreszenzmarkierte cDNA nach der Hybridisierung zu entfernen, erfolgte ein stringentes Waschen des DNA-Chips für je 5 min in 1xSSC/0,03 % (w/v) SDS und danach in 0,05xSSC bei Raumtemperatur (Zimmer *et al.*, 2000). Durch Zentrifugation (5 min, 50 g (500 Upm), RT, Zentrifuge 4K15, Rotor 11150, Einsätze 13220 von Sigma) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

10.4 Bestimmung der Fluoreszenz von DNA-Chips

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 Inc.) 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 3.0 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, λ-DNA und PCR-Produkte von Genen aus *E. coli*).

10.5 Auswertung der DNA-Microarray-Experimente

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 drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um die durch die Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen *et al.*, 1998). Die Normalisierung erfolgte für jeden DNA-Chip 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.

11 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts

11.1 „Primer-Extension“-Experimente

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts von dem Gene *nlpC* (NCgl2108) wurden „Primer-Extension“-Experimente durchgeführt. Zunächst erfolgte die Hybridisierung eines IRD800-markierten Oligonukleotids mit Gesamt-RNA. Die Oligonukleotide (PE_nlpC_1 und PE_nlpC_2, vgl. Tab. 1)) wurden so gewählt, dass sie nahe des Translationsstartpunkts im kodierenden Bereich des *nlpC*-Gens binden. Dazu wurden 2 μl 5 x Annealing-Puffer (50 mM

Tris-HCl, pH 7,9, 4,25 M KCl) mit 1 µl markiertem Oligonukleotid (2 pmol/µl) und 10 µg RNA gemischt und auf 10 µl mit bidest. H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde im Thermo-Cycler (Primus 25 von MWG-Biotech) zunächst 5 min bei 65 °C inkubiert, um RNA-Sekundärstrukturen zu denaturieren und anschließend langsam auf 42 °C abgekühlt (0,5 °C pro 2 Minuten). Zur Synthese des komplementären cDNA-Strangs wurden folgende Komponenten als Gemisch dem Ansatz zugegeben: 10 µl 5 x Reverse-Transkriptase-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 7,0, 125 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 µl DTT (100 mM; GIBCO/BRL Life Technologies GmbH), 1 µl dNTP-Gemisch (je 25 mM; von GIBCO/BRL Life Technologies GmbH), 0,5 µl Actinomycin D (5 mg/ml in Ethanol), 23 µl bidest. H₂O und 1 µl Reverse-Transkriptase (200 U, Superscript II, GIBCO/BRL Life Technologies GmbH). Nach einstündiger Inkubation bei 42 °C wurden 120 µl RNase I-Reaktionsmix (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 µg/ml Lachssperma-DNA „sonicated“, 0,24 µl RNase A (100 mg/ml, DNase-frei, frisch zugegeben)) hinzugefügt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 17 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) wurde die DNA mit 380 µl eiskaltem Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 16100 g, 4 °C) sedimentiert, mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 2 µl Wasser gelöst und mit 2 µl Formamid-Ladepuffer (aus dem DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences) versetzt. 1 µl der Reaktion wurde dann mittels denaturierender PAGE mit Hilfe eines LiCor DNA sequencer 4200 (MWG Biotech) nach Angaben des Herstellers analysiert. Um den Transkriptionsstartpunkt bestimmen zu können, wurde neben den „Primer-Extension“-Proben als Referenz eine DNA-Sequenzierung aufgetragen. Um einen möglichst einfachen Vergleich zu haben, wurde die DNA-Sequenzierung mit dem Primer durchgeführt, der auch für die „Primer-Extension“-Analyse verwendet wurde, sowie einem PCR-Produkt, das die *nlpC*-Promotorregion abdeckte. Für die DNA-Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde das „Thermosequense fluorescent sequencing“-Kit (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers genutzt.

11.2 5`-RACE

Der Transkriptionsstartpunkt von *nlpC* wurde auch mit der 5`-RACE-Methode bestimmt. Das 5`-RACE-Kit (Roche Diagnostics) wurde größtenteils nach Herstellerangaben verwendet. Die einzelsträngige cDNA wurde ausgehend von 1 µg RNA aus *C. glutamicum ΔmtrA* mit dem Primer *nlpC_RACE_1*, reverser Transkriptase und dNTPs synthetisiert. Dazu wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 55 °C inkubiert. Direkt nach Aufreinigung der einzelsträngigen DNA wurde durch eine terminale Transferase das 3`-Ende der einzelsträngigen cDNA durch eine PolyA-Sequenz verlängert und damit das 5`-Ende bzw. der Transkriptionsstart der

entsprechenden mRNA markiert. Die verlängerte cDNA wurde dann mit dem Primer nlpC_RACE_2 und dem oligo-dT-anchor-Primer (5'-RACE kit, Roche Diagnostics) mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit dem PCR purification-Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit den Primern nlpC_RACE_3 und PCR anchor primer (5'-RACE kit, Roche Diagnostics) und der Taq-Polymerase reamplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde erneut aufgereinigt und mit Hilfe der A-Überhänge in den Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Die Base, die nach dem Poly-A-Schwanz folgt, stellt das 5'-Ende der entsprechenden mRNA dar, es sei denn, das 5'-Ende der mRNA beginnt mit einem oder mehreren Adeninen. In diesem Fall kann der Transkriptionsstart nicht basengenau festgelegt werden.

12 Transmissionselektronenmikroskopie

Zellen aus 5 ml Übernacht-Kultur wurden abzentrifugiert und in 1 ml 1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) mit 3 % (v/v) Glutardialdehyd resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 3 % (w/v) Agarose eingebettet und nachfolgend mit 1 % OsO₄ fixiert, entwässert und in Epoxydharz eingebettet. Ultradünnschnitte wurden auf ein Kupfer-Gitter aufgebracht, mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und mit einem Philips EM 400 Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

13 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)

Zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen wurden Etest-Streifen (AB Biodisk) verwendet, die Penicillin, Vancomycin oder Ethambutol enthielten. Zunächst wurden die entsprechenden *C. glutamicum*-Stämme in 5 ml LB-Medium, falls erforderlich mit 25 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG, über Nacht vorkultiviert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml des gleichen Mediums mit der Übernacht-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,25 angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 bis 2 kultiviert. 100 µl der Zellsuspension (bzgl. einer OD₆₀₀ von 2) wurden auf BHIS-Agarplatten (ggf. mit den entsprechenden Zusätzen) ausplattiert und anschließend sofort ein Etest-Streifen aufgelegt. Die Platten wurden 19 h bei 30 °C inkubiert und anschließend wurde sofort die MIC bestimmt.

14 Proteinbiochemische Methoden

14.1 Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle und Zellfraktionierung

Für den Aufschluss von *E. coli*- bzw. *C. glutamicum*-Zellen wurden diese in ca. 10 ml Aufschlusspuffer (TNI5-, TKMD- oder TGED-Puffer) resuspendiert und 100 µl Proteaseinhibitor-Mix (100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 100 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP) in wasserfreiem Ethanol) hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments, Rochester) bei einem Druck von 108 MPa (*E. coli*) bzw. durch fünf- bis zehnmahlige Passage bei einem Druck von 172 MPa (*C. glutamicum*). Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min, 5500 g, 4 °C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (60 min, 180000 g, 4 °C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Für die Proteinreinigung und die Affinitätsreinigungen wurde der Überstand der Ultrazentrifugation (= "Rohextrakt") eingesetzt.

14.2 Affinitätschromatographie mittels „Ni²⁺-Nitrilotriacetic acid“ (NTA)-Agarose

Die Proteinaufreinigung der verschiedenen Polyhistidin-„getaggten“ Proteine erfolgte über separate 15-ml-Polypropylen-Säulen (Qiagen), die luftblasenfrei mit je 2 ml suspendierter Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) gefüllt wurden, was einem Bettvolumen von 1 ml entsprach. Das Material wurde mit einer Fritte abgedeckt. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt (vgl. Kapitel 14.1) auf die Säule gegeben. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 20 ml TNI20-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 10 x 0,5 ml TNI400-Puffer eluiert. Proteine, die immer noch an Ni²⁺ gebunden waren, wurden durch Entfernen der Ni²⁺-Ionen mit 10 ml des EDTA enthaltenden "Strip"-Puffers entfernt. Die Säule wurde nun entweder bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C gelagert oder mit 5 ml 100 mM NiSO₄ für eine neue Chromatographie vorbereitet. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 20 µl mit jeweils 100 µl Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) 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.

14.3 Affinitätschromatographie mittels Amylose-Harz

Mit dieser Affinitätschromatographie konnten Proteine, die als Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein vorlagen, aufgereinigt werden. Eine 15 ml-Polypropylensäule wurde mit 10 ml einer Amylose-Chromatographiematerial-Suspension (Amylose gebunden an Agarose; New England Biolabs, Schwalbach) gefüllt, was einem Bettvolumen von 5 ml entsprach. Die Säule wurde mit 25 ml TKMD-Puffer äquilibriert und mit dem Rohextrakt (vgl. Kapitel 14.1) beladen. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 3 x 10 ml TKMD-Puffer. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden mit 10 x 1 ml TKMD-Puffer, der 10 mM Maltose enthielt, eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht (vgl. Kapitel 14.2) und die Eluatfraktionen mit Protein wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

14.4 Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex-G25-Material. Dazu wurden PD-10-Säulen von Amersham Biosciences, Freiburg verwendet. Von der Säule wurde die Kappe entfernt und die Ausflussspitze abgeschnitten. Die Säule wurde mit 25 ml des gewünschten neuen Puffers äquilibriert. Anschließend wurden bis zu 2,5 ml Proteinlösung aufgetragen. Dann wurde das Protein mit 10 x 0,5 ml des gewünschten Puffers eluiert. Die Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht (vgl. Kapitel 14.2) und die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen vereinigt.

14.5 Proteinverdau mittels Thrombin

Die Abspaltung des Histidin-„Tags“ von MtrA+NHis₆ wurde mit Hilfe des „Thrombin Cleavage Capture-Kits“ (Merck) durchgeführt. Dazu wurden pro mg gereinigtem MtrA+NHis₆ (in BS-Puffer) 8 U biotinyliertes Thrombin zugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die Entfernung des biotinylierten Thrombins erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 256 µl „Streptavidin Agarose Kügelchen“ (32 µl/U).

14.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test (Smith *et al.*, 1985) mit Rinder-Serumalbumin als Standard bestimmt. Das Prinzip des BCA-Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-

Reaktion). Durch die anschließende Chelatbildung von zwei Molekülen BCA wird ein blauvioletter Komplex gebildet, der stark bei 562 nm absorbiert. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches linear zur Proteinkonzentration. Es wurde je 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay-Kit, Pierce Biotechnology Inc.) versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert, 10 min bei RT abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 500 pro Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences).

14.7 Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen

Proteinlösungen wurden mit ¼ Volumen 100 % (w/v) TCA versetzt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend die präzipitierten Proteine 15 min bei 16100 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die präzipitierten Proteine in 0,5 ml Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 16100 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet luftgetrocknet und die Proteine in der gewünschten Lösung gelöst.

14.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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 12 %-ige Trenngele und 4 %-ige Sammelgele bzw. 15 %-ige Trenngele und 6 %-ige Sammelgele genutzt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen sechsfach konzentriertem Ladepuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 6 % β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, pH 6,8) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Protein Marker Broad Range (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V.

Routinegemäß wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele dreimal 10 min mit bidest. H₂O gewaschen, mind. 1 h in ca. 20 ml GelCode®Blue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. H₂O (mindestens 1 h) entfernt. Für die Silberfärbung wurden die SDS-Gele zunächst mindestens 30 min in Fixierlösung (40 % (v/v) Etanol), 10 % (v/v) Eisessig, 500 µl 37 %iges (v/v) Formaldehyd pro Liter) und dann zwei Mal 10 min in 30 % (v/v) Ethanol inkubiert. Es folgten ein einminütiges Waschen in 0,02 %-iger (w/v) Thiosulfatlösung und drei Mal 20 s in bidest H₂O. Anschließend wurden die Gele 20 min in Silbernitratlösung (0,2 %

(w/v) Silbernitrat, 75 µl 37 %iges (v/v) Formaldehyd pro 100 ml) geschwenkt und drei Mal kurz mit bidest. H₂O gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat und 500 µl 37 %iges (v/v) Formaldehyd pro 1000 ml. Nach ausreichender Färbung wurden die Gele kurz mit VE-Wasser gespült und dann 10 min in Stopp-Lösung (50 mM EDTA) geschüttelt.

14.9 Western-Blot

Für den Nachweis von MtrA mittels Western-Blot wurden anti-MtrA-Antikörper hergestellt. Dazu wurden 2 mg MtrA+CHis₁₀ wie in Brocker (2003) beschrieben gereinigt und in 1xPBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4) umgepuffert. Zwei Kanichen wurden mit dieser Proteinlösung nach Standardprotokoll (<http://www.biogenes.de/index.php?mid=217&vid=&lang=en>) der Firma Biogenes immunisiert. Die dadurch erhaltenen Antikörper waren spezifisch gegen MtrA. Darüber hinaus wurden mittels Affinitätschromatographie über an CNBR-aktivierte Sepharose gebundenes MtrA+CHis₁₀ aus 50 ml Serum monospezifische Antikörper isoliert.

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Membranen erfolgte durch Elektroblothing in einer Transblot Semi-Dry Transfer Cell (Biorad). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond C Extra, Amersham Biosciences) 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 luftblasenfrei auf die Anode gelegt und anschließend die Kathode aufgesetzt. Der Transfer erfolgte 45 – 60 min bei einer Stromdichte von 1 mA/cm².

Die Detektion von MtrA erfolgte mit polyklonalen, affinitätsgereinigten anti-MtrA-Antikörpern (Biogenes). Dazu wurde die Membran 1 h in Blockierungspuffer (TTBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) geschüttelt und anschließend 10 min in TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Für die spezifische Detektion von MtrA wurden die gewaschenen Membranen 2 h in Blockierungspuffer mit dem anti-MtrA-Antikörper (1:5000 verdünnt) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membranen für 5 min mit TTBS wurden sie 1 h in Blockierungspuffer mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-AP Conjugate, Biorad) in einer 1:3000-Verdünnung geschüttelt. Vor der Detektion wurden die Membranen 2 x 5 min mit Blockierungspuffer, 2 x 5 min mit TTBS und 1 x 5 min mit TBS (TTBS ohne Tween 20) gewaschen. Die Detektion erfolgte alternativ mit zwei verschiedenen Methoden. Bei der einen wurde die Membran in 25 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) mit je 250 µl 5-

Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (20 mg/ml H₂O) und 250 µl Nitroblau-tetrazoliumchlorid-Lösung (30 mg/ml 70 % Dimethylformamid) inkubiert. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Überführung der Membran in H₂O gestoppt. Bei der anderen Methode wurde als Substrat der alkalischen Phosphatase CPD-Star (Roche Diagnostics) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Detektion der Chemolumineszenz-Reaktion wurde die Membran für etwa 1 h unter einer CCD-Kamera (Fuji-Film LAS-1000) inkubiert.

14.10 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analysen wurden Gelstückchen aus Proteinbanden in silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten, mit Hilfe der Destainer A- und B-Lösungen des „ProteoSilver™ Plus Silver Stain-Kits“ (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers entfärbt und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis and Langen, 1997). Hierzu wurden die Gelstückchen nach 2 x 10 min Waschen mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 4 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 über Nacht bei RT verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 12 µl Wasser, 15 min Inkubation bei RT, Zugabe von 10 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und nochmals 10 min Inkubation bei RT eluiert. Anschließend wurden die Peptide mittels „ZipTip® C₁₈ standard bed“ (Millipore) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert, mit gesättigter α-Cyano-4-hydroxymethylsäure in 50 % (v/v) Acetonitril/ 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure eluiert und auf die Probenplatte aufgetragen. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des „Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“ (Applied Biosystems). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurde die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datendank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe des MS-Fit-Programms (Clauser *et al.*, 1999) genutzt. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn mindestens vier der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten oder mehr als 25 % des Proteins mit den identifizierten Peptiden abgedeckt werden konnte, wobei die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen durften und die Fehler der

einzelnen Peptide einem Muster folgten, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte.

15 Phosphorylierungsexperimente

Um die Autokinase-Aktivität verschiedener Sensorkinase-Derivate und den Phosphoryltransfer auf MtrA zu zeigen, wurde 12 μM Sensorkinase mit 80 μM γ - ^{32}P -ATP (6,25 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 40 μl gemischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von γ - ^{32}P -ATP gestartet und der Ansatz bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 7 μl Probe entnommen und mit dem gleichen Volumen 2xSDS-Ladepuffer versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Nach 20 min wurde zu 22,5 μl Reaktionsansatz 22,5 μl einer 24 μM MtrA+N_{GSH}-Lösung hinzugefügt, was zu einer Verdünnung der Sensorkinasen auf 6 μM , des ATPs auf 40 μM und des Antwortregulators auf 12 μM führte, und ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten 14 μl Probe entnommen und mit 1/5 Volumen 6xSDS-Ladepuffer versetzt. Um eine Phosphorylierung des Antwortregulators in Abwesenheit der Sensorkinase-Derivate auszuschließen, wurde auch ein Reaktionsansatz (12 μM MtrA+N_{GSH} in 15 μl) ohne Sensorkinase, mit 40 μM γ - ^{32}P -ATP inkubiert und nach 60 min eine 14 μl -Probe entnommen. Ohne vorheriges Aufkochen der Proben wurden dann jeweils die gesamte Probe auf ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die Lauffront der Gele abgetrennt, die so zurechtgeschnittenen Gele auf Whatman-3MM-Papier transferiert, mit Saranfolie bedeckt und 45 - 60 min bei 80 °C unter Vakuum auf einem Gelrockner getrocknet. Die getrockneten Gele wurden anschließend mit dem Whatman-3MM-Papier unten liegend in einer „Even-Pressure“-Kassette fixiert und ein PhosphorImage-Screen (Fuji Imaging Plates BAS-MS, 20 x 25 cm) aufgelegt. Die Screens ermöglichen die Detektion der in den Gelen vorhandenen ^{32}P -Beta-Strahlung. Hierbei werden durch die β -Strahlung Elektronen des Eu^{2+} , in dem mit bivalenten Europiumionen dotierten Bariumfluorobromid Kristall ($\text{BaFBr}:\text{Eu}^{2+}$) der photostimulierbaren-phosphor Schicht der „Imaging plate“, in das Leitungsband des Kristalls freigesetzt. Diese Elektronen werden in den Fehlstellen des Bromidionen-Kristallgitters in einem metastabilen Zustand „gefangen“, wodurch die Information über die räumliche Verteilung der Radioaktivität gespeichert wird. Durch Excitation der Elektronen mittels Laserlicht einer Wellenlänge von 633 nm kann die gespeicherte Information abgelesen werden. Durch die Excitation wird den Elektronen Energie zugeführt, die es ihnen ermöglicht, die Energiesenke ihres „gefangenen“ Zustands zu verlassen und auf das Energieniveau des Valenzbandes zurückzukehren. Die hierbei freiwerdende Energie wird in Form von Lumineszenz abgegeben und kann bei einer Wellenlänge von 390 nm detektiert werden. Nach 16 h Inkubation der Kassetten bei RT

wurden die Screens mit einem PhosphorImager (Fuji BAS 1800) ausgewertet. Die quantitative Auswertung der ausgelesenen Screens erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Aida 2.11 (Raytest Straubenhardt).

16 DNA-Protein-Interaktionsstudien

16.1 ChIP-to-chip

C. glutamicum Wildtyp und *C. glutamicum* $\Delta mtrA$ bzw. nur *C. glutamicum* WT wurden wie in dem Kapitel „Kultivierung von *C. glutamicum*“ beschrieben kultiviert. Bei einer OD_{600} von ca. 8 wurden die Zellen aus 300 ml bzw. 600 ml Kultur mittels Zentrifugation (10 min, 11325 *g*, 4 °C) geerntet, mit 50 ml CGXII Medium ohne MOPS gewaschen und in 10 ml CGXII ohne MOPS resuspendiert. Nach Zugabe von Formaldehyd (1 % (v/v) Endkonzentration) und 20-minütiger Inkubation bei RT wurde Glycin zu einer Endkonzentration von 125 mM zugefügt und die Kulturen erneut 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet, 2 x in 50 ml Puffer A (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen, in 10 ml Puffer A mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP) und 5 mg RNase A resuspendiert und mittels fünf Passagen durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments) bei einem Druck von 172 MPa aufgeschlossen. Die chromosomale DNA wurde mit Ultraschall (2 x 30 s, Pulslänge 40 %, Intensität 1; Branson sonifier 250) geschert, um eine mittlere Fragmentgröße von 200 bis 1500 bp zu erhalten. Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min, 5300 *g*, 4 °C) abgetrennt. Zur Immunopräzipitation von MtrA und MtrA-DNA-Komplexen wurde der Überstand der darauf folgenden Ultrazentrifugation (60 min bei 180000 *g*, 4 °C) mit 400 μ l affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern gegen Histidin-„getaggtetes“ MtrA für 2 h bei 4 °C (leicht schütteln) und anschließend für eine Stunde bei 4 °C (ebenfalls leicht schütteln) mit 800 μ l 50 %-iger Protein A-Agarose-Suspension (Pierce) inkubiert. Danach wurde die Protein A-Agarose je 2 x mit Puffer B (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholat), Puffer C (Puffer B mit 400 mM NaCl), Puffer D (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM LiCl, 0,5 % (v/v) Nonidet P-40, 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA) und Puffer A gewaschen, bevor sie 2 x in 500 μ l Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS) resuspendiert, 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (3 min, 2500 *g*, RT) wurde. Die Überstände wurden über Nacht bei 65 °C inkubiert, anschließend mit Proteinase K (Endkonzentration 400 μ g/ml) versetzt und weitere 3 h bei 55 °C inkubiert. Die DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt, mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 μ l bidest. H₂O resuspendiert. Die DNA beider

Elutionsschritte wurde vereinigt. Die anschließende PCR-Amplifikation der co-immunopräzipitierten DNA wurde wie unter http://derisilab.ucsf.edu/pdfs/Round_A_B_C.pdf in den Protokollen A und B beschrieben durchgeführt. In Runde A wurde mit Hilfe von Sequenase und dem Primer A (GTT TCC CAG TCA CGA TCN NNN NNN NN) Template für die anschließende PCR generiert. In Runde B wurde der spezifische Primer B (GTT TCC CAG TCA CGA TC) verwendet, um die DNA in einer PCR zu amplifizieren. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde so gewählt, dass gerade ein DNA-Schmier auf einem Agarosegel zu erkennen war. Die Fluoreszenzmarkierung der amplifizierten DNA wurde wie unter http://derisilab.ucsf.edu/pdfs/GenomicDNALabel_A.pdf Punkt 1 bis 6 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe von Zufallsoktanukleotid-Primern, Klenow-Polymerase und einem Nukleotidmix, in dem ein Teil der dTTPs durch Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP ersetzt wurde, markiert. Die markierte DNA wurde mit Hilfe des „Nucleotide Removal-Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in 50 µl H₂O eluiert. Das Eluat wurde dann in einer Vakuumzentrifuge auf 14,5 µl eingeeengt. Hybridisierung und Auswertung der DNA-Chips erfolgten wie unter 10.3 – 10.5 beschrieben.

Die ChIP-to-chip-Experimente wurden in zwei Variationen durchgeführt. In Variante A wurde die immunopräzipitierte DNA vom Wildtyp mit der immunopräzipitierten DNA der $\Delta mtrA$ -Mutante verglichen. In Variante B wurde immunopräzipitierte DNA vom Wildtyp mit der ebenfalls aus dem Wildtyp präzipitierten DNA ohne anti-MtrA-Antikörper verglichen. Beide Variationen der ChIP-to-chip-Analysen wurden drei Mal ausgehend von separaten Kulturen durchgeführt und die Ergebnisse wurden gemittelt. Der Anreicherungsfaktor für ein Gen oder eine Genregion entspricht dem Fluoreszenz-Verhältnis von immunopräzipitierter DNA des Wildtyps vs. immunopräzipitierter DNA der $\Delta mtrA$ -Mutante bzw. zwischen der immunopräzipitierten DNA des Wildtyps vs. der immunopräzipitierten DNA der Negativkontrolle.

16.2 DNA-Affinitätsreinigungen

Um DNA-Bindeproteine, die an die stromaufwärts liegenden Regionen von *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP*, *NCgl0102/0103*, *nrdH-nadE* und anderer Gene binden, zu identifizieren, wurden zunächst die entsprechenden Genregionen (vgl. Tab. 7) mit den Primern *mepA_Promotor_fw* und *mepA_Promotor_rv*, *nlpC_Promotor_fw* und *nlpC_Promotor_rv*, usw. (vgl. Tab. 1) amplifiziert. Dabei enthielten die fw-Primer am 5'-Ende vor der genspezifischen Sequenz eine zusätzliche Sequenz von 23 Nukleotiden. Zur Biotinylierung der PCR-Produkte wurden die gereinigten PCR-Produkte mit dem Biotin-Primer, der komplementär zu den 23 Nukleotiden der fw-Primer und am 5'-Ende Biotin-markiert ist, und den entsprechenden rv-Primern erneut amplifiziert. Diese nun biotinylierten PCR-Produkte wurden mittels

Gelfiltration aufgereinigt. Eine 15-ml-Polypropylensäule wurde mit 12 ml eines Gemisches aus Sephacryl S-400 HR-Suspension (Amersham Biosciences) und TE-Puffer pH 8,0 mit 150 mM NaCl (Verhältnis 3:1) gefüllt, was einem Bettvolumen von ca. 7 ml entsprach. Die Säule wurde mit 12 ml TE-Puffer pH 8,0 mit 150 mM NaCl, äquilibriert. Anschließend wurden die PCR-Ansätze aufgetragen und die DNA mit 20 x 0,4 ml TE-Puffer pH 8,0, 150 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden qualitativ auf ihren DNA-Gehalt untersucht, die Fraktionen die DNA enthielten auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fraktionen, die das PCR-Produkt enthielten, vereinigt. Je 220 pmol dieser DNA-Fragmente wurden an 5 mg Dynabeads[®] Streptavidin M-280 (Deutsche Dynal) nach Angaben des Herstellers gekoppelt. Für jeden Bindungsassay wurde Proteinrohextrakt (vgl. Kapitel 14.1) von 6 - 8 g *C. glutamicum*-Zellen (Feuchtwicht) eingesetzt, unter Verwendung von TGED-Puffer mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP). Zellaufschluss und Fraktionierung erfolgte wie unter 14.1 beschrieben, jedoch erfolgte die erste Zentrifugation bei 16000 g anstatt bei 5300 g. Der gesamte Proteinrohextrakt (ca. 20 ml) wurde in einem 50-ml Falcon-Röhrchen mit der an die paramagnetischen „Beads“ gekoppelten DNA und 500 µg chromosomaler *C. glutamicum*-DNA (ca. 3 mg/ml in TE) als Kompetitor 45 min bei RT inkubiert (leicht schütteln, um Sedimentation der „Beads“ zu vermeiden). Anschließend wurden die „Beads“ in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 2 x mit 500 µl TGED, 2 x mit 500 µl TGED mit 400 µg chromosomaler DNA und erneut 1 x mit 500 µl TGED gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden 2 x mit 350 µl Elutionspuffer (TGED mit 2 M NaCl) eluiert. Die Eluate wurden vereinigt, mittels TCA-Fällung (vgl. Kapitel 14.7) aufkonzentriert und entsalzt und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst. Je 10 µl wurden auf zwei 15 %igen SDS-Gelen aufgetrennt, von denen eines für einen Western-Blot mit anti-MtrA-Antikörpern eingesetzt wurde, während das andere silbergefärbt wurde. Aus diesem Gel wurden dominante Proteinbanden ausgeschnitten und die Proteine einer Peptidmassen-„fingerprint“-Analyse unterzogen.

16.3 Gelretardationsexperimente

Um zu untersuchen, ob gereinigtes MtrA an putative Zielgene binden kann, wurden die Promotorregionen dieser Gene oder Teile davon (Anhang A4, Tab. 10) durch PCR amplifiziert und mittels „PCR-Purification-Kit“ aufgereinigt. Je 100 ng des PCR-Produkts wurden zusammen mit verschiedenen molaren MtrA+N_{GSH}-Überschüssen (0 - 72-fach) in BS-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₂EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 4 µl Ladepuffer (0,1 % (w/v) Xylencyanolblau, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin in 1xTBE) versetzt und auf einem 15 %-igen nativen Gel (Acrylamid:Bisacrylamid 75:1) (1,33 ml

40 % (w/v) Acrylamid, 0,5 ml 2 % (w/v) Bisacrylamid, 0,5 ml 10xTBE, 2,12 ml H₂O bidest., 50 µl 10 % (w/v) APS und 5 µl TEMED) aufgetrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1xTBE. Die Elektrophorese erfolgte ca. 90 min bei RT und einer konstanten Spannung von 170 V. Nach 20-minütigem Schwenken der Gele bei RT in einem SYBR[®] Green-Färbebad (10 µl Sybr[®]Green I/100 ml TAE-Puffer) wurden die DNA-Banden durch Belichtung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences).

17 Bestimmung von Aminosäuren mittels *reversed-phase* HPLC

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt 1-ml-Proben entnommen und die Zellen sedimentiert (10 min, 16100 g, 4 °C). Die Aminosäure-Analyse des Überstandes erfolgte unter Verwendung eines Agilent Technologies 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einer ODS Hypersil 120 x 4 mm Trennsäule (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) mit 5 µm Partikelgröße und einer 40 x 4 mm Vorsäule. Die Aminosäure-Bestimmung erfolgte mittels *reversed phase*-HPLC nach Derivatisierung der Probe mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) nach (Lindroth and Mopper, 1979). Dies erfolgte durch eine automatisierte Derivatisierung, bei der 1 µl der zu analysierenden Probe mit 20 µl OPA/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt und eine Minute bei RT im Probenraum inkubiert wurde. Die Derivatisierung beruht auf der Reaktion der primären Aminogruppe mit OPA und 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert (Jones and Gilligan, 1983). Die Substanzen wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität mit einer Flussrate von 0,35 ml min⁻¹ innerhalb der ersten Minute und von 0,6 ml min⁻¹ innerhalb der folgenden 15 min bei 40 °C mit einem Gradienten (Abb. 4) aus 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2) als polarer Phase und Methanol als unpolare Phase eluiert. Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Excitation bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Identifizierung von Aminosäuren erfolgte anhand ihrer Retentionszeit. Die Aminosäurekonzentration in der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit Asparagin als internen Standard und einer Kalibriergraden aus externen Standards (Alanin) berechnet.

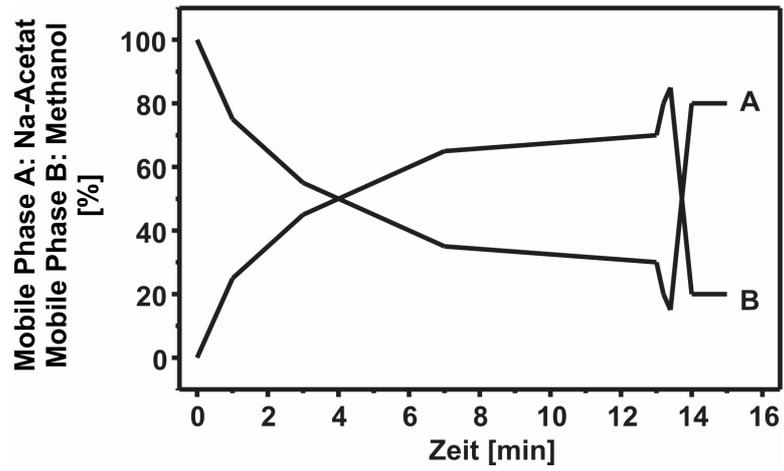


Abbildung 4: Zeitliche Gradientenzusammensetzung, für die Elution von derivatisierten Aminosäuren bei der HPLC-analytischen Bestimmung.

V Ergebnisse

1 Die $\Delta mtrAB$ -Mutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp

Um den Phänotyp der $\Delta mtrAB$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp genauer zu charakterisieren und zu quantifizieren wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, das Wachstum auf CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und gleichzeitig der pH-Verlauf der Kulturen miteinander verglichen sowie die minimal inhibitorischen Konzentrationen gegenüber Penicillin, Vancomycin und Ethambutol bestimmt. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 5) unterstützen die in der Einleitung beschriebene abnormale Morphologie von $\Delta mtrAB$ -Zellen, da einige Zellen der $\Delta mtrAB$ -Mutante eine untypische Septumbildung aufwiesen. Diese untypische Septumbildung deutet darüber hinaus darauf hin, dass die $\Delta mtrAB$ -Mutante einen Defekt bei der Zellteilung hat. Obwohl die $\Delta mtrAB$ -Mutante und der Wildtyp gleiche Wachstumsraten aufwiesen, trat die $\Delta mtrAB$ -Mutante deutlich früher in die stationäre Phase ein als der Wildtyp (Abb. 6) und erreichte mit einer OD_{600} von 31 eine im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduzierte End- OD_{600} ($OD_{600}=59$, Tab. 4). Bei der Suche nach den Gründen für diesen Defekt wurden der pH-Verlauf der Kulturen und die Glucosekonzentration in der stationären Phase bestimmt. In den Abb. 6 und 11 ist zu erkennen, dass der pH-Wert der Wildtyp-Kultur zunächst leicht auf pH 7,7 ansteigt, dann bis auf pH 6,5 sinkt und nach ca. 25 h wieder auf pH 7,3 steigt. Der pH-Wert der $\Delta mtrAB$ -Kultur hingegen fällt kontinuierlich von pH 7 auf pH 4,5 ab, obwohl CGXII-Minimalmedium mit 200 mM MOPS, 83 mM Harnstoff und 13 mM Phosphat eine hohe Pufferkapazität hat. In der Wildtyp-Kultur war die Glucose in der stationären Phase komplett verbraucht, wohingegen die $\Delta mtrAB$ -Kultur noch 70 mM von anfänglich 222 mM Glucose enthielt. Dies zeigt deutlich, dass das verminderte Wachstum nicht auf eine Kohlenstoff-Limitierung zurückzuführen ist. Wiedereinstellung des pH-Wertes der $\Delta mtrAB$ -Kultur auf pH 7 während des Wachstums führt dazu, dass diese Kultur die gleiche End- OD_{600} erreicht wie der Wildtyp (Abb. 6). Das zeigt, dass die Ansäuerung des Mediums für den frühzeitigen Eintritt der $\Delta mtrAB$ -Mutante in die stationäre Phase verantwortlich ist. Die Substanz, die für die Ansäuerung des Mediums verantwortlich ist, konnte bisher nicht identifiziert werden. In vorangegangenen Arbeiten konnten jedoch schon Aminosäuren und die organischen Säuren Oxalacetat, Pyruvat, Malat, Succinat, Lactat, Fumarat und Acetat als Verursacher des pH-Abfalls ausgeschlossen werden (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Im Überstand der $\Delta mtrAB$ -Kultur konnte nach ca. 50 h bis zu 14 mM Alanin nachgewiesen werden. Dies kann jedoch die Ansäuerung des Mediums nicht erklären.

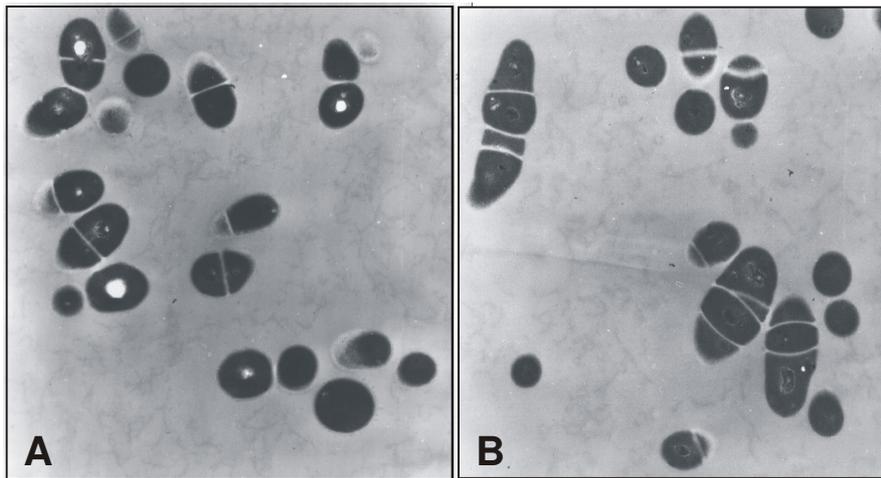


Abb. 5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 1:23000) von *C. glutamicum* Wildtyp (A) und $\Delta mtrAB$ -Mutante (B) nach Wachstum auf LB-Medium (24 h, 30 °C, 120 Upm).

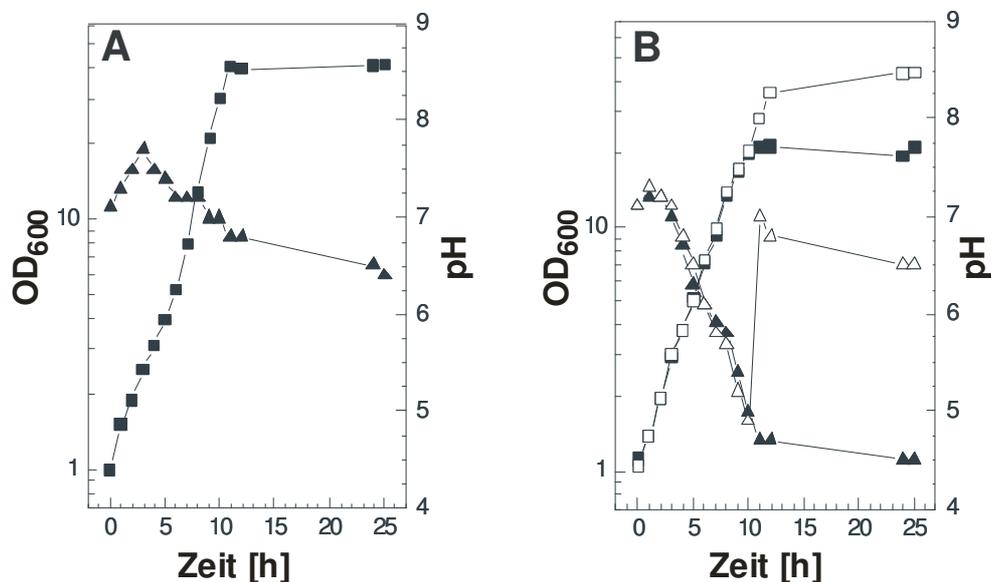


Abb. 6: Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp (A) und der $\Delta mtrAB$ -Mutante (B) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose. Neben der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600} , Quadrate) ist auch der pH-Verlauf (Dreiecke) der Kulturen gezeigt. In B wurden zwei $\Delta mtrAB$ -Kulturen kultiviert. Sobald die Wachstumsrate kleiner wurde, wurde der pH-Wert einer Kultur (offene Symbole) von pH 5 auf pH 7 titriert.

In vorherigen Arbeiten konnten wir schon zeigen, dass die $\Delta mtrAB$ -Mutante sensitiver gegenüber Vancomycin und Lysozym, aber resistenter gegenüber Ethambutol ist (Brocker, 2003). Um diese Unterschiede zu quantifizieren, wurden minimal inhibitorische Konzentrationen für Penicillin, Vancomycin und Ethambutol mit Hilfe von Etest-Streifen (AB Biodisk) bestimmt. Penicillin und Vancomycin inhibieren beide den gleichen Schritt in der Peptidoglycan-Synthese, nämlich die Quervernetzung des Peptidoglykans durch Transpeptidasen. Penicillin bindet an das katalytische Zentrum der Transpeptidasen und

inaktiviert somit das Enzym, wohingegen Vancomycin an die Substrate der Transpeptidasen, also an die terminalen D-Ala-D-Ala-Reste des Peptidoglykans und des Lipids II, bindet und somit eine Interaktion des Enzyms mit seinen Substraten verhindert (Hubbard and Walsh, 2003). Im Gegensatz dazu inhibiert Ethambutol die membrangebundene Arabinosyltransferase und hemmt somit die Synthese des Arabinogalaktans der Zellwand (Belanger *et al.*, 1996). Für die $\Delta mtrAB$ -Mutante konnte eine um den Faktor drei erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Penicillin, eine um den Faktor zwei erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin, aber eine um das mehr als 150-fache erhöhte Resistenz gegenüber Ethambutol beobachtet werden (vgl. Tab 4).

Tab. 4: Phänotypische Merkmale verschiedener *C. glutamicum*-Stämme, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Stamm	Wachstumsrate μ^a (h^{-1})	Maximale OD ₆₀₀ ^a	Zelllänge ^b		MIC ^c [$\mu g/ml$]		
			(μm)	Penicillin	Vancomycin	Ethambutol	
13032	0,40 ± 0,03	59 ± 4 *	1,5 ± 0,2	0,45 ± 0,07	0,92 ± 0,14	1,7 ± 0,27	
$\Delta mtrAB$	0,42 ± 0,05	31 ± 4 *	3,7 ± 0,3	0,15 ± 0,07	0,45 ± 0,19	>256	
$\Delta mtrAB\Delta mepA$	0,40 ± 0,01	34 ± 8	2,9 ± 0,8	0,13 ± 0,08	0,55 ± 0,26	>256	
$\Delta mtrAB\Delta ppmA$	0,38 ± 0,02	33 ± 8	2,8 ± 0,4	0,17 ± 0,09	0,47 ± 0,06	>256	
$\Delta mtrA$	0,45 ± 0,06	43 ± 6	2,1 ± 0,6	0,20 ± 0,16	0,53 ± 0,14	>256	
$\Delta mtrB$	0,44 ± 0,02	40 ± 6	1,8 ± 0,4	0,26 ± 0,07	0,50 ± 0,00	4,33 ± 1,53	
13032-pEKEx2	0,31 ± 0,00	61 ± 0 *	1,6 ± 0,2	0,50 ± 0,14	0,91 ± 0,30	3,21 ± 1,58	
13032- pEKEx2- <i>mtrAB</i>	0,24 ± 0,00	62 ± 2 *	1,5 ± 0,2	0,32 ± 0,07	0,89 ± 0,32	1,57 ± 0,35	
$\Delta mtrAB$ - pEKEx2	0,27 ± 0,02	36 ± 5 *	3,0 ± 0,8	0,06 ± 0,01	0,43 ± 0,16	>256	
$\Delta mtrAB$ - pEKEx2- <i>mtrAB</i>	0,31 ± 0,02	39 ± 4 *	1,6 ± 0,3	0,52 ± 0,21	0,86 ± 0,31	5,00 ± 2,29	

^a Wachstumsrate und maximale OD₆₀₀ wurde für mindestens drei unabhängige Kultivierungen in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose bestimmt und gemittelt.

^b Zelllängen wurden für Zellen, die in MMI-Medium kultiviert worden waren, bestimmt.

^c Minimal inhibitorische Konzentrationen (MICs) wurden mit Hilfe von Etest-Streifen ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

* Diese Werte wurden auf Grund der Verwendung zwei verschiedener Photometer mit einem Umrechnungsfaktor von 1,6 aneinander angepasst.

Um zu zeigen, dass die Eigenschaften der $\Delta mtrAB$ -Mutante auf die Deletion der *mtrAB*-Gene zurückzuführen ist, wurde der Phänotyp einer komplementierten Mutante, in der die *mtrAB*-Gene plasmidkodiert vorlagen, bzgl. Morphologie, Wachstum, pH-Verlauf und Antibiotikasensitivität analysiert. Dazu wurde zunächst das Plasmid pEKEx2-*mtrAB*

konstruiert. Die *mtrAB*-kodierende Region inklusive 31 Basenpaaren stromaufwärts von *mtrA* wurde mit den Primern MtrA_BamHI_fw und MtrB_BamHI_rv (vgl. Tab. 1), mit deren Hilfe gleichzeitig BamHI-Schnittstellen eingeführt wurden, chromosomaler *C. glutamicum*-DNA als Matrize und PfuTurboC_x Hotstart DNA-Polymerase amplifiziert. Nachdem mit Hilfe der Taq-Polymerase Adenosin-Überhänge hinzugefügt wurden, wurde das 2,3-kb-PCR-Produkt in den pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach BamHI-Verdau von pCR2.1-*mtrAB* (vgl. Anhang A3, Abb. 34) wurde das *mtrAB*-Fragment in den ebenfalls mit BamHI geschnittenen pEKEx2-Vektor kloniert und in *E. coli* DH5 α transferiert. In dem daraus resultierenden Plasmid pEKEx2-*mtrAB* (vgl. Anhang A3, Abb. 35) steht die Expression der *mtrAB*-Gene unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Die Sequenzierung von isolierten Plasmiden dreier unterschiedlicher Klone (bei AGOWA) ergab, dass keines der klonierten *mtrAB*-Fragmente eine Abweichung von der publizierten Sequenz enthielt. Eines dieser Plasmide und als Kontrolle pEKEx2 wurden mittels Elektroporation in den Wildtyp und in die Δ *mtrAB*-Mutante transferiert und die resultierenden Stämme anschließend phänotypisch charakterisiert. Wachstumsexperimente in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose ergaben, dass die Ansäuerung des Mediums und der daraus resultierende Wachstumsstopp nicht komplementiert wurde (Abb. 8), unabhängig von einer Induktion der *mtrAB*-Expression mit 1 mM IPTG. Im Gegensatz dazu war die Morphologie der komplementierten Zellen in Gegenwart von 1 mM IPTG wieder vergleichbar der des Wildtyps (Abb. 7) und auch die Empfindlichkeit gegenüber den verschiedenen Antibiotika war bei Induktion mit 1 mM IPTG vergleichbar der des Wildtyps (Tab. 4). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Komplementation bzgl. Morphologie und Antibiotikasensitivität erfolgreich war, bzgl. der Ansäuerung des Kulturmediums jedoch nicht.

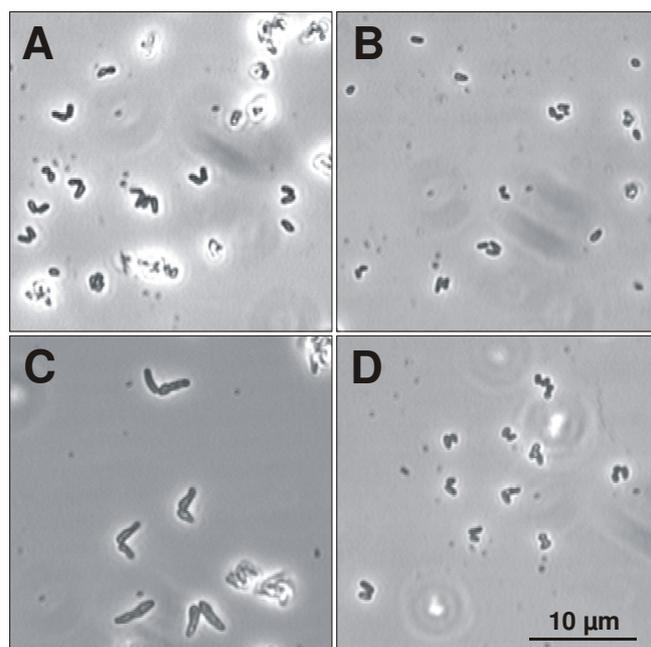


Abb. 7: Zellmorphologie von *C. glutamicum*/pEKEx2 (A), *C. glutamicum*/pEKEx2-*mtrAB* (B), Δ *mtrAB*/pEKEx2 (C) und Δ *mtrAB*/pEKEx2-*mtrAB* (D) nach 16 h Wachstum in MMI-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose, 25 μ g/ml Kanamycin und 1 mM IPTG. Die Fotos wurden mit Hilfe eines Leica Mikroskops DM-LB (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), das mit einer CallCam-Videokamera (Phase, Lübeck, Germany) ausgestattet ist, aufgenommen und zwar bei einer 1000-fachen Vergrößerung.

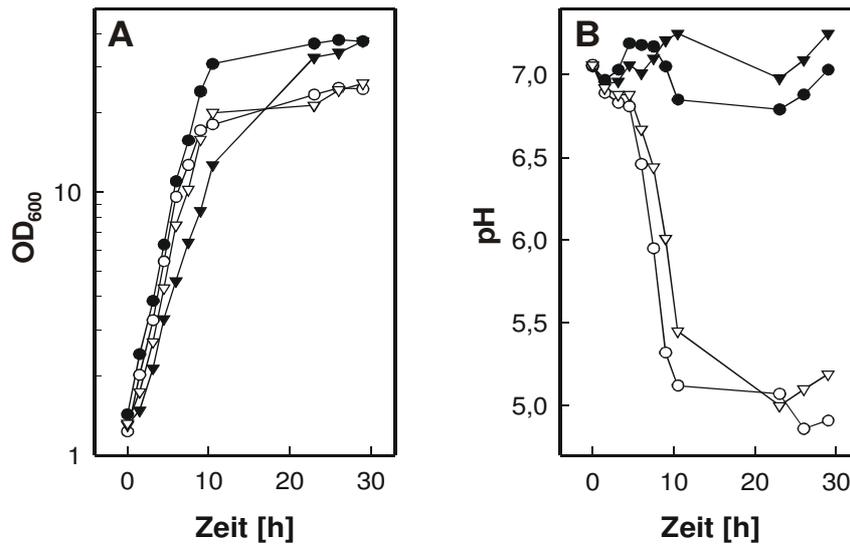


Abb. 8: Wachstum (A) und pH-Verlauf (B) von *C. glutamicum*/pEKEx2 (●) und *C. glutamicum*/pEKEx2-*mtrAB* (▼), *C. glutamicum* Δ*mtrAB*/pEKEx2 (○) und *C. glutamicum* Δ*mtrAB*/pEKEx2-*mtrAB* (▽) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose, 25 µg/ml Kanamycin und 1 mM IPTG.

2 Konstruktion und Charakterisierung der Δ*mtrA*-, Δ*mtrB*-, Δ*mtrAB*Δ*mepA*- und Δ*mtrAB*Δ*ppmA*-Mutanten

Die Analyse der globalen Genexpression von *C. glutamicum* Δ*mtrAB* ergab, dass drei Gene einen mehr als dreifach erhöhten mRNA-Level im Vergleich zum Wildtyp hatten, nämlich *mepA*, *ppmA* und *lpqB*. *mepA* kodiert eine membrangebundene Metallopeptidase, *ppmA* einen möglichen membrangebundenen Proteasemodulator und *lpqB* ein Lipoprotein unbekannter Funktion. Das *lpqB*-Gen ist direkt stromabwärts des *mtrB*-Gens lokalisiert (vgl. Abb. 2) und wird vermutlich mit diesem zusammen transkribiert (Brocker and Bott, 2006; Möker *et al.*, 2004). Wenn die erhöhte Expression eines dieser drei Gene für den Phänotyp der Δ*mtrAB*-Mutante verantwortlich ist, sollte durch Deletion dieses Gens der Wildtyp-Phänotyp revertiert werden. Daher sollten die Stämme *C. glutamicum* Δ*mtrAB*Δ*mepA*, *C. glutamicum* Δ*mtrAB*Δ*ppmA* und *C. glutamicum* Δ*mtrAB*Δ*lpqB* konstruiert werden. Im Falle der Δ*mtrAB*Δ*lpqB*-Mutante sollte zum einen versucht werden *lpqB* in der Δ*mtrAB*-Mutante zu deletieren, und zum anderen *mtrAB* und *lpqB* gemeinsam im Wildtyp zu deletieren. Darüber hinaus sollten auch Δ*mtrA*- und Δ*mtrB*-Einzelmutanten konstruiert werden. Ein Vergleich der Einzelmutanten mit der Δ*mtrAB*-Mutante und dem Wildtyp könnte Hinweise darauf geben, ob MtrA in seiner unphosphorylierten oder in seiner phosphorylierten Form aktiv ist.

Für die Einführung dieser Deletionen wurde das jeweilige Gen bis auf die sechs 5'-terminalen und die 12 3'-terminalen Codons durch eine 21-bp-Sequenz ersetzt (vgl. Material und Methoden). Dazu wurden zunächst die Plamide pK19*mobsacB*-Δ*mepA*, pK19*mobsacB*-Δ*ppmA*, pK19*mobsacB*-Δ*lpqB*, pK19*mobsacB*-Δ*mtrAB*Δ*lpqB*, pK19*mobsacB*-Δ*mtrA* und

pK19*mobsacB-ΔmtrB* (vgl. Anhang A3, Abb. 36–41) konstruiert und diese anschließend durch Elektroporation in die *ΔmtrAB*-Mutante (pK19*mobsacB-ΔmepA*, pK19*mobsacB-ΔppmA* und pK19*mobsacB-ΔlpqB*) oder in den *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm (pK19*mobsacB-ΔmtrABΔlpqB*, pK19*mobsacB-ΔmtrA* und pK19*mobsacB-ΔmtrB*) transferiert. Nach Durchführung des zweiten Rekombinationsschritts wurden Klone, die sowohl saccharose-resistent als auch kanamycin-sensitiv waren, durch Kolonie-PCR mit Primern, die außerhalb des zu deletierenden Bereichs binden, analysiert.

Bei der Deletion des *mepA*-Gens wurden vier saccharose-resistente und kanamycin-sensitive Klone getestet. Einer dieser mittels PCR getesteten Klone besaß die chromosomale Deletion des *mepA*-Gens. Bei der Deletion des *ppmA*-Gens wurden 19 saccharose-resistente und kanamycin-sensitive Klone getestet. Unter den PCR-Produkten entsprachen 14 der erwarteten Größe von 938 bp. D. h., dass die Konstruktion der *ΔmtrABΔmepA*- und der *ΔmtrABΔppmA*-Mutante erfolgreich war. Die Konstruktion von *C. glutamicum ΔmtrABΔlpqB* hingegen konnte weder durch die Deletion von *lpqB* in der *ΔmtrAB*-Mutante noch von *mtrAB* und *lpqB* zusammen in *C. glutamicum* Wildtyp erreicht werden. In beiden Fällen wurde der zweite Rekombinationsschritt dreimal durchgeführt, da nur wenige saccharose-resistente und kanamycin-sensitive Klone erhalten werden konnten. Insgesamt wurden 48 der in Frage kommenden Klone untersucht. Dabei konnte kein Produkt der erwarteten Größe erhalten werden (1 kb). Stattdessen wurde in allen Fällen ein 4,9-kb-Wildtyp-Fragment amplifiziert. Dies deutet darauf hin, dass *lpqB* eine essentielle Funktion haben könnte. Bei der Deletion des *mtrA*- bzw. des *mtrB*-Gens wurden einer bzw. 9 saccharose-resistente und kanamycin-sensitive Klone durch Kolonie-PCR überprüft. Dabei konnten ein Produkt bzw. sechs Produkte der erwarteten Größen erhalten werden (2428 bp bzw. 1595 bp). In den anderen Fällen wurde das Wildtyp-Fragment (3052 bp) oder gar kein Fragment amplifiziert.

Im Falle der *ΔmtrA*- und *ΔmtrB*-Mutanten wurde die Deletion außerdem durch Southern-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 9). Mit dem Biotin-markierten Insert aus pK19*mobsacB-ΔmtrA* (entspricht dem Produkt der Crossover-PCR mit dem Primerpaar Delta *mtrA*-1/Delta *mtrA*-4) als Sonde wurden in *Nco*I- bzw. *Hinc*II verdauter chromosomaler Wildtyp-DNA Fragmente von 1,7 kb (*Nco*I) bzw. von 2,0 kb und 1,3 kb (*Hinc*II) detektiert. In der *ΔmtrA*-Mutante wurde hingegen Fragmente von 1,1 kb (*Nco*I) bzw. 2,6 kb (*Hinc*II) nachgewiesen. Durch die Deletion des *mtrA*-Gens wurde eine *Hinc*II-Schnittstelle entfernt. Diese Größen stimmen gut mit den aufgrund der Genomsequenz erwarteten Fragmentgrößen überein. Bei der 3,2-kb-Bande und den anderen Banden größer als 2,6 kb in Abbildung 9 handelt es sich vermutlich um Hybridisierungen der Sonde mit unvollständig verdauter DNA.

Mit dem Biotin-markierten Insert pK19*mobsacB-ΔmtrB* (entspricht dem Produkt der Crossover-PCRs mit dem Primerpaar Delta *mtrB*-1/Delta *mtrB*-4) als Sonde wurden in *Mfe*I-

bzw. NarI-verdauter chromosomaler DNA des Wildtyps Fragmente von 5,3 kb (MfeI) bzw. von 2,7 kb und 1,6 kb (NarI) detektiert. In der $\Delta mtrB$ -Mutante wurden dagegen Fragmente von 3,8 kb (MfeI) bzw. 2,9 kb (NarI) nachgewiesen. Durch die Deletion des *mtrB*-Gens wurde eine NarI-Schnittstelle entfernt. Diese Größen stimmen gut mit den aufgrund der Genomsequenz erwarteten Fragmentgrößen überein. Bei den größeren Banden in Abbildung 9 handelt es sich vermutlich um Hybridisierungen der Sonde mit unvollständig verdauter DNA.

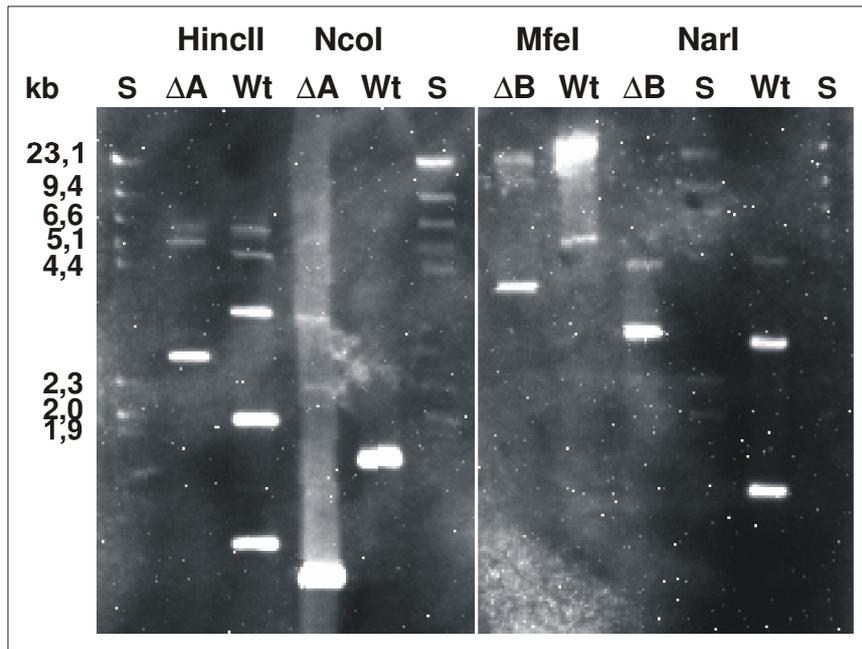


Abb. 9: Southern-Blot-Analyse einer *C. glutamicum* $\Delta mtrA$ - und einer *C. glutamicum* $\Delta mtrB$ -Mutante. Genomische DNA aus *C. glutamicum* Wildtyp (Wt), *C. glutamicum* $\Delta mtrA$ (ΔA) und *C. glutamicum* $\Delta mtrB$ (ΔB) wurde mit HincII oder NcoI (Wildtyp und $\Delta mtrA$) bzw. mit MfeI oder NarI (Wildtyp und $\Delta mtrB$) geschnitten und nach Agarosegelelektrophorese und Blotten mit dem Biotin-markierten $\Delta mtrA$ -Insert aus pK19*mobsacB*- $\Delta mtrA$ bzw. mit dem Biotin-markierten $\Delta mtrB$ -Insert aus pK19*mobsacB*- $\Delta mtrB$ hybridisiert. S, λ -DNA Längenstandard.

Die phänotypische Charakterisierung der $\Delta mtrAB\Delta mepA$ - und $\Delta mtrAB\Delta ppmA$ -Mutanten zeigte, dass sie die gleichen Wachstumsraten auf CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose wie der Wildtyp und die $\Delta mtrAB$ -Mutante aufwiesen und wie die $\Delta mtrAB$ -Mutante auf Grund der Ansäuerung des Mediums bei einer niedrigeren OD_{600} in die stationäre Phase eintraten (Tab. 4 und Abb. 11). Die Zelllänge der Dreifachmutanten war leicht reduziert im Vergleich zur $\Delta mtrAB$ -Mutante (Abb. 10 und Tab. 4) und die Sensitivität gegenüber Penicillin, Vancomycin und Ethambutol war sehr ähnlich zu der der $\Delta mtrAB$ -Mutante. Das bedeutet, dass die erhöhte Expression von *mepA* bzw. *ppmA* alleine nicht für den pleiotropen Phänotyp der $\Delta mtrAB$ -Mutante verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den Dreifachmutanten unterschied sich der Phänotyp der $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Mutanten von dem der $\Delta mtrAB$ -Mutante. Das Wachstum der $\Delta mtrA$ - und der $\Delta mtrB$ -Mutante in CGXII-Minimalmedium führte

nicht zu einer Ansäuerung des Mediums (Abb. 11) und die Glucose wurde vollständig verbraucht. Nachdem die Einzelmutanten die stationäre Phase erreicht hatten fiel die OD_{600} wieder ab, was auf eine teilweise Lyse der Zellen hindeutete. Die Zellen der $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Mutanten waren verlängert verglichen zu den Wildtyp-Zellen, jedoch deutlich kürzer als die Zellen der $\Delta mtrAB$ -Mutante (Abb. 10 und Tab. 4). Bzgl. der Sensitivität gegenüber den getesteten Antibiotika verhielten sich die Einzelmutanten wie die $\Delta mtrAB$ -Mutante, bis auf eine Ausnahme: Die Sensitivität der $\Delta mtrB$ -Mutante gegenüber Ethambutol war ähnlich der des Wildtyps und somit viel größer als die der anderen Mutanten (Tab. 4).

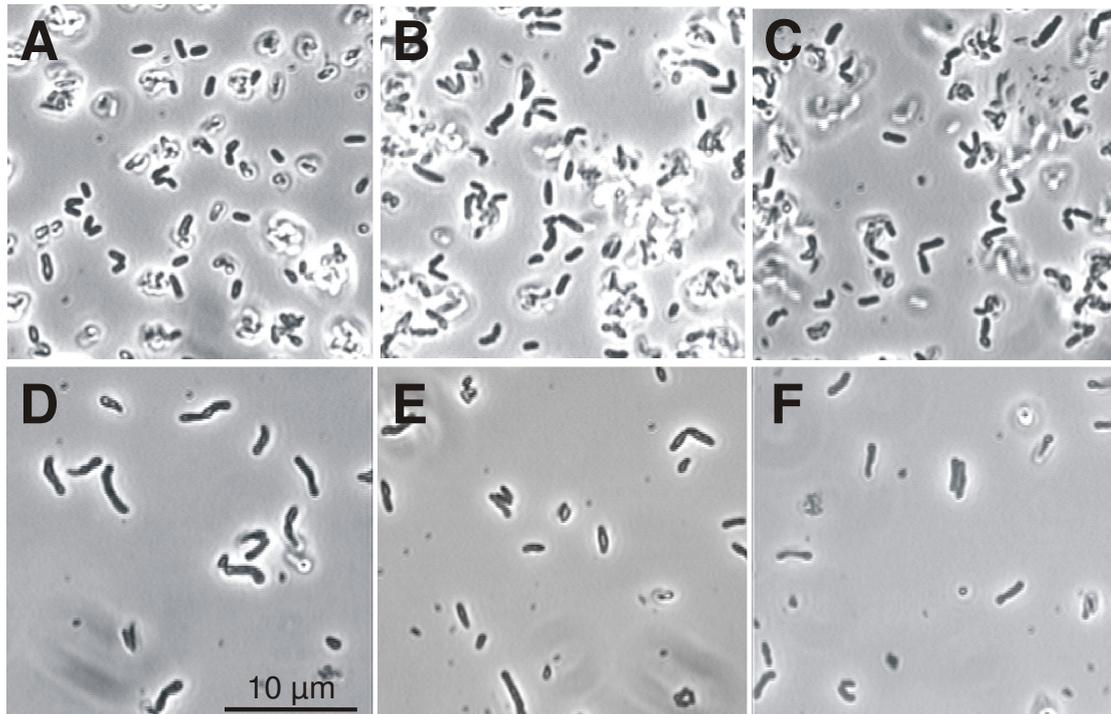


Abb. 10: Zellmorphologie von *C. glutamicum* Wildtyp (A) und den Mutanten $\Delta mtrA$ (B), $\Delta mtrB$ (C), $\Delta mtrAB$ (D), $\Delta mtrAB\Delta mepA$ (E) and $\Delta mtrAB\Delta ppmA$ (F) nach 16 h Wachstum in MMI-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose. Die Fotos wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung mit Hilfe eines Leica Mikroskops DM-LB (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) aufgenommen, das mit einer CallCam Videokamera (Phase, Lübeck, Germany) ausgestattet ist.

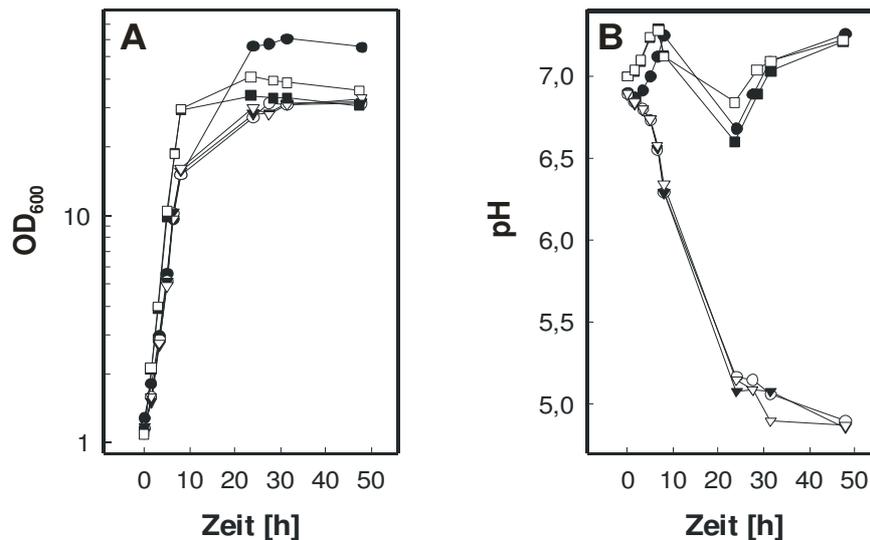


Abb. 11: Wachstum (A) und pH-Verlauf (B) von *C. glutamicum* Wildtyp (●), *C. glutamicum* $\Delta mtrAB$ (○), *C. glutamicum* $\Delta mtrAB\Delta mepA$ (▼), *C. glutamicum* $\Delta mtrAB\Delta ppmA$ (▽), *C. glutamicum* $\Delta mtrA$ (■) und *C. glutamicum* $\Delta mtrB$ (□) in CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle.

3 Vergleichende Transkriptomanalyse von $\Delta mtrA$ und *C. glutamicum* Wildtyp

Um den Einfluss der *mtrA*-Deletion auf die globale Genexpression zu untersuchen, wurden die mRNA-Level der $\Delta mtrA$ -Mutante und des Wildtyps mit genomweiten DNA-Microarrays miteinander verglichen. Dazu wurden die beiden Stämme auf CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose kultiviert, bei einer OD₆₀₀ zwischen 5 und 6 geerntet und die RNA aus diesen Zellen isoliert. Nach Umschreibung in cDNA und Fluoreszenzmarkierung wurden gleiche Mengen der beiden Proben gemischt und zur Hybridisierung eingesetzt. Der Vergleich wurde, ausgehend von unabhängigen Kulturen, drei Mal durchgeführt. In Tabelle 5 sind alle Gene aufgelistet, deren gemittelttes mRNA-Verhältnis ($\Delta mtrA$ -Mutante/Wildtyp) ≥ 2 oder $\leq 0,5$ war und deren *p*-Wert kleiner 0,05 war. Der mRNA-Level von sechs Genen war mehr als zweifach erhöht in der $\Delta mtrA$ -Mutante, nämlich von *mepA*, *nlpC*, *NCgl1251*, *NCgl0689*, *NCgl0382* und *NCgl0381*. Das *mepA*-Gen kodiert ein vermutlich membrangebundenes Protein mit einer carboxyterminalen Metallopeptidase-Domäne, die extracytoplasmatisch lokalisiert ist (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). *nlpC* kodiert ein sekretiertes Protein mit einem N-terminalen Signalpeptid (vermutliche Schnittstelle nach Alanin-35) und einer carboxyterminalen Domäne, die zur NlpC/P60-Superfamilie (Anantharaman and Aravind, 2003) gehört und vermutlich ebenfalls als Zellwand-Peptidase fungiert. *NCgl1251* kodiert für ein Protein unbekannter Funktion, *NCgl0689* für eine mögliche Dehydrogenase/Oxidoreduktase und *NCgl0382* sowie *NCgl0381* für Proteine, die in die Häm-Verwertung involviert sein könnten (Wennerhold and Bott, 2006).

Der mRNA-Level von 14 Genen (ohne *mtrA*) war mehr als zweifach erniedrigt in der $\Delta mtrA$ -Mutante. Einige dieser Gene spielen eine Rolle bei der Antwort auf oxidativen Stress, wie *dps*, *katA* und *oxyR*. Das *dps*-Gene kodiert für ein DNA-Bindeprotein, das DNA vor oxidativen Schäden schützen kann, indem es unspezifisch an DNA bindet und Fe^{2+} zu Fe^{3+} Eisen oxidiert, welches im Zentrum des Dps-Dodecamers gespeichert wird. Das *katA*-Gen kodiert für das Hämprotein Katalase und *oxyR* kodiert für einen Transkriptionsregulator, der Gene reguliert, die bei der Bewältigung von oxidativem Stress eine Rolle spielen. Darüber hinaus hat auch *ftn*, welches das Eisen-Speicherprotein Ferritin kodiert, einen erniedrigten mRNA-Level in der $\Delta mtrA$ -Mutante. *NCgl0226* kodiert ein Protein, das mit dem Stressprotein CsbD von *Bacillus subtilis* verwandt ist, das von σ^B kontrolliert wird, dessen Funktion allerdings unbekannt ist (Akbar *et al.*, 1999). Die Gene *betP* und *proP* kodieren sekundäre Transporter für kompatible Solute. ProP katalysiert die Aufnahme von Prolin und Ectoin (Peter *et al.*, 1998) und BetP die Aufnahme von Betain (Peter *et al.*, 1996). Außerdem zeigen Gene für eine putative Acetyltransferase (*NCgl1368*), für die Aconitase (*NCgl1482*) für ein Protein mit einer Flavin-enthaltenen Monooxygenase ähnlichen Domäne (*NCgl1096*) sowie für vier integrale Membranproteine (*NCgl1837*, *NCgl0752*, *NCgl2434* und *NCgl1097*) einen mehr als zweifach erniedrigten mRNA-Level in der $\Delta mtrA$ -Mutante.

Sechs der Gene (neben *mtrA*) die einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Level in der $\Delta mtrA$ -Mutante aufwiesen, hatten auch in der $\Delta mtrAB$ -Mutante einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Level, nämlich *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP*, *csbD* und *NCgl1837* (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Die anderen Gene zeigten nur in der $\Delta mtrA$ -Mutante einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Level. Wie in der Diskussion noch näher erläutert wird, könnte die An- bzw. Abwesenheit der Sensorkinase MtrB für diesen Unterschied verantwortlich sein.

Tab. 5: Ergebnisse von drei DNA-Microarray-Experimenten, in denen der mRNA-Level der $\Delta mtrA$ -Mutante mit dem des Wildtyps verglichen wurde^a. Darüber hinaus wurden Ergebnisse von drei DNA-Microarray-Experimenten, in denen der mRNA-Level der $\Delta mtrAB$ -Mutante mit dem des Wildtyps verglichen wurde, ergänzt^b.

NCgl -Nr.	Gen	Postulierte oder nachgewiesene Funktion des Genprodukts	mRNA-Verhältnis $\Delta mtrA/WT$	mRNA-Verhältnis $\Delta mtrAB/WT$
<i>NCgl2411</i>	<i>mepA</i>	Put. sekretierte Metalloendopeptidase	6,19	14,51*
<i>NCgl0381</i>		Put. am Häm-Transport beteiligtes Protein	3,67	1,69
<i>NCgl0382</i>		Put. am Häm-Transport beteiligtes Protein	2,74	1,29

NCgl -Nr.	Gen	Postulierte oder nachgewiesene Funktion des Genprodukts	mRNA-Verhältnis $\Delta mtrA/WT$	mRNA-Verhältnis $\Delta mtrAB/WT$
NCgl0689		Put. Dehydrogenase/Oxidoreductase	2,41	1,65
NCgl1251		Hypothetisches Protein	2,38	0,91
NCgl2108	<i>nlpC</i>	Put. Zellwand-Peptidase	2,26	2,7*
NCgl2897	<i>dps</i>	Dps-Protein	0,19	0,74
NCgl0251	<i>katA</i>	Katalase	0,28	0,84
NCgl2961	<i>proP</i>	Prolin/Ectoin Aufnahmetransporter	0,29	0,12*
NCgl1368		Put. Acetyltransferase	0,33	0,64
NCgl1097		Membranprotein	0,35	0,71
NCgl0226	<i>csbD</i>	Put. Stressantwort-Protein	0,39	0,33*
NCgl0856	<i>betP</i>	Betain-Aufnahmetransporter	0,39	0,17*
NCgl1850	<i>oxyR</i>	Transkriptionsregulator	0,40	0,96
NCgl1096		Put. Flavin-enthaltene Monooxygenase	0,42	0,35
NCgl2434		Membranprotein	0,43	0,39
NCgl0721	<i>mtrA</i>	Antwortregulator MtrA	0,44	0,27*
NCgl0752		Membranprotein	0,49	1,09
NCgl2439	<i>ftn</i>	Ferritin	0,50	1,02
NCgl1482	<i>acn</i>	Aconitase	0,50	1,03
NCgl1837		Membranprotein	0,50	0,50*

^a Der Vergleich wurde drei Mal durchgeführt, ausgehend von unabhängigen Kulturen, die in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose kultiviert wurden. In dieser Tabelle sind die Gene aufgelistet, deren gemitteltetes mRNA-Verhältnis ($\Delta mtrA$ -Mutante/Wildtyp) ≥ 2 oder $\leq 0,5$ war und deren *p*-Wert kleiner 0,05 war.

^b Der Vergleich wurde drei Mal durchgeführt, ausgehend von unabhängigen Kulturen, die in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose kultiviert wurden. Die mit einem „*“ gekennzeichneten Werte haben einen *p*-Wert kleiner 0,05.

4 *In-vitro* Charakterisierung von MtrA+N_{GSH}

In vorherigen Arbeiten wurde bereits versucht, die in der Einleitung beschriebenen Phosphorylierungsreaktionen von Zweikomponentensystemen, also die Autophosphorylierung der Sensorkinase und der Phosphorylgruppentransfer auf den Antwortregulator, für das MtrAB-System zu zeigen. Dabei konnte eine schwache

Autophosphorylierung eines MtrB-Derivats, aber kein Phosphorylgruppentransfer auf das verwendete MtrA-Derivat erreicht werden (Brocker, 2003). Es blieb offen, ob es zu keiner Phosphorylierung des Antwortregulators kam, weil die Sensorkinase nur zu einem sehr geringen Anteil phosphoryliert war, oder ob der C-terminale Histidin-„Tag“ des Antwortregulators die Transphosphorylierung hemmte.

Um dennoch eine Phosphorylierung des Antwortregulators zu erreichen, sollte dieses Mal ein aminoterminal „getaggt“ Derivat des Antwortregulators, dessen „Tag“ mittels einer Protease abgespalten werden kann, in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Außerdem sollte nicht nur versucht werden den Antwortregulator mit Hilfe eines Derivats der zugehörigen Sensorkinase, sondern auch mit Derivaten fremder Sensorkinasen zu phosphorylieren. Dazu sollte ein Derivat der Sensorkinase PhoS aus *C. glutamicum* (von Sarah Schaaf zur Verfügung gestellt) und ein Derivat der Sensorkinase CitA aus *Klebsiella pneumoniae* (Kaspar, 2001) verwendet werden.

4.1 Heterologe Überproduktion, Reinigung und Verdau von MtrA+NHis₆

Für die Überproduktion und Reinigung des Antwortregulators wurde das Plasmid pET28b-MtrA+NHis₆ konstruiert, das ein Derivat von MtrA mit einem aminoterminalen Histidin-„Tag“ kodiert. Dieser „Tag“ erlaubt die Reinigung des Proteins durch Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie. In Brocker, 2003 konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des Plasmids pET16b-MtrA+NHis₁₀ keine sichtbare Überproduktion des MtrA-Derivats möglich war und nur geringste Mengen des Proteins gereinigt werden konnten. Daher wurde das Plasmid pET28b-MtrA+NHis₆ konstruiert. Dafür wurde das bereits vorhandene Plasmid pET16b-MtrA+NHis₁₀ (Brocker, 2003) NdeI/XhoI verdaut, das Insert aus einem Agarosegel gereinigt und mit dem ebenfalls mit NdeI/XhoI geschnittenen pET28b ligiert und in *E. coli* transferiert. In dem daraus resultierenden Plasmid pET28b-MtrA+NHis₆ (vgl. Anhang A3, Abb. 42) steht die Expression des Zielgens unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der nicht von der *E. coli*-RNA-Polymerase, sondern von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Die Sequenzierung der Plasmide von zwei Klonen ergab, dass die klonierten *mtrA*-Fragmente keine Mutationen enthielten. Das von pET28b-MtrA+NHis₆ kodierte Protein MtrA+NHis₆ (246 Aminosäuren, 27,1 kDa) enthält im Vergleich zum Wildtyp-Protein am aminoterminalen Ende 20 zusätzliche Aminosäure-Reste (MGSSHHHHHSSGLVPRGSH) einschließlich einer Thrombin-Schnittstelle (LVPRGS). Das rekombinante Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transferiert, der den lysogenen Phagen λDE3 enthält, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors trägt. Um die Funktionalität des Expressionsplasmids pET28b-MtrA+NHis₆ zu testen und um Zellmasse für die

anschließende Proteinreinigung zu erhalten, wurde der mit diesem Plasmid transformierte *E. coli* BL21(DE3)-Stamm in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD_{600} von circa 1,5 kultiviert, dann die Expression des Zielgens durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, die Kulturen noch weitere 3 h inkubiert und abzentrifugiert. Vor und stündlich nach der IPTG-Zugabe wurden Proben entnommen, die Zellen durch Erhitzen auf 95 °C in SDS-Ladepuffer lysiert und die Gesamtzellextrakte durch SDS-PAGE analysiert. Wie in Abb. 12 A zu erkennen ist, war 1 h nach IPTG-Zugabe eine dominante Bande mit einer apparenten Masse von etwa 27 kDa sichtbar, dessen Anteil am Gesamtprotein in der folgenden Stunde noch zunahm. Diese Bande entspricht höchstwahrscheinlich dem Protein MtrA+NHis₆, das eine berechnete Masse von 27,1 kDa besitzt.

Zur Isolierung des Proteins wurden die geernteten Zellen resuspendiert, mit Hilfe einer French-Press-Zelle aufgeschlossen und die Zellbestandteile mittels zwei aufeinander folgender Zentrifugationsschritte (bei 5500 g und 180000 g) fraktioniert. Die SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Fraktionen ergab, dass der weitaus überwiegende Teil des Proteins wie gewünscht in löslicher Form vorlag (Abb. 12 B). Die lösliche Proteinfraction (UZ-Überstand) wurde auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml gegeben. Die Säule wurden mit 20 Bettvolumen TNI20-Puffer gewaschen und die Proteine mit 6 x 1 ml TNI400-Puffer eluiert. Wie in Abb. 12 B zu erkennen ist, konnte das MtrA+NHis₆-Protein ohne erkennbare Verunreinigungen (bei Coomassie-Färbung) und in großen Mengen isoliert werden. Aus 100 ml Kultur mit einer OD_{600} von 3,9 wurden mehr als 7 mg reines MtrA+NHis₆ isoliert. Um zu verhindern, dass der Histidin-Tag die Aktivität von MtrA in weiterführenden Versuchen beeinträchtigt, wurde dieser mittels Thrombin abgespalten. Thrombin spaltet innerhalb seiner Erkennungsstelle (LVPRGS) zwischen den Aminosäure-Resten Arginin und Glycin, so dass das entstandene MtrA-Derivat nur noch drei (GSH) der zuvor 20 zusätzlichen Aminosäure-Reste enthält. Dieses Protein wird mit MtrA+N_{GSH} bezeichnet und hat ein Molekulargewicht von 25,2 kDa. Der Thrombin-Verdau wurde mittels SDS-PAGE auf Vollständigkeit überprüft und war erfolgreich (vgl. Abb. 12 C).

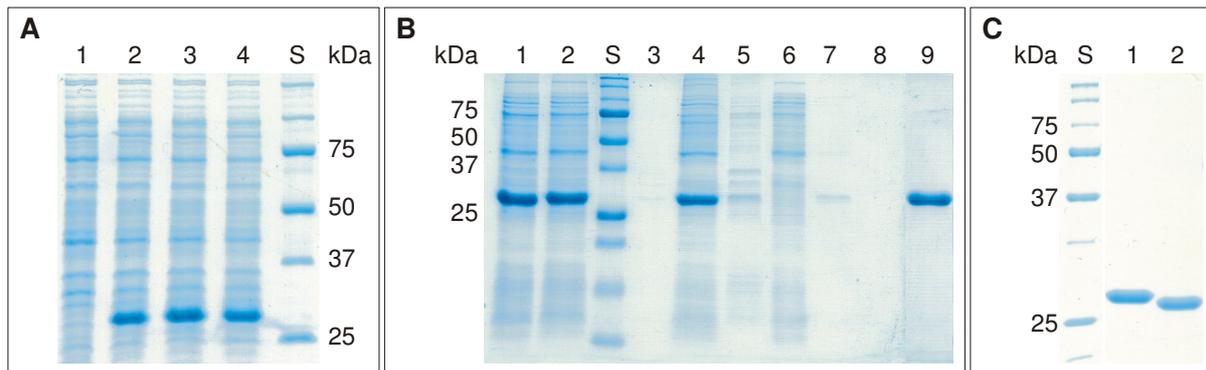


Abb. 12: Analyse von Überproduktion, Reinigung und Thrombin-Verdau von MtrA+NHis₆ durch SDS-PAGE. (A) Überproduktion von MtrA+NHis₆ aus *E. coli* BL21(DE3). 1, Zellen unmittelbar vor Induktion mit 1 mM IPTG; 2, Zellen 1 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; 3, Zellen 2 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; 4, Zellen 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; S, Standard. (B) Reinigung von MtrA+NHis₆ aus *E. coli* BL21(DE3). 1, Proteinrohextrakt nach Zellaufschluss; 2, 5500-g-Überstand; 3, 5500-g-Sediment; 4, Ultrazentrifugations-Überstand; 5, Ultrazentrifugations-Sediment; 6, Durchlauf der Ni²⁺-NTA-Säule nach Beladung mit dem Proteinrohextrakt; 7, Waschfraktion mit TNI20; 8, Durchlauf der Ni²⁺-NTA-Säule nach waschen mit dem Strip-Puffer; 9, Eluat der Ni²⁺-NTA-Säule (TNI400); S, Standard. (C) Thrombin-Verdau von MtrA+NHis₆. 1, MtrA+NHis₆; 2, Thrombin-verdautes MtrA+NHis₆ (MtrA+N_{GSH}); S, Standard.

4.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichts

Um zu überprüfen, ob MtrA in Lösung als Monomer oder Dimer vorliegt, sollte die native Masse von MtrA+N_{GSH} mit Hilfe nativer Gelelektrophorese und Größenausschlusschromatographie bestimmt werden. Dazu wurde MtrA+N_{GSH} zunächst wie oben beschrieben gereinigt und 3 µg des Proteins auf einem 10 %-igen sowie auf einem 15 %-igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt. Die in Abb. 13 dargestellten Gele zeigen, dass MtrA+N_{GSH} auf dem 15-igen Gel (A) eine apparente Masse zwischen 45 kDa und 67 kDa hat, was der Masse eines Dimers entspricht (50,4 kDa), aber auf dem 10 %-igen Gel (B) eine apparente Masse von kleiner 45 kDa hat. Dies entspricht weder der berechneten Masse eines Monomers (27,1 kDa) noch der eines Dimers (54,2 kDa).

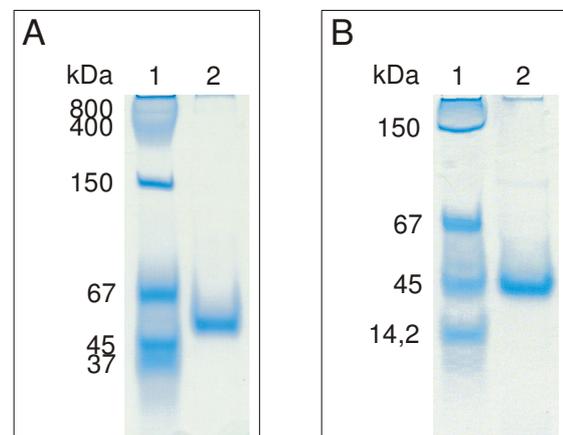


Abb. 13: 10 %-iges (A) bzw. 15 %-iges (B) natives Acrylamidgel. 1, Standard; 2, MtrA+N_{GSH}.

Bei der nativen Gelelektrophorese werden die Proteine nach Masse und Ladung getrennt. Um den Ladungsfaktor auszuschließen, wurde in einem weiteren Experiment eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dazu wurde je 1 ml MtrA-Lösung (2 mg MtrA+N_{GSH}/ml 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl) über eine Superdex 200-Säule (prepgrade; 34 µM Partikelgröße; 16 mm Durchmesser; 60 cm Länge; Bettvolumen 120 ml) mit 1 ml/min Flussrate (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl) aufgetrennt. Die Eichung erfolgte mit Cytochrom c (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Albumin (66 kDa), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa) und β-Amylase (200 kDa). Die Gelfiltration wurde drei Mal durchgeführt und jedes Experiment ergab eine leicht unterschiedliche molekulare Masse für MtrA+N_{GSH}, nämlich 31,3 kDa (Abb. 14), 35,6 kDa und 33,5 kDa. Der Mittelwert von 33,5 kDa liegt zwischen den berechneten Massen für die monomere Form (27,1 kDa) und die dimere Form (54,2 kDa). Wie in der Diskussion dargestellt, resultiert dieses Elutionsverhalten vermutlich aus einer nicht globulären Struktur von MtrA und es wird postuliert, dass MtrA in Lösung als Monomer vorliegt.

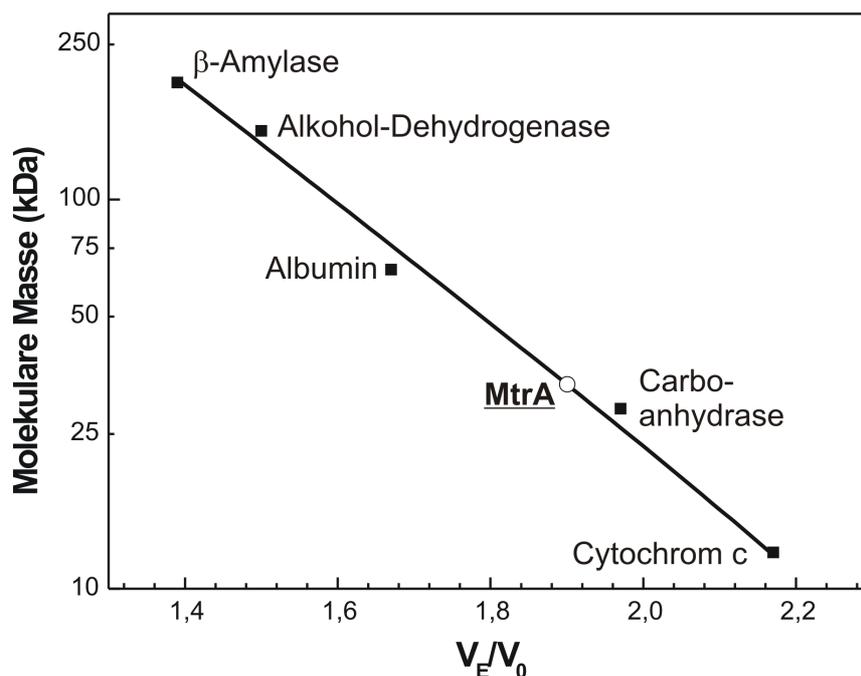


Abb. 14: Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von MtrA. MtrA+N_{GSH} und fünf Standardproteine wurden über eine HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade“-Säule aufgetrennt. Als Elutionspuffer diente 100 mM Tris-HCl pH, 7,5, 50 mM NaCl. V_0 entspricht dem Ausschlussvolumen (44,58 ml) der Säule, das mit Dextranblau (2.000 kDa) bestimmt wurde. V_E entspricht dem Elutionsvolumen der verschiedenen Proteine.

In einem weiteren Experiment wurde die Masse von MtrA+N_{GSH} massenspektrometrisch bestimmt. MtrA+N_{GSH} (3 mg/ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl) wurde zunächst mit Vivaspin-Konzentratoren (Vivascience) entsalzt und 1 µl der entsalzten Proteinlösung wurde mit 1 µl gesättigter Sinapinsäure (*trans*-3,5-Dimethyl-4-hydroxymethylsäure, 98 % *trans*-Form)

in 50 % (v/v) Acetonitril/0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure auf die Probenplatte pipettiert. Die Probe wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) im positiven Linearmodus mit 25 kV Beschleunigungsspannung, 93 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 320 ns analysiert. Als Standard wurde der Standard 3 aus dem Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit (Applied Biosystems), verwendet, der Peptide und Proteine mit Massen zwischen 900 Da und 17 kDa enthält. Abb. 15 zeigt das Massenspektrum von MtrA+N_{GSH}. Darin sind vier Peaks mit den Massen 8,410 kDa, 12,615 kDa, 25,228 kDa und 50,484 kDa zu erkennen. Verglichen mit der molaren Masse eines MtrA+N_{HSG}-Monomers (25,2 kDa) bzw. eines MtrA+N_{GSH}-Dimers (50,4 kDa) und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Proteine nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt werden, könnte der erste Peak z. B. dreifach geladenem MtrA-Monomer, der zweite Peak zweifach geladenem Monomer, der dritte Peak einfach geladenem Monomer oder zweifach geladenem Dimer und der vierte Peak einfach geladenem Dimer zugeordnet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass zumindest ein kleiner Teil von MtrA auch mindestens als Dimer vorliegt.

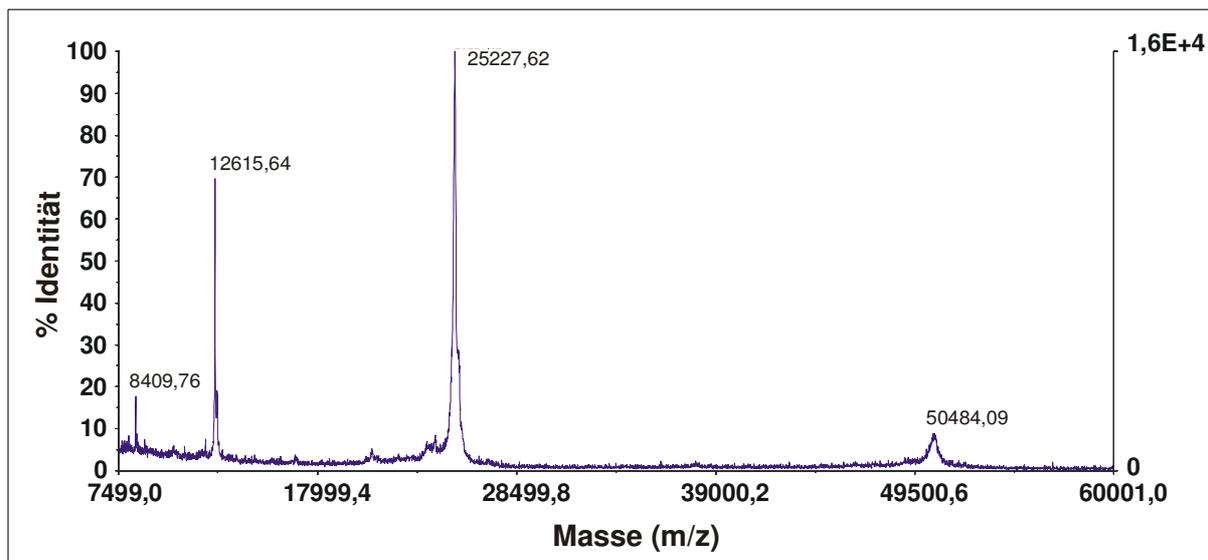


Abb. 15: Massenspektrum von MtrA+N_{GSH}.

4.3 *In-vitro*-Phosphorylierung von MtrA+N_{GSH} durch verschiedene Sensorkinase-Derivate

Die Fähigkeit verschiedener Sensorkinase-Derivate zu autophosphorylieren und die Phosphorylgruppe auf MtrA zu übertragen sollte *in vitro* getestet werden. Dazu wurden drei Derivate verschiedener Sensorkinasen verwendet, nämlich MalE-MtrBK (Brocker, 2003), MalE-PhoSK und MalE-CitAC (Kaspar *et al.*, 1999). Diese Proteine haben gemeinsam, dass

sie Fusionsproteine aus dem Maltosebindeprotein von *E. coli* (ohne dessen Signalpeptid) und der Kinase-Domäne der Sensorkinasen MtrB, PhoS (aus *C. glutamicum*) bzw. CitA (aus *Klebsiella pneumoniae*) sind. Das Zweikomponentensystem bestehend aus der Sensorkinase CitA und dem Antwortregulator CitB ist essentiell für die Expression der Citrat-Verwertungsgene in *K. pneumoniae* (Bott *et al.*, 1995; Kaspar *et al.*, 1999). PhoS zusammen mit dem zugehörigen Antwortregulator PhoR sind in die Phosphatmangel-Antwort von *C. glutamicum* involviert (Kocan *et al.*, 2006). MalE-CitAC (Kaspar *et al.*, 1999) und vergleichbare Fusionsproteine von anderen Kinase-Domänen mit MalE wie z.B. VanS aus *Enterococcus faecium* (Wright *et al.*, 1993), zeigen eine konstitutive Autokinase-Aktivität. Durch Entfernen der Sensordomäne mit den Transmembranhelices wurde zudem die Löslichkeit des Proteins erhöht. Die Fusion mit MalE ermöglicht eine Affinitätsreinigung mittels einer Amylose-Säule.

Wie MalE-CitAC ließ sich MalE-MtrBK hervorragend reinigen, aber im Gegensatz zu MalE-CitAC besaß MalE-MtrBK nur eine sehr schwache Autophosphorylierungsaktivität (Brocker, 2003).

Für die Überproduktion und Reinigung der Sensorkinase-Derivate wurden die Plasmide pMalc-MtrBK (Brocker, 2003) und pMalC-CitAC (Kaspar *et al.*, 1999) in *E. coli* DH5 α transferiert. Das gereinigte Protein MalE-PhoS wurde freundlicherweise von Sarah Schaaf zur Verfügung gestellt. Wie schon in (Brocker, 2003; Kaspar, 2001) gezeigt produzieren die Zellen von *E. coli* DH5 α /pMalc-MtrBK und *E. coli* DH5 α /pMalc-CitAC nach IPTG-Induktion große Mengen von Proteinen mit einer apparenten Masse von ca. 70 bzw. 65 kDa. Diese Massen entsprechen ungefähr den berechneten Massen von MalE-MtrBK (69,2 kDa) und MalE-CitAC (66,8 kDa). Die Überproduktion beider Proteine verlief erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung von MalE-MtrBK und MalE-CitAC erfolgte über Affinitätschromatographie an Amylose-Harz-Säulen mit je 5 ml Bettvolumen. Eine SDS-PAGE-Analyse der mit Maltose eluierten Proteine (Abb. 16) zeigte, dass die Reinigungen erfolgreich waren. Im Fall von MalE-CitAC waren ein paar schwache zusätzliche Banden mit kleinerer apparenter Masse erkennbar, bei denen es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um Abbauprodukte von MalE-CitAC handelt. Insgesamt konnte aus 100 ml Kultur ca. 6 mg MalE-MtrBK und ca. 8 mg MalE-CitAC gereinigt werden.

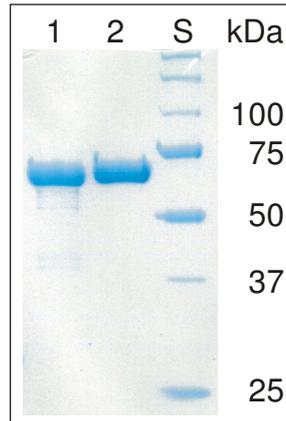


Abb.: 16: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Kontrolle der Reinigung von MalE-CitAC und MalE-MtrBK über Amylose-Affinitätschromatographie. 1, Eluat der Amylose-Säule (MalE-CitAC); 2, Eluat der Amylose-Säule (MalE-MtrBK); S, Standard.

Um die Autokinase-Aktivität von MalE-MtrBK, MalE-PhoSK und MalE-CitAC und den Phosphoryltransfer auf MtrA zu zeigen, wurden je 12 μM Sensorkinase mit 80 μM $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (6,25 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 40 μl inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ gestartet und der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 7 μl Probe entnommen und mit dem gleichen Volumen 2 x SDS-Ladepuffer versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Nach 20 min wurde zu 22,5 μl Reaktionsansatz 22,5 μl einer 24 μM MtrA+N_{GSH}-Lösung hinzugefügt, was zu einer Verdünnung der Sensorkinasen auf 6 μM , des Antwortregulators auf 12 μM und des ATP auf 40 μM führte. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dann je 14 μl Probe entnommen und mit 1/5 Volumen 6 x SDS-Ladepuffer versetzt. Um eine Phosphorylierung des Antwortregulators in Abwesenheit der Sensorkinase-Derivate auszuschließen, wurde auch ein Reaktionsansatz (12 μM MtrA+N_{GSH} in 15 μl) ohne Sensorkinase, aber mit 40 μM $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (vgl. oben) inkubiert und nach 60 min eine 14 μl -Probe entnommen. Ohne vorheriges Aufkochen wurden dann jeweils das gesamte Probevolumen auf ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels für eine Stunde bei 80 °C wurde es 18 h auf einem Phosphorscreen (Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf) exponiert. Die daraus resultierenden Autoradiogramme zeigt Abb. 17. Im Fall von MalE-PhoSK (C, D) und MalE-CitAC (B) ist eine Minute nach ATP-Zugabe schon eine starke Autophosphorylierung der Sensorkinase-Derivate zu erkennen, die innerhalb der nächsten 20 Minuten wieder abnimmt. Im Falle von MalE-MtrBK (A) ist, wie schon in Brocker (2003) gezeigt, nur eine ganz schwache Autophosphorylierung sichtbar, die auch nicht verbessert werden konnte, wenn man die ATP-Konzentration verzehnfachte (Daten nicht gezeigt). 30 Minuten nach Zugabe von MtrA+N_{GSH} (A-C) konnte eine Phosphorylierung des Antwortregulators beobachtet werden, wobei die Phosphorylierung von MtrA+N_{GSH} durch MalE-MtrBK (A) am schwächsten ist, was

vermutlich auf die extrem schwache Autophosphorylierungsaktivität der Sensorkinase zurückzuführen ist. Vergleicht man die Phosphorylierung von PhoR_{NHis10}, dem zu PhoS zugehörigen Antwortregulator (von Sarah Schaaf zur Verfügung gestellt) durch MalE-PhoS (D) mit der von MtrA+N_{GSH} durch MalE-PhoS, so sieht man, dass PhoR wie erwartet stärker phosphoryliert wurde als MtrA. Die Tatsache, dass MtrA+N_{GSH} in Anwesenheit von ATP alleine nicht phosphoryliert wird (E), zeigt, dass die beobachteten Phosphorylierungen von MtrA+N_{GSH} auf die Anwesenheit der entsprechenden Sensorkinase und somit auf Phosphorylgruppentransferreaktionen zurückzuführen sind. Für weitere Experimente wurde MtrA+N_{GSH} durch MalE-PhoS phosphoryliert, da auf diese Weise die stärkste Phosphorylierung von MtrA+N_{GSH} erreicht werden konnte. Die Phosphorylierungsexperimente wurden auch mit MtrA+NHis₆ anstelle von MtrA+N_{GSH} durchgeführt und führten zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Für weiterführende Versuche ist es wichtig zu erwähnen, dass die Phosphorylierungsexperimente zeigen, mit dem Derivat welcher Sensorkinase die beste Phosphorylierung von MtrA erreicht werden konnte, dass sie jedoch keinen Aufschluss darüber geben, welcher Anteil von MtrA insgesamt phosphoryliert wurde.

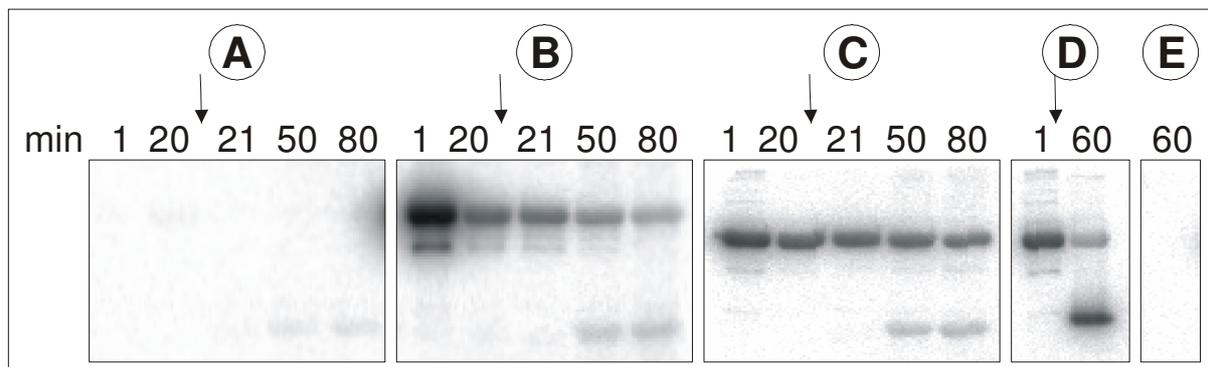


Abb. 17: Autophosphorylierung von MalE-MtrBK (A), MalE-CitAC (B) und MalE-PhoS (C and D) und Phosphorylgruppentransfer auf MtrA+N_{GSH} (A, B and C) bzw. PhoR_{NHis10} (D). 12 μ M Sensorkinase wurde für 20 Minuten (A-C) oder 1 Minute (D) mit ca. 80 μ M γ -[³²P]-ATP (6,25 Ci/mmol) inkubiert, bevor 12 μ M MtrA+N_{GSH} (Endkonzentration) hinzugefügt wurde, was zu einer 1:1 –Verdünnung der Sensorkinase und des ATP führte. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 60 Minuten bei RT inkubiert. E, 12 μ M MtrA wurde mit 40 μ M γ -[³²P]-ATP (vgl. oben) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden vor Zugabe des Antwortregulators 7- μ l-Aliquots und nach Zugabe des Antwortregulators 14- μ l-Aliquots entnommen. Der Pfeil gibt an, wann der Antwortregulator zum Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proben wurden nach Entnahme sofort mit SDS-Ladepuffer versetzt, auf Eis aufbewahrt und dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die getrockneten Gele wurden mit einem Phosphorimager analysiert.

5 DNA-Protein-Interaktionsstudien mit MtrA

Die oben beschriebenen Transkriptomvergleiche geben an, welche Gene durch die Deletion der *mtrAB*-Gene bzw. des *mtrA*-Gens in ihrer Expression beeinflusst werden, sie erlauben aber keine Unterscheidung zwischen Genen, die direkt oder indirekt durch MtrA kontrolliert werden. Um die direkten Zielgene des Antwortregulators MtrA zu identifizieren, wurden ChIP-to-chip-Analysen als ein globaler Ansatz und DNA-Affinitätsreinigungen sowie Bandshift-Experimente mit spezifischen Promotorregionen als lokaler Ansatz durchgeführt. Anhand der direkten Zielgene sollte dann die Bindestelle von MtrA in den entsprechenden Promotorregionen identifiziert werden, um mit einem daraus abgeleiteten Konsensusmotiv nach weiteren Zielgenen im Genom suchen zu können.

5.1 ChIP-to-chip-Experimente

Bei den ChIP-to-chip-Experimenten wird MtrA *in vivo* mittels Formaldehyd mit seinen DNA-Bindungsstellen kovalent verbunden und dann mit anti-MtrA-Antikörpern immunopräzipitiert. Die co-präzipitierte DNA wird aufgereinigt, amplifiziert, mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden markiert und auf einen *C. glutamicum* Genomchip hybridisiert. Zwei Variationen dieses Experiments wurden je drei Mal ausgehend von separaten Kulturen durchgeführt. In Variante A wurde DNA, die aus Wildtyp-Zellen co-präzipitiert worden war mit DNA aus $\Delta mtrA$ -Zellen kompetitiv hybridisiert. In Variante B wurde DNA, die aus Wildtyp-Zellen mit anti-MtrA-Antikörpern isoliert worden war, verglichen mit DNA, die aus Wildtyp-Zellen in einer Kontrollpräzipitation ohne Anti-MtrA-Antikörper isoliert worden war. Die Ergebnisse der drei Wiederholungen von einem Typ Experiment wurden jeweils gemittelt. Insgesamt waren die daraus resultierenden Anreicherungsfaktoren sehr niedrig und nur drei Genomregionen waren mehr als zweifach in beiden Experiment-Typen angereichert (Tab. 6), nämlich *nlpC*, die Region um *NCgl0102* und *NCgl0103* und die Region zwischen den divergent organisierten Genen *nrdH* und *nadE*. Die Gene *NCgl0102* und *NCgl0103* kodieren kleine Membranproteine (13,3 kDa und 9,0 kDa) mit unbekannter Funktion, *nrdH* kodiert ein Glutaredoxin-ähnliches Protein, das in den Elektronentransport zur Ribonukleotidreduktase (das entsprechende Gen *NCgl2443* ist in unmittelbarer Nähe lokalisiert) involviert sein könnte und *nadE* kodiert eine NAD⁺-Synthetase. In den vergleichenden Transkriptomstudien zeigte von diesen Genen nur *nlpC* einen mehr als zweifach erhöhten mRNA-Level in den Mutanten $\Delta mtrAB$ und $\Delta mtrA$, was darauf hindeutet, dass die Transkription von *nlpC* durch MtrA inhibiert wird. Das mRNA-Verhältnis $\Delta mtrAB$ /Wildtyp bzw. $\Delta mtrA$ /Wildtyp der Gene *NCgl0102*, *NCgl0103*, *nrdH* und *nadE* lag zwischen 0,5 und 1,5. Der Einfluss von MtrA auf die Expression dieser Gene bleibt daher unklar. Viele Gene, die einen veränderten mRNA-

Level in den Transkriptomstudien zeigten, hatten in den ChIP-to-chip-Experimenten einen Anreicherungsfaktor zwischen 1,0 und 1,7 (Tab. 6).

Tab. 6: Ergebnisse der ChIP-to-chip-Experimente. DNA, die aus Wildtyp-Zellen co-präzipitiert worden war wurde mit DNA aus $\Delta mtrA$ -Zellen kompetitiv hybridisiert bzw. DNA, die aus Wildtyp-Zellen mit anti-MtrA-Antikörpern isoliert worden war wurde mit DNA verglichen, die aus Wildtyp-Zellen in einer Kontrollpräzipitation ohne Anti-MtrA-Antikörper isoliert worden war.^a

NCgl -Nr.	Gen	(Mögliche) Funktion des Genprodukts	Anreicherungsfaktor ^b	
			Wt/ $\Delta mtrA$	Wt ⁺ /Wt ⁻
a)				
NCgl2445	<i>nrdH</i>	Glutaredoxin ähnliches Protein	3,7*	3,0*
NCgl2446	<i>nadE</i>	NAD ⁺ -Synthetase	3,7*	3,0*
NCgl2108	<i>nlpC</i>	Put. Zellwand-Peptidase	3,2*	3,4*
NCgl0102		Membranprotein unbekannter Funktion	2,3*	2,2*
NCgl0103		Membranprotein unbekannter Funktion	2,3*	2,2*
b)				
NCgl2411	<i>mepA</i>	Put. sekretierte Metalloendopeptidase	1,5	1,5
NCgl2961	<i>proP</i>	Prolin/Ectoin-Aufnahmetransporter	1,0	1,0
NCgl0856	<i>betP</i>	Betain-Aufnahmetransporter	1,1*	1,3*
NCgl0226	<i>csbD</i>	Put. Stressantwort-Protein	1,7*	1,5
NCgl1837		Membranprotein	1,2*	1,1
NCgl2251	<i>lcoP</i>	Betain/Ectoin-Aufnahmetransporter	1,4*	1,1
NCgl0843	<i>mscL</i>	Mechanosensitiver Kanal	1,3*	1,3

^a Die Vergleiche wurden je drei Mal ausgehend von unabhängigen Kulturen, die in CGXII-Minimalmedium mit 2 % (w/v) Glucose kultiviert worden waren, durchgeführt. In a) sind die Gene aufgelistet, deren gemittelter Anreicherungsfaktor in beiden Experiment-Typen ≥ 2 war und deren *p*-Wert kleiner 0,05 war. In b) sind die Gene aufgelistet, die in den Transkriptomvergleichen $\Delta mtrAB$ vs. Wildtyp und $\Delta mtrA$ vs. Wildtyp einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Level zeigten, sowie *lcoP* und *mscL*, die beide an der Osmostressantwort beteiligt sind und in der $\Delta mtrAB$ -Mutante einen veränderten mRNA-Level aufwiesen.

^b Werte, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, haben einen *p*-Wert <0,05.

5.2 Affinitätsreinigungen

Während die ChIP-to-chip-Ergebnisse darauf hindeuten, das *nlpC* und evtl. einige weitere Gene direkte Zielgene von MtrA sind, bleibt offen, ob andere mögliche Zielgene, wie z.B. *mepA*, *betP* und *proP* auch direkt durch MtrA kontrolliert werden. Um dieser Frage nachzugehen wurde eine alternative Methode zum Nachweis von DNA-Protein-Interaktion durchgeführt, nämlich DNA-Affinitätschromatographie. Dazu wurden die Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP*, *nrdH-nadE*, *NCgl0102/0103* und der Negativkontrollen *icd*,

odhA, *sucCD* und *sdhCAB* mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotin markiert (vgl. Tab. 7). *icd* kodiert für die Isocitrat-Dehydrogenase, *odhA* für die E1-Untereinheit der 2-Oxoglutaratdehydrogenase, *sucCD* für die Succinyl-CoA-Synthetase und *sdhCAB* für die Succinatdehydrogenase. Die markierten PCR-Produkte wurden an magnetische „Beads“ gekoppelt, die mit Streptavidin beschichtet waren und dann mit Proteinrohextrakt aus *C. glutamicum*-Zellen inkubiert. Nachdem die nicht oder nur schwach gebundenen Proteine durch Waschen mit TGED-Puffer entfernt worden waren, wurden die stark gebundenen Proteine mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration (TGED-Puffer mit 2 M NaCl) eluiert, gefällt, in TE-Puffer, pH 8,0 gelöst und je zur Hälfte auf zwei SDS-Gelen aufgetrennt. Ein SDS-Gel wurde silbergefärbt, um dann dominante Proteinbanden aus dem Gel zu eluieren und mittels Peptidmassen-„fingerprints“ zu identifizieren. Das zweite SDS-Gel wurde geblottet und mittels Western-Blot mit affinitätsgereinigten polyklonalen anti-MtrA-Antikörpern analysiert. Der Proteinrohextrakt für die DNA-Affinitätschromatographie wurde von Zellen präpariert, die unter drei verschiedenen Bedingungen kultiviert worden waren. In Bedingung A) wurden die Zellen in Schüttelkolben bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 6-8 kultiviert, in Bedingung B) wurden die Zellen in einem 7,5-l-Fermenter bis zu einer OD₆₀₀ ca. 6 kultiviert und in Bedingung C) wurden die Zellen in einem 30-l-Fermenter mit Glucosezufütterung bis zu einer OD₆₀₀ von 121 angezüchtet. Die Zellen aus Bedingung C, die in großer Menge zur Verfügung standen, wurden verwendet, um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob der experimentelle Ansatz funktioniert. Die Bedingung B wurde gewählt, weil es so möglich war schnell große Mengen an Zellen zu gewinnen, die unter ähnlichen, aber nicht identischen Bedingungen kultiviert worden waren wie die Zellen für die vorangegangenen ChIP-to-chip- und Transkriptomchip-Experimente. Die Zellen aus Bedingung A wurden genauso kultiviert wie die Zellen für die ChIP-to-chip- und die Transkriptomchip-Experimente. Als Beispiel zeigt Abb. 18 die silber-gefärbten Polyacrylamidgele, die zur Auftrennung der Hochsalz-Eluate ausgehend von Zellen aus Schüttelkolben verwendet wurden. Eine Reihe verschiedener Transkriptionsregulatoren konnte mit den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP*, *nrdH-nadE* und *NCgl0103/0102* eluiert und anhand ihres Peptidmassen-„fingerprints“ identifiziert werden. MtrA konnte in den Elutaten der Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *proP* und *nrdH-nadE*, nicht aber in den Elutaten von *betP*, *NCgl0103/0102* und allen Negativkontrollen (nicht gezeigt) identifiziert werden. Die Gele, die mittels Western-Blot-Analysen auf die Anwesenheit von MtrA analysiert wurden (Abb. 19), zeigten, dass MtrA nicht nur in den Elutaten mit den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *proP* und *nrdH-nadE* vorhanden war, sondern auch in dem Eluat mit der Promotorregion von *betP*. In den Hochsalz-Elutaten der Promotorregion von *NCgl0102/0103* und allen Negativkontrollen war MtrA auch mittels Western-Blot-Analyse nicht nachweisbar. Da *betP* und *proP* in der $\Delta mtrAB$ und $\Delta mtrA$ -Mutante einen erniedrigten mRNA-Level aufwiesen, scheint deren Transkription

durch MtrA aktiviert zu werden, wohingegen *mepA* und *nlpC* einen erhöhten mRNA-Level in den Mutanten aufwiesen und die Transkription dieser Gene vermutlich durch MtrA inhibiert wird. Bei den silbergefärbten Gelen fiel auf, dass mit den Promotorregionen von *nlpC* und *mepA* wesentlich größere Mengen an MtrA angereichert wurden als mit den Promotorregionen von *betP* und *proP*. Dies deutet auf eine höhere Affinität von MtrA zu den reprimierten Genen hin.

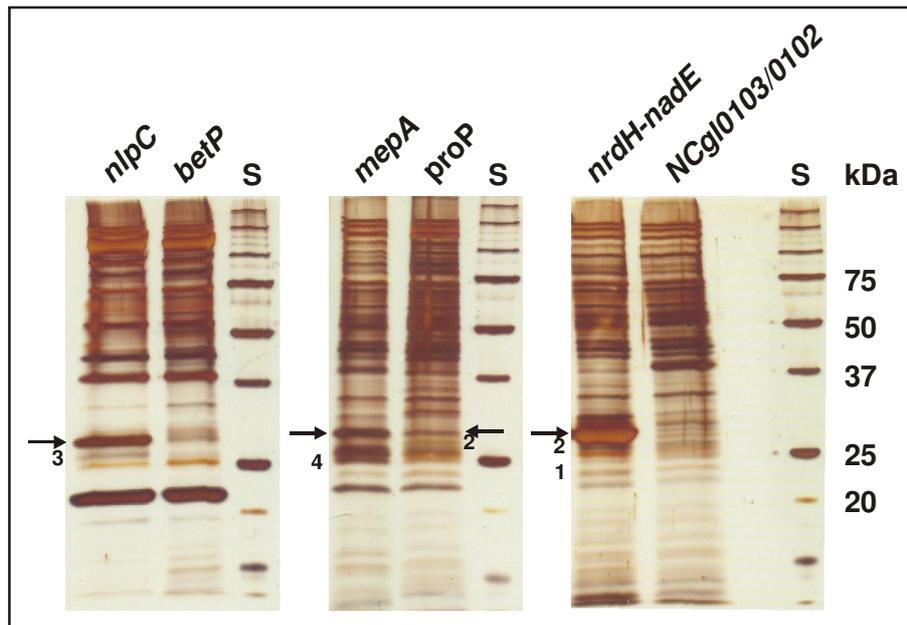


Abb. 18: Silbergefärbte 15 %ige SDS-Gele der Hochsalz-Eluate aus den DNA-Affinitätsreinigungen mit den Promotorregionen von *nlpC*, *betP*, *mepA*, *proP*, *nrdH-nadE* und *NCgl0103/0102*. Der Proteinrohextrakt für die Affinitätschromatographie wurde von Zellen gewonnen, die in Schüttelkolben bis zu einer OD_{600} von ca. 5-6 kultiviert worden waren. S, Standard; die Zahlen 1-4 stehen an Proteinbanden, die aufgrund des Peptidmassen-„fingerprints“ identifiziert wurden: 1, NCgl1388; 2, NCgl1855; 3, NCgl1650; 4, NCgl2440; die Pfeile zeigen Proteinbanden, die aufgrund des Peptidmassen-„fingerprints“ als MtrA identifiziert wurden.

Tab. 7: PCR-Fragmente, die für Affinitätschromatographie verwendet wurden

Gen	Position des PCR-Fragments in Bezug auf den Translationsstart	Länge des PCR-Fragments
<i>mepA</i>	-511 bis +59	570 bp
<i>nlpC</i>	-496 bis +52	548 bp
<i>betP</i>	-378 bis +54	432 bp
<i>proP</i>	-506 bis +59	565 bp
<i>NCgl0102</i>	-155 bis +420	575 bp
<i>nrdH</i>	-500 bis +50	550 bp
<i>icd</i>	-229 bis +135	364 bp
<i>odhA</i>	-389 bis +127	516 bp

Gen	Position des PCR-Fragments in Bezug auf den Translationsstart	Länge des PCR-Fragments
<i>sucC</i>	-426 bis +168	594 bp
<i>sdhC</i>	-446 bis +155	601 bp

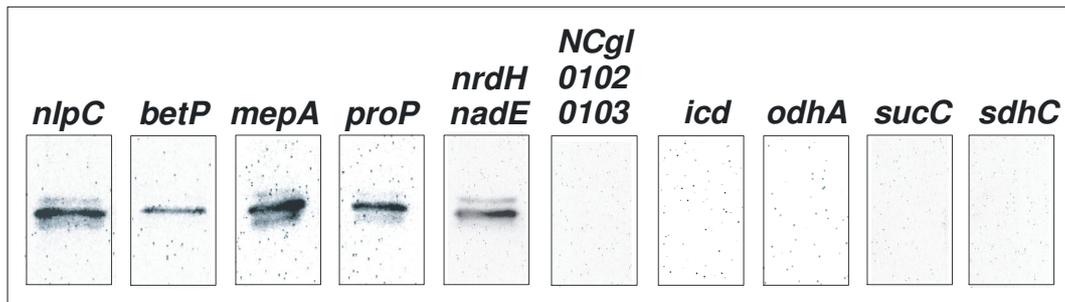


Abb. 19: Western-Blot-Analyse mit affinitäts-gereinigten anti-MtrA-Antikörpern und den Hochsalz-Eluaten der DNA-Affinitätsreinigungen mit den Promotorregionen *nlpC*, *betP*, *mepA*, *proP*, *nrdH-nadE*, *NCgl0102/0103*, *icd*, *odhA*, *sucC* und *sdhC*.

Tab. 8.: Transkriptionsregulatoren, die durch die DNA-Affinitätschromatographie mit den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP*, *nrdH-nadE* oder *NCgl0103/0102* angereichert und identifiziert wurden. *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen wurden entweder in Schüttelkolben bis zu einer OD₆₀₀ von 5-6 (a) oder in einem 5-l-Fermenter bis zu einer OD₆₀₀ von 5-6 (b), oder in einem 30-l-Fermenter bis zu einer OD₆₀₀ von 121 (c) kultiviert. Für Details siehe Material und Methoden^a.

NCgl - Nr.	Cg- Nr.	Annotierte Funktion	P _{mepA}	P _{nlpC}	P _{betP}	P _{proP}	P _{nrdH-nadE}	P _{NCgl0103/0102}
0721	0862	MtrA	a*, b, c	a*, b, c	a, b, c	a*, b	a*, c	
0110	0146	DeoR-Typ				b		
0154	0196	GntR-Typ				b		
0839	0996	CgtR2				b		
1388	1633	MerR-Typ					a*, c	
1650	1935	GntR-Typ	b	a*		b		
1850	2109	OxyR				b		
1855	2114	LexA			b	a*, b	a*, c	
2199	2500	ArsR-Typ					c	
2440	2783	GntR-Typ	a*, b, c			b		
2886	3315	MarR-Typ			c	b, c	c	

^a die mit einem „*“ gekennzeichneten Transkriptionsregulatoren sind in Abb. 18 gekennzeichnet.

5.3 Gelretardationsexperimente

Durch die DNA-Microarray-Analysen, die ChIP-to-chip-Experimente und die DNA-Affinitätsreinigungen wurde eine Reihe von Genen identifiziert, deren Expression direkt oder indirekt durch das Zweikomponentensystem MtrAB reguliert wird. Mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten sollte nun die MtrA-Bindestelle in den relevanten Promotorregionen lokalisiert und die relative Lage dieser Bindestellen zum Transkriptionsstart betrachtet werden. Anhand der identifizierten Bindestellen sollte ein Konsensusmotiv abgeleitet und mit dessen Hilfe im Genom von *C. glutamicum* nach weiteren Bindestellen und somit nach weiteren Zielgenen gesucht werden. Die Promotorregionen dieser potentiellen Zielgene und weiterer Gene, die in den Transkriptomanalysen einen veränderten mRNA-Level aufwiesen, sowie die Promotorregion von *dnaA*, einem direkten Zielgen des Antwortregulators MtrA aus *M. tuberculosis* sollten in Bandshift-Experimenten eingesetzt werden, um eine mögliche Bindung nachzuweisen und damit weitere direkte Zielgene zu identifizieren. Außerdem sollte die Affinität von unphosphoryliertem und phosphoryliertem MtrA zu verschiedenen Promotorregionen miteinander verglichen werden.

5.3.1 Identifizierungen von MtrA-Bindestellen und Herleitung eines Konsensusmotivs

Bisher konnte gezeigt werden, dass mindestens vier Gene direkt durch MtrA reguliert werden, nämlich die zwei durch MtrA aktivierten Gene *betP* und *proP*, die sekundäre Transporter für kompatible Solute kodieren, und die zwei durch MtrA reprimierten Gene *mepA* und *nlpC*, die beide vermutlich Zellwandpeptidasen kodieren. Diese entgegengesetzte Regulation durch MtrA könnte mit einer unterschiedlichen Lage der MtrA-Bindestellen bzgl. der Transkriptionsstartpunkte korrelieren. Im Falle von *mepA*, *betP* und *proP* wurden die Transkriptionsstartpunkte bereits bestimmt (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004), aber der Transkriptionsstart von *nlpC* war noch unbekannt. Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes von *nlpC* wurden zum einen „Primer-Extension“- und zum anderen 5'-RACE-Experimente durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen und die Isolierung der RNA erfolgte wie bei den DNA-Microarray-Experimenten: Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 5 – 6 aus 20 ml einer *C. glutamicum* Δ *mtrA*-Kultur geerntet wurden. Die „Primer-Extension“-Experimente wurden mit den Oligonukleotiden PE_nlpC_1 und PE_nlpC_2 durchgeführt (vgl. Tab. 1), mit deren Hilfe der Transkriptionsstartpunkt 244 bp stromaufwärts des GTG-Startkodons von *nlpC* identifiziert werden konnte (Abb. 20). Die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes mit Hilfe der 5'-RACE-Methode ergab einen um 2 bp in Richtung des *nlpC*-Gens verschobenen

Startpunkt, der ebenfalls in Abb. 20 gekennzeichnet ist. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf den mittels Primer-Extension identifizierten Transkriptionsstartpunkt, da bei dieser Methode das längere Transkript erhalten wurde. Die mögliche -35-Region im Promotor von *nlpC* (TAGACA) deckt sich gut mit dem Konsensus aus *C. glutamicum* (ttGcca), wohingegen die -10-Region (TAACCT) stark von dem Konsensusmotiv aus *C. glutamicum* (TA(c/t)aaT) abweicht (Patek *et al.*, 2003).

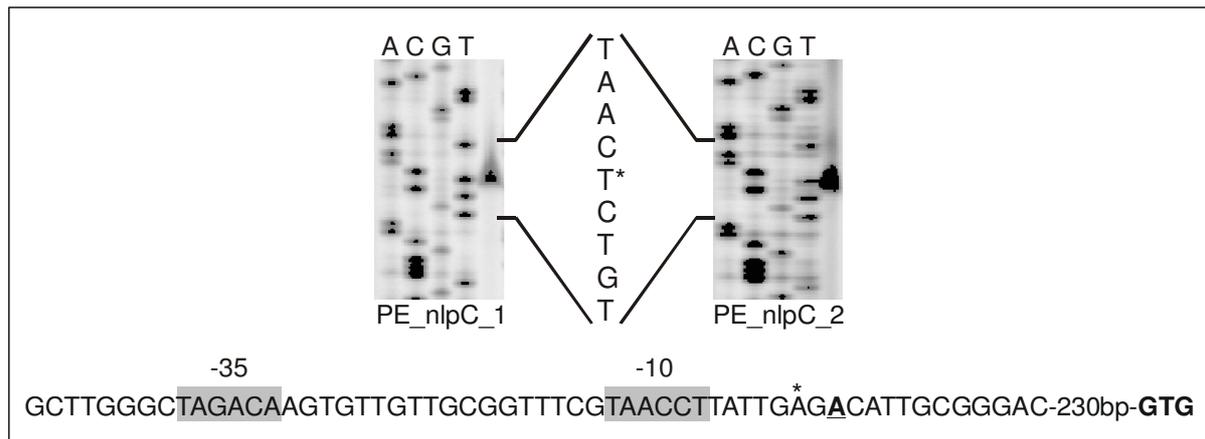


Abb. 20: „Primer-Extension“-Analyse der *C. glutamicum nlpC*-mRNA. 10 µg Gesamt-RNA, isoliert aus *C. glutamicum* 13032 $\Delta mtrA$, wurde einer „Primer-Extension“-Analyse mit den Oligonukleotiden PE_nlpC_1 und PE_nlpC_2 unterworfen. Die Sequenzierungsreaktionen mit den entsprechenden Primern erlauben eine basengenaue Bestimmung des 3'-Endes des „Primer-Extension“-Produkts und damit i.d.R. des Transkriptionsstarts. Die unten dargestellte Sequenz gibt den Abstand des identifizierten Transkriptionsstartpunkts vom GTG-Startcodon von *nlpC* an. Dabei ist der mit Hilfe der „Primer-Extension“-Methode identifizierte Transkriptionsstart mit * gekennzeichnet und der mit Hilfe der 5'-RACE-Methode identifizierte Transkriptionsstart unterstrichen. Die -10-Region und die -35-Region sind grau hinterlegt.

Um die MtrA-Bindestellen in den Promotorregionen von *nlpC*, *mepA*, *betP* und *proP* zu identifizieren, wurden Bandshiftassays mit MtrA+N_{GSH} und verschiedenen DNA-Fragmenten durchgeführt. Zunächst wurden die intergenischen Regionen dieser Gene mit zwei verschiedenen MtrA+N_{GSH}-Konzentrationen inkubiert und mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt (Fragmente 1 in Abb. 21 A-D). Wie in Abb. 21 zu erkennen, liegen diese vier DNA-Fragmente bei einem 75-fachen molaren Proteinüberschuss vollständig als DNA-MtrA-Komplex vor. Um nun die Bindestellen weiter einzugrenzen, wurde anschließend die Bindung von MtrA an Subfragmente dieser Promotorregionen (Fragmente 2-8 in Abb. 21 A-D) getestet. Welche Subfragmente eingesetzt wurden und die Ergebnisse der zugehörigen Gelretardationsexperimente zeigt Abb. 21 A-D. Es ist zu erkennen, dass im Falle von *nlpC* eine MtrA-Bindestelle von -69 bp bis -44 bp sowie von -41 bp bis +25 bp, im Falle von *mepA* in der Region von -62 bis +31, im Falle von *proP* von -133 bis -54 und im Falle von *betP* von -177 bis -91 bzgl. der entsprechenden Transkriptionsstartpunkte lokalisiert sein muss.

Da in Abb. 22 D auch Fragment 3 von MtrA gebunden wird, scheint in der Promotorregion von *betP* eine zweite Bindestelle lokalisiert zu sein. Zu dieser Bindestelle scheint MtrA jedoch eine deutlich schwächere Affinität zu haben (Fragment 3 in Abb. 21 D).

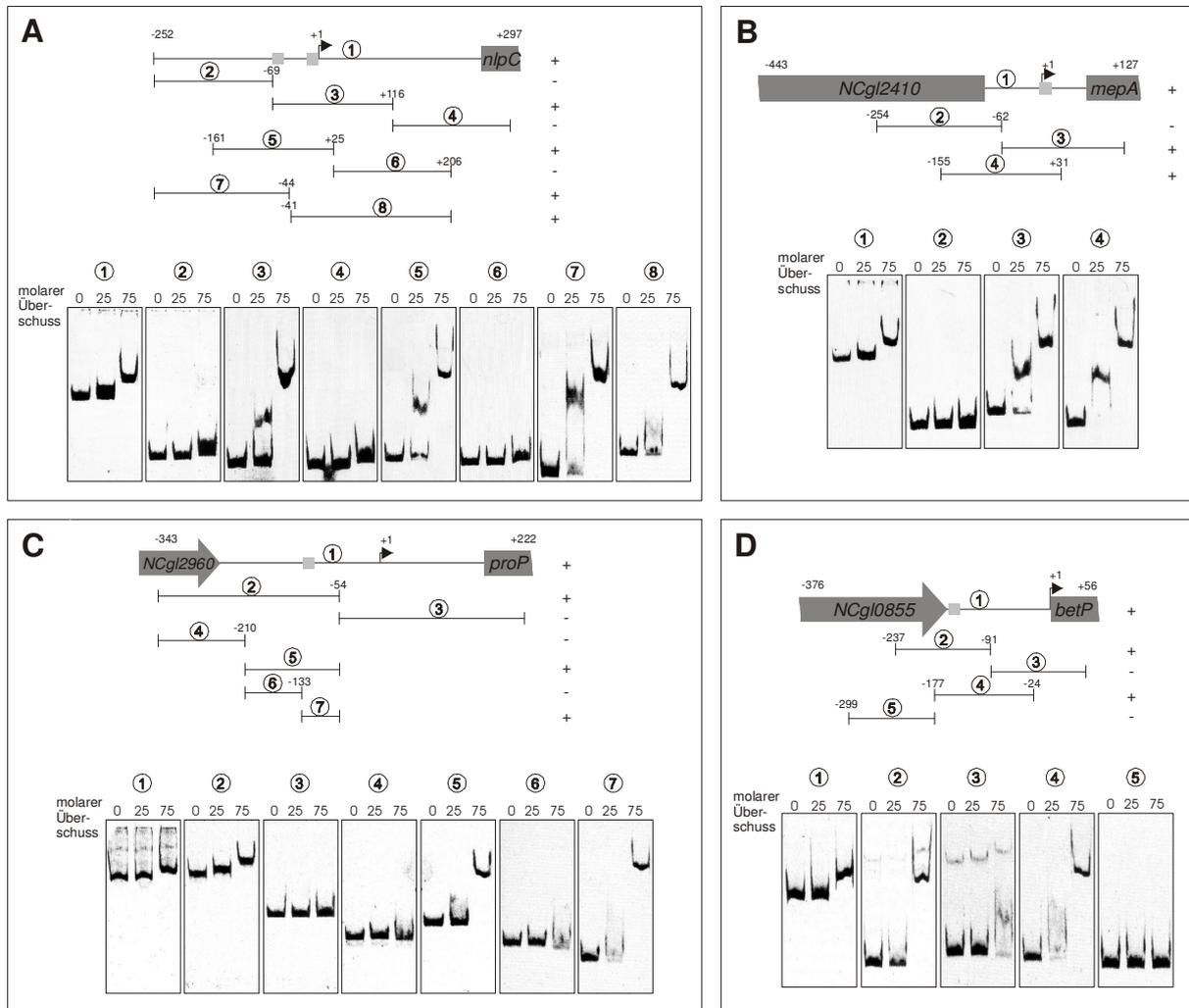


Abb. 21: Bindung von MtrA an die Promotorregionen von *nlpC* (A), *mepA* (B), *proP* (C) und *betP* (D). Im oberen Teil von A-D sind die DNA-Fragmente (umkreiste Nummern), die zur Untersuchung der MtrA-Bindung mittels Gelretardation verwendet wurden, dargestellt. Die Nummern an den Fragmenten geben die Enden der Fragmente bzgl. des Transkriptionsstarts (+1) an. Oligonukleotide, die für die Amplifikation der Fragmente mittels PCR verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die hellgrauen Boxen repräsentieren die im weiteren Verlauf der Arbeit identifizierten Bindestellen (vgl. Abb. 22 und Abb. 23). Rechts der DNA-Fragmente ist angegeben, ob das Fragment geshiftet wurde (+) oder nicht (-). Die Gele im unteren Teil der Boxen zeigen die Bindung von MtrA (25- und 75-facher molarer Überschuss) zu je 100 ng Fragment (80 – 565 bp, Endkonzentration 13 – 93 nM). Das 20- μ l-DNA-Protein-Gemisch wurde 30 min bei RT inkubiert, bevor es mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (15 %) aufgetrennt und mit SybrGreen I gefärbt wurde.

Um ein MtrA-Konsensus-Bindemotiv zu identifizieren, wurden zunächst die fünf zuvor als Bindestellen-enhaltenen-DNA-Bereiche mit der MEME-Software (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) analysiert. Dabei wurde dem Programm vorgegeben, dass in jedem Fragment exakt eine Bindestelle lokalisiert sein soll und, dass die

Bindestellen aus mindestens acht Basen bestehen sollen. Mehrere mögliche Motive wurden mit diesen Einstellungen vorgeschlagen wobei ich mich in den weiteren Arbeiten auf das mit dem höchsten Score beschränkt habe.

Die Bedeutung dieses Motivs für die DNA-Bindung wurde durch Mutationsanalysen überprüft. Dabei wurden in jedem der vorgeschlagenen Bindemotive je zwei bis vier Basenaustausche gleichzeitig mittels PCR eingeführt und diese Fragmente in Bandshift-Experimente eingesetzt. Zur Amplifikation der Fragmente wurde jeweils einer der beiden Primer so gewählt, dass er mit der putativen Bindestelle und einigen Basen stromauf- und stromabwärts davon hybridisierte. Die Bindestellen hatten dabei mindestens drei Basen Abstand zum 5`-Ende des entsprechenden Primers, so dass die Bindestellen nicht ganz am Rand der Fragmente lokalisiert waren. Mit Hilfe dieser Primer konnten dann an verschiedenen Positionen in und außerhalb der Bindestellen Mutationen eingeführt werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 22 zusammengefasst. Sie zeigen, dass Mutationen in den vorhergesagten Bindestellen die Bindung von MtrA hemmen oder vermindern, wohingegen Mutationen außerhalb dieser Sequenzen keinen Einfluss auf die MtrA-Bindung haben. Bei der vorhergesagten Bindestelle *nlpC2* ergab die Mutationsanalyse, dass die Mitte der tatsächliche Bindestelle um 6 Basen gegenüber der vorgeschlagenen verschoben ist. Die Bindestelle stromaufwärts von *mepA* und eine Bindestelle stromaufwärts von *nlpC* überlappen mit der -10-Region (Abb. 23). Diese Position der Bindestellen passt zu der Tatsache, dass MtrA als Repressor dieser Gene fungiert. Im Falle der durch MtrA aktivierten Gene *betP* und *proP* liegen die Bindestellen mehr als 100 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartpunkte (-147,5 bp bzw. -112,5 bp).

Mit Hilfe der fünf experimentell verifizierten Bindestellen konnte ein erstes Konsensusmotiv (VRTHASRDHDHSRMMCR) abgeleitet werden (Abb. 23), das für die Bindung von MtrA wichtig zu sein scheint.

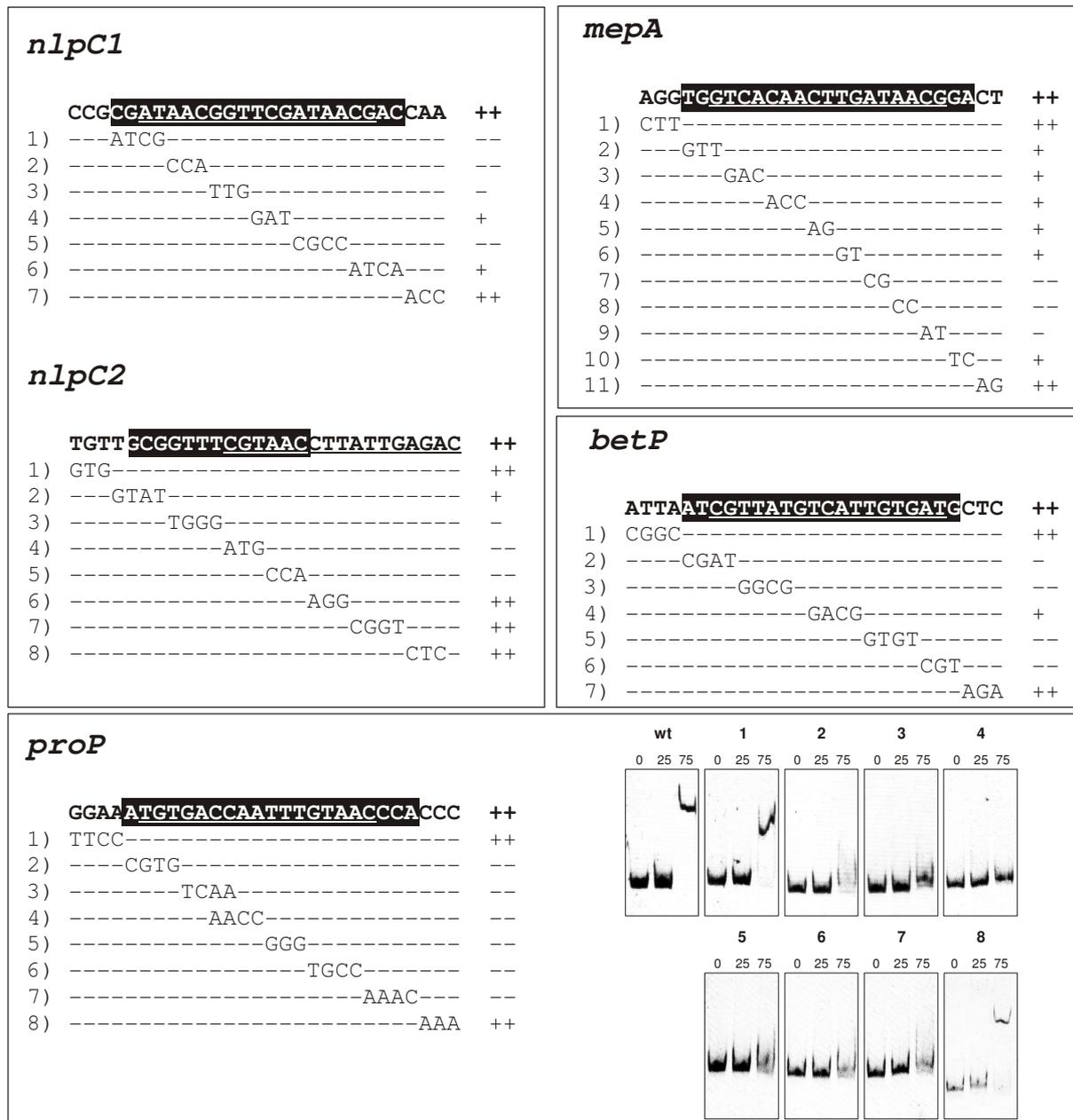


Abb. 22: Mutationsanalysen von möglichen MtrA-Bindestellen in verschiedenen Promotorregionen. Mutationen innerhalb und außerhalb der von MEME vorgeschlagenen putativen MtrA-Bindestellen in den Promotorregionen von *nlpC* (A), *mepA* (B), *betP* (C) und *proP* (D) sind unterhalb der Wildtyp-Sequenzen aufgelistet. Fragmente, die diese Mutationen enthalten, wurden mit den Primerpaaren *nlpC1_M_fw/ nlpC1_Mx_rv*, *mepA_M_rv/ mepA_Mx_fw*, *proP_M_rv/ proP_Mx_fw* und *betP_M_fw/ betP_Mx_rv* (vgl.Tab. 1) amplifiziert. Rechts ist angezeigt, ob ein Fragment wie das Wildtyp-Fragment (++) ,etwas schlechter (+), kaum (-) oder gar nicht (--) „geschiftet“ wurde. Die unterstrichene Sequenz gibt die potentielle Bindestelle an, die in weiß auf schwarzem Hintergrund Basen sind für die MtrA-Bindung wichtig. Im Falle von *proP* sind auch die Ergebnisse der zugehörigen Bandshift-Experimente gezeigt. Die Gele zeigen die Bindung von MtrA (25- und 75-facher molarer Überschuss) zu je 100 ng Fragment (157 bp, Endkonzentration 48 nM). Das 20- μ l-DNA-Protein-Gemisch wurde 30 min bei RT inkubiert, bevor es mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (15 %) aufgetrennt und mit SybrGreen I gefärbt wurde.

Gen	Sequenz der MtrA-Bindestelle	Position	Orientierung
<i>nlpC-1</i>	GC GATAACGGTT CGATAACG AC	-64,5	+
<i>nlpC-2</i>	TC AATAAGGT TACGAA ACCG CA	-10,5	-
<i>mepA</i>	GT GGTCACA ACTT GATAACG GA	-3,5	+
<i>proP</i>	TG GGTTACA AATT GGTCACA TT	-112,5	-
<i>betP</i>	AG CATCACA ATGAC ATAACG AT	-147,5	-
Konsensus	VRTHASRDHDHSRWMMCR		

Abb. 23: Identifizierte MtrA-Bindestellen und Herleitung eines Konsensusmotivs. Die fünf in dieser Arbeit identifizierten MtrA-Bindestellen wurden „aligned“. Die Position der Mitte der Bindestellen bzgl. der Transkriptionsstartpunkte ist durch die Nummer in der „Position“-Spalte und die Orientierung der Bindestellen durch ein Plus- bzw. Minuszeichen angegeben. Schwarz hinterlegte Basen kommen in mindestens drei der fünf MtrA-Bindestellen vor. Die ersten und die letzten zwei Basen sind vermutlich nicht wichtig für die Bindung. Die Basen, die die MtrA-Bindung stören, sind in Abb. 22 gezeigt. V, Adenin, Cytosin oder Guanin; R, Adenin oder Guanin; H, Adenin, Cytosin oder Thymin; S, Cytosin oder Guanin; D, Adenin, Guanin oder Thymin; W, Adenin oder Thymin; M Adenin oder Cytosin.

5.3.2 Vergleich der Affinität von unphosphoryliertem und phosphoryliertem MtrA+N_{GSH} zu verschiedenen Promotorregionen

Um zu untersuchen, ob MtrA unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Bindungsstellen besitzt, wurden Gelretardationsexperimente mit den Subfragmenten *nlpC*5, *mepA*3, *proP*5 und *betP*4 (Abb. 21) mit neun verschiedenen molaren MtrA+N_{GSH}-Überschüssen durchgeführt. Im Falle von *mepA*3 und *nlpC*5 wurden 50 % der eingesetzten Fragmente schon bei einem ca. 24-fachen molaren MtrA-Überschuss „geschifft“, wohingegen im Falle von *betP*4 und *proP*5 ein ca. 40-facher molarer Überschuss nötig war, um 50 % der Fragmente zu binden (Abb. 24). Dies deutet darauf hin, dass die *in vitro*-Affinität von unphosphoryliertem MtrA zu den Promotorregionen von reprimierten Genen ca. 2-fach höher ist als zu denen von aktivierten Genen. Dies korreliert mit dem Ergebnis der DNA-Affinitätschromatographie, dass mit den Promotorregionen von *nlpC* und *mepA* wesentlich größere Mengen MtrA angereichert wurden als mit den Promotorregionen von *proP* und *betP*.

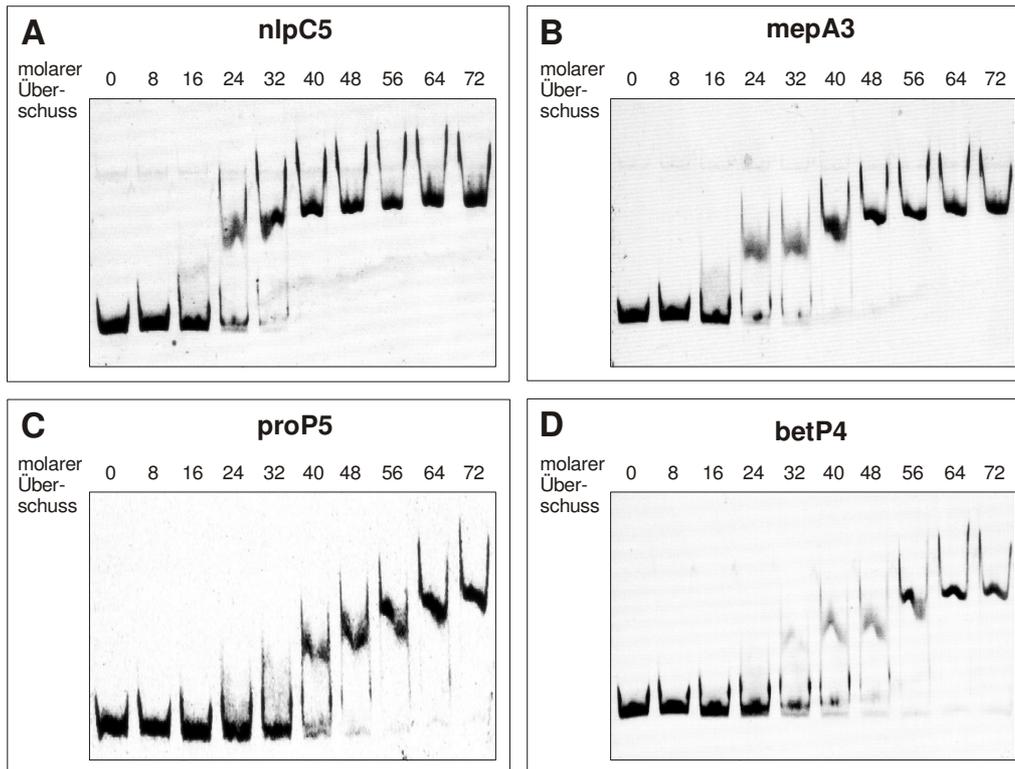


Abb. 24: Vergleich der Affinität von MtrA+N_{GSH} zu den DNA-Fragmenten nlpC5, mepA3, proP5 und betP4. Verschiedene Konzentrationen MtrA+N_{GSH} (8 – 72-facher molarer Überschuss) wurden mit 100 ng nlpC5 (A), mepA3 (B), proP5 (C) oder betP4 (D), die eine bzw. zwei (betP4, nlpC5) MtrA-Bindestellen enthalten (vgl. Abb. 21) in 20 µl gemischt. Die Proben wurden 30 min bei RT inkubiert und dann auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA anschließend mit SybrGreen I gefärbt.

Um zu untersuchen, welchen Effekt eine Phosphorylierung von MtrA auf seine DNA-Bindungsaffinität hat, wurden vergleichende Bandshift-Experimente mit den Fragmenten nlpC5 und proP5 (vgl. Abb 21) und phosphoryliertem sowie unphosphoryliertem MtrA+N_{GSH} durchgeführt. Dazu wurde MtrA+N_{GSH} zunächst 30 min mit Male-PhoS_K und 80 µM ATP inkubiert, um zumindest eine partielle Phosphorylierung von MtrA zu erreichen. Wie in Abb. 25 zu sehen ist, hat phosphoryliertes MtrA eine nur geringfügig höhere Bindungsaffinität zu den getesteten Promotorregionen als unphosphoryliertes MtrA. Dieses Resultat konnte drei Mal unabhängig reproduziert werden. Dass der Unterschied so klein ist könnte darauf zurückzuführen sein, dass nur eine geringfügige Menge MtrA in der phosphorylierten Form vorlag. Das Resultat dieses Experiments deutet darauf hin, dass *in vivo* phosphoryliertes MtrA für die Repression von *nlpC* und *mepA* und für die Aktivierung von *betP* und *proP* verantwortlich ist.

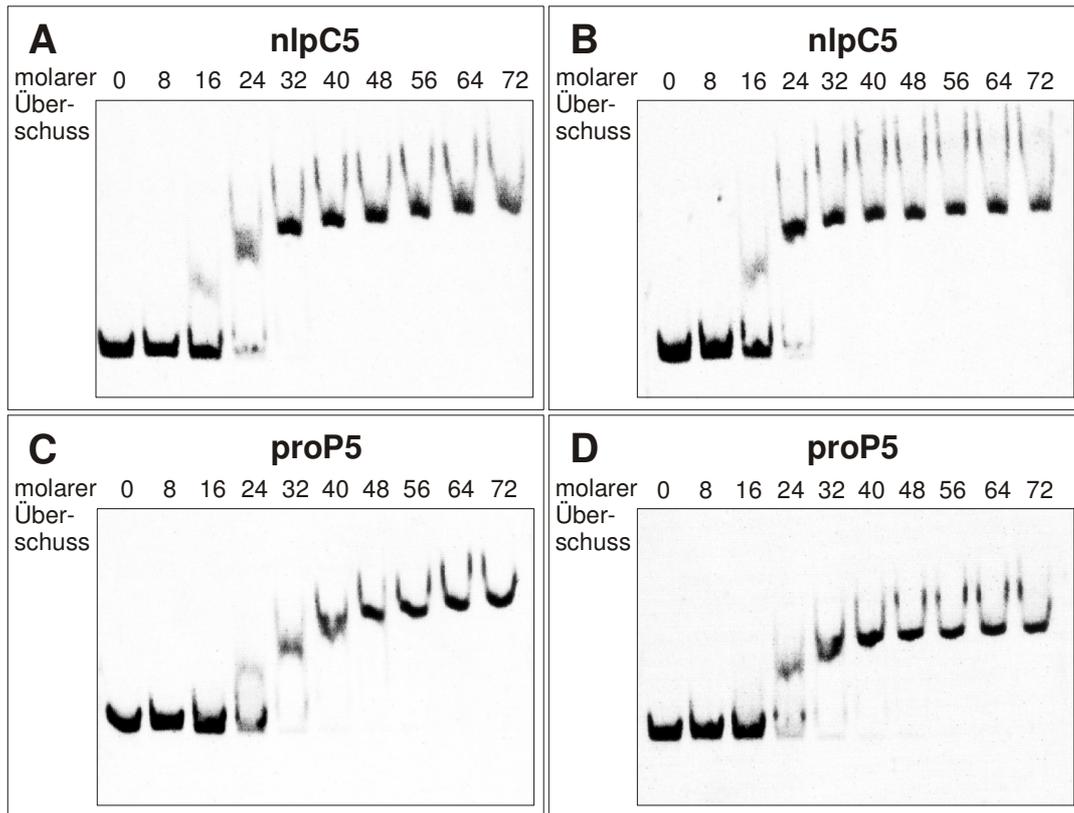


Abb. 25: Vergleich der Bindungsaffinität von unphosphoryliertem (A+C) und phosphoryliertem MtrA+N_{GSH} (B+D) an die DNA-Fragmente nlpC5 und proP5. Verschiedene Konzentrationen von unphosphoryliertem bzw. phosphoryliertem MtrA+N_{GSH} (8– bis 72-facher molarer Überschuss) wurden mit 100 ng nlpC5 (A+B), bzw. proP5 (C+D) (vgl. Abb. 21) in 20 µl inkubiert. Die Proben wurden 30 min bei RT inkubiert, dann auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend die DNA mit SybrGreen I gefärbt.

5.4 Identifizierung weiterer direkter Zielgene von MtrA

Im Weiteren wurde auf verschiedene Weisen nach zusätzlichen Zielgenen bzw. Regionen, an die MtrA bindet, gesucht. Um die Bindung von MtrA an die in Frage kommenden (Promotor-) Regionen zu testen, wurden die entsprechenden DNA-Regionen mittels PCR amplifiziert und in einem Bandshift-Assay mit MtrA+N_{GSH} eingesetzt (vgl. Abb. 26).

Durch die Transkriptomvergleiche mit den DNA-Microarrays und die „Dot-Blot“-Experimente (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004) wurden neben *nlpC*, *mepA*, *betP* und *proP* eine ganze Reihe weiterer Gene identifiziert, die als mögliche direkte Zielgene von MtrA in Frage kommen, da ihr mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ - und/oder in der $\Delta mtrA$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp verändert war. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Genen, die entweder in der $\Delta mtrAB$ - oder in der $\Delta mtrA$ -Mutante einen mehr als dreifach veränderten mRNA-Level aufwiesen und bei denen die einen veränderten mRNA-Level in den Dot-Blot-Experimenten zeigten, um direkte Zielgene des Antwortregulators handelt, sollte die Bindung von MtrA an die Promotorregionen dieser Gene getestet werden. Bei diesen Genen handelt es sich um

csbD (NCgl0226), *dps* (NCgl2897), *katA* (NCgl0251), *NCgl1368*, *NCgl0381/0382*, *mtrA*, *NCgl1291/1290*, *ppmA* (NCgl2737), *lpqB* (NCgl0723), *mscL* (NCgl0843) und *lcoP* (NCgl2251). Dabei scheinen *NCgl1291* und *NCgl1290*, sowie *NCgl0381* und *NCgl0382* jeweils ein Operon zu bilden, da die Gene benachbart zueinander liegen sowie nur durch eine 20 bzw. null Basenpaar-umfassende intergene Regionen voneinander getrennt sind und gleichermaßen reguliert werden. Wie in Abb. 26 A und B gezeigt bindet MtrA an die Promotorregionen von sechs dieser Gene bzw. Operons, nämlich an *csbD*, *katA*, *NCgl1368*, *NCgl0381/0382*, *ppmA* und *NCgl1290/1291*. Der mRNA-Level von *csbD*, *katA* und *NCgl1368* war erniedrigt in mindestens einer der beiden Mutanten, was darauf hindeutet, dass MtrA diese Gene aktiviert, wohingegen der mRNA-Level von *NCgl0381/0382*, *ppmA* und *NCgl1290/1291* erhöht war und MtrA somit die Transkription dieser Gene vermutlich inhibiert.

Die ChIP-to-chip-Ergebnisse deuten an, dass MtrA neben *nlpC* auch an die intergenische Region zwischen *nadE* und *nrdH* und an die Promotorregion von *NCgl0102/0103* bindet. Die Affinitätsreinigungen bestätigten diese Bindung allerdings nur im Falle der intergenischen Region von *nadE* und *nrdH*. Daher sollte die Bindung von MtrA an diese beiden Regionen mit Hilfe von Bandshift-Experimenten noch einmal untersucht und mit den bisherigen Ergebnissen verglichen werden. Wie in Abb. 26 F gezeigt bindet MtrA in den Bandshift-Experimenten an die intergenische Region *nadE-nrdH*, nicht aber stromaufwärts von *NCgl0102/0103*. Dies bestätigt die Ergebnisse der Affinitätsreinigungen und spricht dafür, dass die Anreicherung der *NCgl0103/0102*-Region in den ChIP-to-chip-Experimenten ein falsch-positives Resultat darstellt. Welchen Einfluss MtrA auf die Transkription von *nadE* und/oder *nrdH* hat ist unklar, da keins der beiden Gene einen veränderten mRNA-Level in den Microarray-Experimenten zeigte.

Die Identifizierung des Konsensusmotivs (VRTHASRDHDHSRWMMCR, vgl. Abb. 23) ermöglichte die Suche nach weiteren Zielgenen im Genom von *C. glutamicum*. Dazu wurde im *C. glutamicum*-Genom nach diesem Konsensusmotiv ohne Zulassung von Insertionen oder Deletionen mit Hilfe der ERGO-Software (Integrated Genomics) gesucht. Dabei konnte das Motiv 27-mal identifiziert werden, aber nur acht der Bindestellen, einschließlich derjenigen stromaufwärts von *nlpC*, *mepA*, *proP* und *betP*, waren in intergenischen Regionen bis maximal 500 bp stromaufwärts des Startcodons des benachbarten Gens bzw. der benachbarten Gene lokalisiert. Die drei verbleibenden putativen MtrA-Bindestellen liegen zwischen den divergent angeordneten Genen *NCgl2561* und *NCgl2562* zwischen *NCgl0531* und *NCgl0532* sowie stromaufwärts von *rpf2* (NCg0872). *NCgl2561* kodiert für einen Transkriptionsregulator der GntR-Familie, *NCgl2562* für ein extracytoplasmatisches Bindeprotein aus der fünften Gruppe der Bindeproteine (Tam and Saier, 1993), *NCgl0532* für

die SecY-Untereinheit der Sec-Translokase, *NCgl0531* für einen Transkriptionsregulator der lclR-Familie und *rpf2* für ein Protein, das Ähnlichkeiten zu dem „resuscitation factor“ von *Micrococcus luteus* zeigt (Hartmann *et al.*, 2004). Die Bandshift-Experimente zeigen (Abb. 26 D), dass MtrA an die intergenische Region von *NCgl0531* und *NCgl0532* und stromaufwärts von *rpf2* bindet. *Rpf2* wies einen 2,25-fach erhöhten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ -Mutante auf (vgl. Anhang A5, Tab. 11). Dies lässt vermuten, dass die Transkription von *rpf2* durch MtrA reprimiert wird. Ob und welchen Einfluss MtrA auf die Transkription von *NCgl0531* und/oder *NCgl0532* hat ist unklar, da keins der beiden Gene einen veränderten mRNA-Level in den Microarray-Experimenten zeigte.

Darüber hinaus wurde ein zweites Konsensusmotiv abgeleitet (GATNACAATTNGATAACG), in dem Positionen mit G, A, T oder C belegt wurden, wenn die entsprechende Base in mindestens drei der fünf bisher identifizierten Bindestellen vorkam. Die Suche im Genom von *C. glutamicum* nach Sequenzen, die sich in maximal vier Basen von diesem Bindemotiv unterscheiden und weder Insertionen noch Deletionen beinhalten, ergab 146 Treffer. Von diesen Treffern liegen 35 bis maximal 500 bp vom benachbarten Gen bzw. von den benachbarten Genen entfernt. Um einen Eindruck zu gewinnen, ob es sich bei diesen Motiven tatsächlich um MtrA-Bindestellen handelt, sollte zunächst einmal die Bindung von MtrA an drei der 35 Motive mittels Bandshift-Experimenten getestet werden. Diese drei Bindestellen liegen alle zwischen je zwei divergent angeordneten Genen: *yggB* (*NCgl1221*)-*NCgl1222*, *NCgl0717*-*NCgl0718* und *NCgl0824*-*NCgl0825*. *yggB* kodiert für einen mechanosensitiven Kanal, *NCgl1222* für eine putative Thiaminpyrophosphat-abhängige Acetolactat-Synthase, *NCgl0717* und *NCgl0718* für Proteine mit unbekannter Funktion, *NCgl0824* für eine putative membrangebundene Peptidase und *NCgl0825* für einen Transporter. Die anschließenden Bandshift-Experimente ergaben (Abb. 26 E), dass MtrA zwischen *NCgl0717* und *NCgl0718* sowie zwischen *NCgl0824* und *NCgl0825* bindet. Davon wies *NCgl0717* einen 2,8-fach erhöhten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ -Mutante und *NCgl0824* einen 1,4- bzw. einen 1,5-fach erhöhten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ - bzw. $\Delta mtrA$ -Mutante auf (vgl. Anhang A5, Tab. 11). Daraus kann man schließen, dass die Bindung von MtrA an die intergenische Region *NCgl0717-0718* die Transkription von *NCgl0717* inhibiert, jedoch keinen Einfluss auf *NCgl0718* und die Bindung von MtrA an die intergenische Region *NCgl0824-0825* die Transkription von *NCgl0825* inhibiert, jedoch keinen Einfluss auf *NCgl0718* hat.

Da der Antwortregulator MtrA aus *C. glutamicum* in Corynebakterien und Mykobakterien hoch konserviert ist (vgl. Anhang A1, Abb.32) liegt die Annahme nahe, dass MtrA aus *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* ein ähnliches, wenn nicht sogar gleiches Bindemotiv und (zumindest teilweise) identische Zielgene haben. Für *M. tuberculosis* wurde vor kurzem das

essentielle Replikationsgen *dnaA* als ein direktes Zielgen von MtrA beschrieben (Fol *et al.*, 2006). Obwohl in unseren Transkriptomanalysen mit der $\Delta mtrAB$ -Mutante (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004) und der $\Delta mtrA$ -Mutante von *C. glutamicum* kein veränderter mRNA-Level von *dnaA* festgestellt wurde, sollte die Bindung von MtrA an die Promotorregion von *dnaA* aus *C. glutamicum* mittels Bandshift-Experimenten überprüft werden. Dazu wurde die Region von -575 bp bis +38 bp bzgl. des Translationsstartpunktes von *dnaA* in zwei Teilen amplifiziert. Abb. 26 C zeigt deutlich, dass MtrA an beide Fragmente von *dnaA* bindet. Der Promotor von *dnaA* scheint somit mindestens zwei MtrA-Bindestellen zu beinhalten. Der Einfluss von MtrA auf die Expression von *dnaA* ist jedoch noch unklar, da *dnaA* keinen veränderten mRNA-Level in den Mutanten verglichen mit dem Wildtyp aufwies.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob MtrA aus *C. glutamicum* auch an die Promotorregion von *dnaA* aus *M. tuberculosis* bindet. Des Weiteren wurde im Genom von *M. tuberculosis* H37Rv nach dem oben identifizierten Bindemotiv (vgl. Abb. 23, VRTHASRDHDHSRWMMCR) ohne Zulassung von Fehlern gesucht. Dabei konnten 27 mögliche MtrA-Bindestellen identifiziert werden, von denen sechs in intergenischen Region bis maximal 500 bp stromaufwärts des Startcodons des benachbarten Gens bzw. der benachbarten Gene lagen. Auch hier sollte an Hand von zwei dieser Genregionen die Relevanz dieser möglichen Bindestellen getestet werden. Diese zwei möglichen MtrA-Bindestellen liegen zwischen *Rv0951* und *Rv0950c* bzw. stromaufwärts von *Rv0867c*. *Rv0951* kodiert für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthetase, *Rv0950c* für eine putative Metallopeptidase und *Rv0867c* für Protein mit unbekannter Funktion. Die Bandshift-Experimente in Abb. 27 zeigen, dass MtrA an die intergenische Region *Rv0951-Rv0950c* und stromaufwärts von *Rv0867c*, jedoch nicht von *dnaA* bindet.

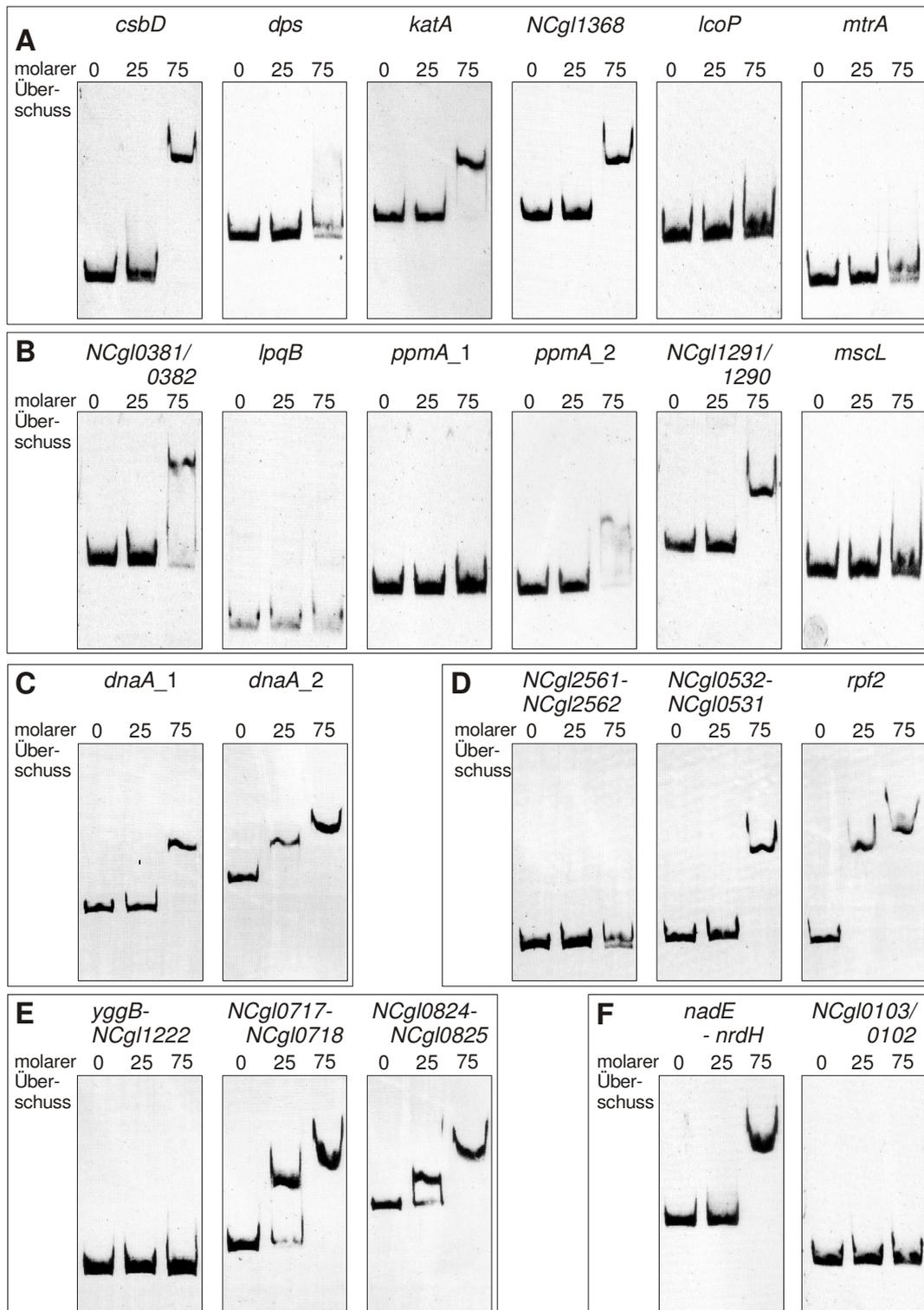


Abb. 26: Bindung von MtrA an verschiedene Promotorregionen. DNA-Fragmente (120 bis 400 bp lang, Endkonzentration 20 bis 60 nM), die Promotorregionen teilweise oder vollständig abdeckten, wurden 30 min bei RT ohne bzw. mit einem 25- oder 75-fachen MtrA+N_{GSH}-Überschuss inkubiert. Die Proben wurden dann auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit SybrGreen I gefärbt. In A bzw. B sind die Bandshifts der Gene zusammengefasst, deren mRNA-Level in der $\Delta mtrA$ - oder der $\Delta mtrA$ -Mutante erniedrigt bzw. erhöht war, in C die Bandshifts mit zwei Fragmenten der Promotorregion von *dnaA*, in D mit Fragmenten, die das Konsensusmotiv VRTHASRDHDHSRWMMCR enthalten, in E mit Fragmenten, die das Konsensusmotiv GATNACAATTNGATAACG (mit maximal 4 Fehlern) enthalten und in F mit den Promotorregionen von *nadE-nrdH* und *NCgl0103/0102*, die in den ChiP-to-chip-Experimenten angereichert worden waren.

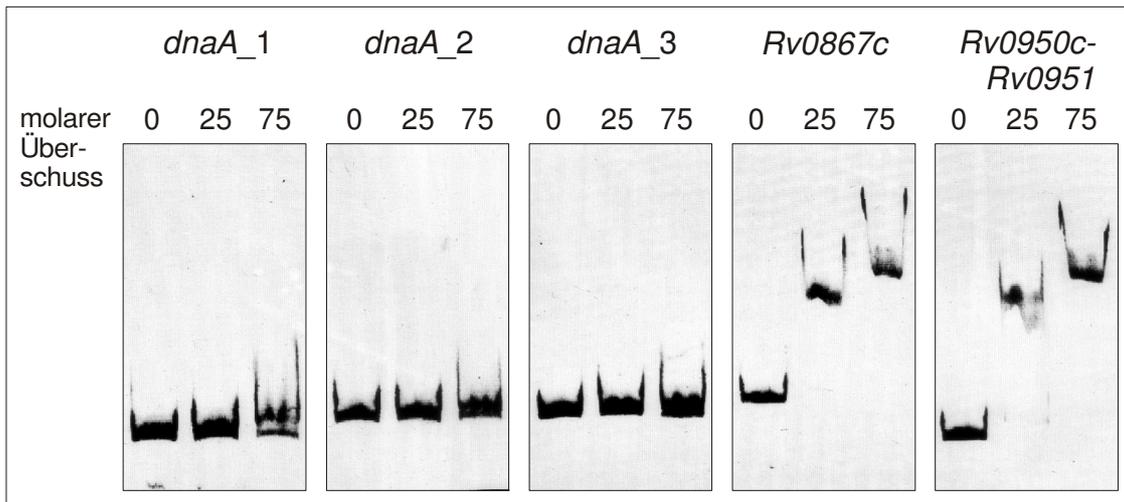


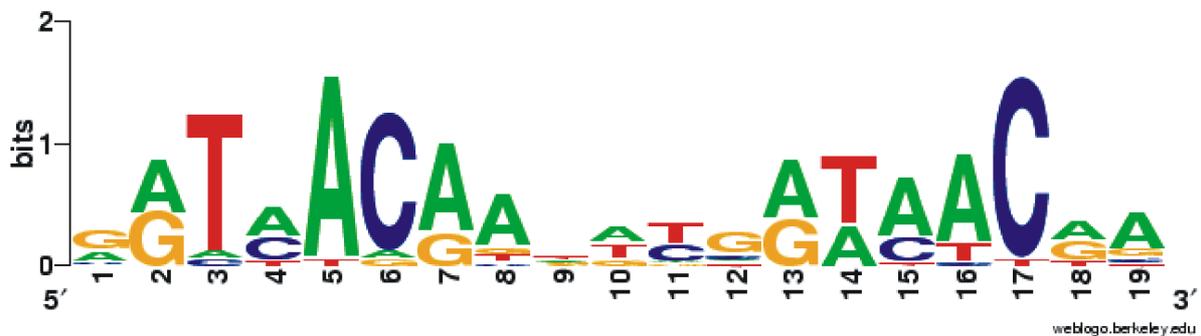
Abb. 27: Bindung von MtrA an verschiedene Promotorregionen aus *M. tuberculosis*. DNA-Fragmente (200 – 260 bp; Endkonzentration 30 – 40 nM), die je ca. 1/3 der Promotorregion von *dnaA* oder Teile der Promotorregionen mit einer identifizierten MtrA-Bindestelle abdeckten, wurden 30 Minuten ohne bzw. mit einem 25- oder 75-fachen molaren MtrA+N_{GSH}-Überschuss inkubiert. Die Proben wurden dann auf einem 15 %-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die DNA mit SybrGreen I gefärbt.

Die Suche nach einem gemeinsamen Sequenzmotiv mit Hilfe der MEME-Software (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) in den neu und schon zuvor beschriebenen Promotorregionen aus *C. glutamicum*, an die MtrA bindet, ergab die in Tab. 9 dargestellten Sequenzen. Ob diese tatsächlich die MtrA-Bindestellen repräsentieren, muss jedoch noch experimentell überprüft werden. Mit Hilfe des Programms **WEBLOGO** (<http://weblogo.berkeley.edu/>) wurden ausgehend von den 18 in Tab. 9 dargestellten Sequenzen ein Konsensusmotiv abgeleitet. Dabei werden die Basen, die an einer Position des Bindemotivs vorkommen, gestapelt. Die Höhe des ganzen Stapels gibt an, wie konserviert die Sequenz an dieser Position ist, und die Höhe der einzelnen Buchstaben gibt die relative Häufigkeit der entsprechenden Base an dieser Position an (Crooks *et al.*, 2004). Setzt man die mit MEME identifizierten Sequenzen als MtrA-Bindestellen voraus, dann besteht das daraus resultierende Konsensusmotiv aus einem „direct repeat“ von je acht bp, die durch drei beliebige Basen getrennt wurden (vgl. Abb. 28). Die Bindung an direkte Sequenzwiederholungen ist typisch für OmpR-Typ-Regulatoren (He *et al.*, 2006).

Tab. 9: Übersicht über die identifizierten MtrA-Bindestellen^a

Gen oder NCgl-Nummer	MtrA-Bindestelle
<i>mepA</i>	GT GGCACAACCTTGATAACGG AC
<i>nlpC-1</i>	GC GATAACGGTTCGATAACGA CC
<i>nlpC-2</i>	TC AATAAGGTTACGAAACCGC AA
<i>betP</i>	AG CATCACAATGACATAACGA TA
<i>proP</i>	TG GGTTACAAATTGGTCACAT TT
<i>csbD</i>	CA GGTAACGGATTTATATCAA TT
<i>katA</i>	GA AGTCAAAAGAGCGTAACGA CG
<i>NCgl1368</i>	TA GGCACAAAAATGATTTTCAG TC
<i>NCgl0381/0382</i>	TC GATAACGCAATAAAAACTA GA
<i>ppmA</i>	CT AGTCACAAAAATGGACACTC TC
<i>NCgl1291/1290</i>	GA CGAAACAATGCCAAAACAA AA
<i>dnaA1</i>	TT GATCTCAAGGTGAACATTA CC
<i>dnaA2</i>	TG GACAACATTGTGGAAACAA TG
<i>NCgl0532-NCgl0531</i>	CC GATTACAAATCGGACACGA TT
<i>rpf2</i>	TT AGTCACAATACGGTAACAA AC
<i>NCgl0717-NCgl0718</i>	AA AATAACAAGTCAATAACAA AC
<i>NCgl0824-NCgl0825</i>	TA GATAACAAGATGGTCTCAA TT
<i>nadE-nrdH</i>	AA TGTAACGATTCTGTAACGG AC

^a Die hier dargestellten Bindestellen wurden bei der Suche nach gemeinsamen Bindemotiven in allen DNA-Fragmenten, an die MtrA in Bandshift-Experimenten gebunden hat, identifiziert. Die ersten zwei und die letzten zwei Basen sind vermutlich nicht wichtig für die Bindung.

**Abb. 28:** Konsensusmotiv, das sich mit Hilfe des Programms Weblogo aus den in Tab. 9 zusammengefassten (möglichen) MtrA-Bindestellen ergibt.

VI Diskussion

Das MtrAB-Zweikomponentensystem bestehend aus der Sensorkinase MtrB und dem Antwortregulator MtrA ist in allen bekannten und sequenzierten Mitgliedern der Ordnung Acinomycetales, zu der auch die Corynebakterien und Mykobakterien gehören, hoch konserviert (vgl. Anhang A1, Abb. 32 und Anhang A2, Abb. 33). Diese Tatsache lässt vermuten, dass es eine wichtige Rolle bei der Anpassung dieser Organismen an ihre Umwelt spielt. Die Möglichkeit, das *mtrA*-Gen in *C. glutamicum* zu deletieren, steht im Gegensatz zu den Arbeiten in *M. tuberculosis*, wo eine Deletion nicht möglich war, es sei denn eine plasmidkodierte Kopie von *mtrA* war anwesend (Zahrt and Deretic, 2000). Die Tatsache, dass *mtrA* und *mtrB* in *C. glutamicum* deletiert werden konnten, macht *C. glutamicum* zu einem idealen Modellorganismus für Untersuchungen an diesem Zweikomponentensystem.

1 Phänotypische Charakterisierung verschiedener *C. glutamicum*-Mutanten

Der Vergleich einer $\Delta mtrAB$ -Mutante mit dem Wildtyp deutete darauf hin, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem eine Rolle im Zellwandmetabolismus und in der Osmoregulation spielt (Möker *et al.*, 2004). Hinweise auf eine Rolle im Zellwandmetabolismus waren die radikal veränderte Morphologie der $\Delta mtrAB$ -Zellen (Abb. 3) und ihre veränderte Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren der Zellwandsynthese (Tab. 4). Die untypische Septumbildung der $\Delta mtrAB$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 5) deutet zusätzlich darauf hin, dass auch die Zellteilung der Mutante gestört sein könnte. Die Zellen der $\Delta mtrAB$ -Mutante waren sensitiver gegenüber Penicillin, Lysozym und Vancomycin (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Während Penicillin und Vancomycin die Quervernetzung des Peptidoglykans verhindern, katalysiert Lysozym die Hydrolyse der β -1,4-glycosidischen Verknüpfung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Der gemeinsame Angriffspunkt dieser Substanzen ist also das Peptidoglykan. Die Tatsache, dass die $\Delta mtrAB$ -Mutante sensitiver gegenüber diesen Substanzen ist, lässt vermuten, dass das Peptidoglykan der Mutante verändert bzw. geschwächt ist. Auf der anderen Seite sind die $\Delta mtrAB$ -Zellen resistenter gegenüber Ethambutol. Ethambutol ist ein Medikament gegen Tuberkulose, das die membrangebundenen Arabinosyltransferasen (kodiert durch die *emb*-Gene) inhibiert, die in die Synthese der Arabinogalaktan-Schicht, die in der Zellwand aller Mykobakterien und Corynebakterien vorkommt, involviert sind (Belanger *et al.*, 1996). Eine erhöhte Expression des einzigen *C. glutamicum*-Gens für eine Arabinosyltransferase (*emb*, *NCgl0184*), die nachgewiesenermaßen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Ethambutol führt (Radmacher *et al.*, 2005), konnte in der $\Delta mtrAB$ -Mutante jedoch nicht festgestellt

werden. Da der Phänotyp der $\Delta mtrAB$ -Mutante bzgl. Ethambutolresistenz komplementiert werden konnte, ist dieser Phänotyp auf die Abwesenheit der *mtrAB*-Gene zurückzuführen. Somit scheint die veränderte Expression eines oder mehrerer anderer Gene für die erhöhte Resistenz der $\Delta mtrAB$ -Mutante gegenüber Ethambutol verantwortlich zu sein.

Die Wachstumsvergleiche zeigten, dass der Wildtyp und die $\Delta mtrAB$ -Mutante die gleiche maximale Wachstumsrate aufwiesen, die $\Delta mtrAB$ -Mutante allerdings nur etwa die Hälfte der maximalen OD₆₀₀ des Wildtyps erreichte (Tab. 4, Abb. 6), wobei noch Glucose im Medium vorhanden war. Dieser frühzeitige Wachstumsstopp war auf eine Ansäuerung des Mediums durch die Mutante zurückzuführen. Die Substanz(en), die für diese Ansäuerung verantwortlich sind, konnten noch nicht identifiziert werden. Die Bildung von Aminosäuren sowie der organischen Säuren Oxalacetat, Pyruvat, Malat, Succinat, Lactat, Fumarat und Acetat konnte als Verursacher der Ansäuerung ausgeschlossen werden (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004).

Komplementationsstudien zeigten, dass der Phänotyp bzgl. Morphologie und Sensitivität gegenüber den getesteten Antibiotika auf die Deletion der *mtrAB*-Gene zurückzuführen ist. Durch Einführung plasmidkodierter Kopien der *mtrAB*-Gene in die $\Delta mtrAB$ -Mutante konnten die genannten Veränderungen vollständig revertiert werden (Tab. 4). Eine Komplementation bzgl. der Ansäuerung des Mediums und des daraus resultierenden Wachstumsstopps konnte jedoch nicht erreicht werden (Abb. 8). Diese Eigenschaft könnte daher das Ergebnis einer weiteren Mutation sein, die bei der Deletion der *mtrAB*-Gene oder als Konsequenz der Deletion aufgetreten sein könnte.

Ein Vergleich der Transkriptome des Wildtyps und der $\Delta mtrAB$ -Mutante mit Hilfe von DNA-Mikroarrays ergab eine Reihe von Genen, deren mRNA-Level mindestens dreifach verändert war (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Neben *mtrA* war in der $\Delta mtrAB$ -Mutante der mRNA-Level von vier Genen erniedrigt. Bei diesen Genen handelte es sich um *proP*, *betP*, *NCgl1290* und *csbD*. *proP* und *betP* kodieren Transporter für kompatible Solute, deren Aktivität bei hyperosmotischen Stress induziert wird (Peter *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1998), *NCgl1290* ein Protein unbekannter Funktion und *csbD* ein Protein, das Ähnlichkeit zu einem Stressprotein von *Bacillus subtilis* aufweist, dessen Funktion allerdings unbekannt ist (Akbar *et al.*, 1999). Der mRNA-Level von *mtrB* war in der $\Delta mtrAB$ -Mutante 2,2-fach erniedrigt. Drei Gene wiesen in der $\Delta mtrAB$ -Mutante einen mehr als dreifach erhöhten mRNA-Level auf: *mepA*, *ppmA* und *lpqB*. *mepA* kodiert eine membrangebundene Metallopeptidase, *ppmA* einen möglichen membrangebundenen Proteasemodulator und *lpqB* ein Lipoprotein unbekannter Funktion (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Das *lpqB*-Gen ist direkt stromabwärts von *mtrB* lokalisiert und wird evtl. mit *mtrAB* zusammen transkribiert (Brocker,

2003; Möker *et al.*, 2004). Diese Daten weisen darauf hin, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem nicht nur im Peptidoglykanmetabolismus, sondern auch bei der (Osmo-)Stress-Regulation eine Rolle spielen könnte.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Expression eines der Gene *mepA*, *ppmA* und *lpqB* für die veränderte Morphologie der $\Delta mtrAB$ -Mutante verantwortlich ist, sollten die Mutanten $\Delta mtrAB\Delta mepA$, $\Delta mtrAB\Delta ppmA$ und $\Delta mtrAB\Delta lpqB$ konstruiert und phänotypisch charakterisiert werden. Die Tatsache, dass die Deletion von *lpqB* nicht möglich war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Gen eine essentielle Funktion in *C. glutamicum* hat.

Die Dreifachmutanten $\Delta mtrAB\Delta mepA$ und $\Delta mtrAB\Delta ppmA$ wiesen das gleiche Wachstumsverhalten auf CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose wie die $\Delta mtrAB$ -Mutante auf. D.h. sie hatten die gleiche Wachstumsrate in der exponentiellen Phase wie der Wildtyp und stellten das Wachstum auf Grund einer Ansäuerung des Mediums frühzeitig ein (Abb. 11), obwohl noch Glucose im Medium vorhanden war. Die Zelllängen der Dreifachmutanten waren gegenüber denen der $\Delta mtrAB$ -Zellen leicht reduziert, jedoch deutlich länger als die des Wildtyps. Die Sensitivität gegenüber den getesteten Antibiotika Penicillin, Vancomycin und Ethambutol war ebenfalls sehr ähnlich zu der der $\Delta mtrAB$ -Mutante (Tab. 4). Daraus kann man schließen, dass der erhöhte mRNA-Level von *mepA* bzw. von *ppmA* alleine nicht für den Phänotyp der $\Delta mtrAB$ -Mutante verantwortlich ist.

Die Bindungsaffinität von DNA-bindenden Antwortregulatoren wird über ihren Phosphorylierungsstatus reguliert. Dabei kann nicht vorhergesagt werden, ob die unphosphorylierte oder die phosphorylierte Form an die DNA bindet. In Abb. 29 sind diese verschiedenen Möglichkeiten für das MtrAB-Zweikomponentensystem in Modell A und B zusammengefasst. Um nun unterscheiden zu können welche dieser Varianten für das MtrAB-Zweikomponentensystem zutrifft, wurden $\Delta mtrA$ - und $\Delta mtrB$ -Einzelmutanten konstruiert und der Phänotyp dieser Mutanten mit dem des Wildtyps und der $\Delta mtrAB$ -Mutante verglichen. Da in der $\Delta mtrA$ -Einzelmutante kein MtrA anwesend ist, sollte sich diese Mutante wie die $\Delta mtrAB$ -Mutante verhalten. In der $\Delta mtrB$ -Mutante kann MtrA nicht mehr durch MtrB phosphoryliert werden. Ist die unphosphorylierte Form von MtrA die DNA-bindende, so sollte sich $\Delta mtrB$ -Mutante wie der Wildtyp verhalten, bindet jedoch die phosphorylierte Form von MtrA an seine Zielgene, so sollte der Phänotyp gleich dem der $\Delta mtrAB$ -Mutante sein.

Das Wachstum der Einzelmutanten auf CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose war vergleichbar mit dem des Wildtyps. D.h. es erfolgte keine Ansäuerung des Mediums, die Mutanten erreichten die gleiche maximale OD₆₀₀ wie der Wildtyp und die Glucose wurde vollständig verbraucht. Nach Erreichen der stationären Phase jedoch sank die optische

Dichte früher und schneller als die des Wildtyps, was auf eine schnellere partielle Lyse der Zellen hindeutet (Abb. 11). Die Zellen der Einzelmutanten waren verlängert verglichen mit den Wildtyp-Zellen, aber kürzer als die Zellen der $\Delta mtrAB$ -Mutante (Tab. 4). Bezüglich der Sensitivität gegenüber den getesteten Antibiotika wiesen die Einzelmutanten den gleichen Phänotyp wie die $\Delta mtrAB$ -Mutante auf, jedoch mit einer Ausnahme: Die Sensitivität der $\Delta mtrB$ -Mutante gegenüber Ethambutol war ähnlich zu der des Wildtyps und somit deutlich niedriger als die der anderen Mutanten (Tab. 4). Ohne Berücksichtigung des Wachstumsverhaltens, ist der Phänotyp der $\Delta mtrA$ - mit dem der $\Delta mtrAB$ -Mutante vergleichbar. Wie bereits erwähnt, kann dies damit erklärt werden, dass in beiden Stämmen kein MtrA vorhanden ist, um an seine Zielgene zu binden. Phänotypische Unterschiede (mit Ausnahme der Ansäuerung) sollten darauf zurückzuführen sein, dass in der $\Delta mtrA$ -Mutante immer noch die Sensor kinase MtrB anwesend ist, die in Abwesenheit von MtrA evtl. auch andere Antwortregulatoren phosphorylieren könnte. Die Phosphorylierung eines Antwortregulators durch eine „fremde“ Sensor kinase wird als „Cross-talk“ bezeichnet. Dass zumindest *in vitro* Phosphorylierungsübertragungen zwischen Sensor kinasen und „fremden“ Antwortregulatoren in *C. glutamicum* möglich sind, zeigen die Phosphorylierungsexperimente dieser Arbeit mit PhoS und MtrA (vgl. unten).

Die $\Delta mtrB$ -Mutante zeigte ebenfalls einen Phänotyp vergleichbar zu dem der $\Delta mtrAB$ -Mutante. Dies deutet an, dass MtrA seine regulatorische Funktion in der phosphorylierten Form ausübt. MtrA scheint dennoch die Expression eines oder mehrerer Gene zu regulieren, die dafür sorgen, dass sich die $\Delta mtrB$ -Mutante bzgl. der Ethambutol-Sensitivität wie der Wildtyp verhält. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass MtrA an einige Promotorregionen in seiner phosphorylierten Form bindet und an andere in seiner unphosphorylierten Form. Dies entspricht einer Kombination von Modell A und B (Abb. 29). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass MtrA durch andere Sensor kinasen oder niedermolekulare Phosphordonor-Moleküle wie z. B. Acetylphosphat phosphoryliert wird und, dass diese Phosphorylierung ausreicht, um an die Promotorregionen einiger Zielgene zu binden. Um zu überprüfen, welche Gene in der $\Delta mtrB$ -Mutante einen veränderten mRNA-Level aufweisen, könnte man die Genexpression der $\Delta mtrB$ -Mutante mit der des Wildtyps vergleichen. Darüber hinaus könnte überprüft werden, ob zumindest *in vitro* eine Phosphorylierung von MtrA durch Acetylphosphat erreicht werden kann.

Die Inaktivierung des *mtrB*-Gens in *M. avium* durch Insertion einer Kanamycinkassette führte zu einer erniedrigten Resistenz gegenüber Penicillin, Ciprofloxacin und Clanthromycin, zu einer erhöhten Permeabilität und zu verlängerten Zellen. Darüber hinaus war der mRNA-Level der *mce*-Gene (*mce* steht für mammalian cell entry) erniedrigt (Cangelosi *et al.*, 2006). *Mce*-Proteine sind Invasin-ähnliche exportierte Proteine, die vermutlich beim Eintritt und beim Überleben von *M. tuberculosis* in Makrophagen eine Rolle spielen (Gioffre *et al.*, 2005).

Dieser Phänotyp ähnelt in einigen Aspekten (erniedrigte Resistenz gegenüber Penicillin, verlängerte Zellen) dem der $\Delta mtrB$ -Mutante aus *C. glutamicum* und deutet somit an, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem in *C. glutamicum* und *M. avium* teilweise gleiche Aufgaben erfüllt.

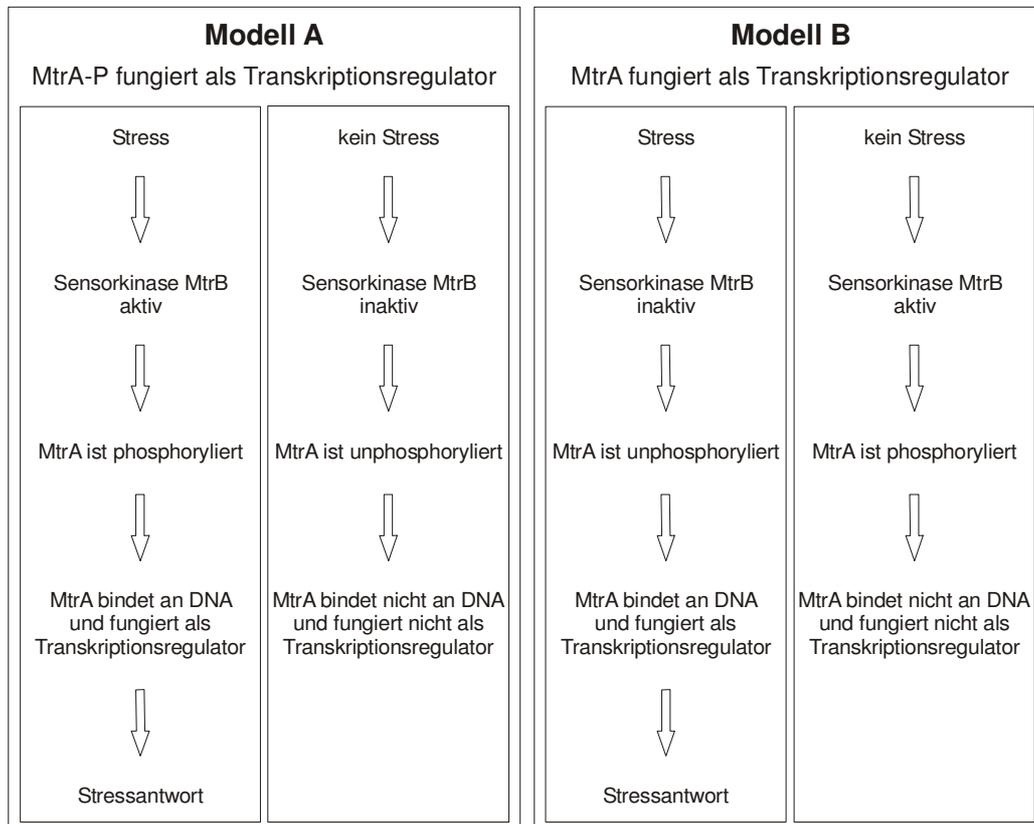


Abb. 29: Modell der möglichen Arbeitsweisen des MtrAB-Zweikomponentensystems als Antwort auf Stressbedingungen. In Modell A fungiert die phosphorylierte Form von MtrA und in Modell B die unphosphorylierte Form von MtrA als Transkriptionsregulator.

Ein genomweiter Vergleich der mRNA-Level der $\Delta mtrA$ -Mutante mit denen des Wildtyps mittels DNA-Microarrays zeigte, dass 21 Gene (einschließlich *mtrA*) einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Level aufwiesen. Sieben dieser Gene hatten ebenfalls einen mehr als zweifach veränderten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp. Dabei handelt es sich neben *mtrA* zum einen um die Gene *mepA* und *nlpC*, die einen erhöhten mRNA-Level in den Mutanten aufwiesen und somit evtl. durch MtrA reprimiert werden und zum anderen um die Gene *betP*, *proP*, *csbD* und *NCgl1837*, die einen erniedrigten mRNA-Level in den Mutanten aufwiesen und somit evtl. durch MtrA aktiviert werden. In den Fällen, in denen Unterschiede im mRNA-Level nur in der $\Delta mtrA$ - oder in der $\Delta mtrAB$ -Mutante festgestellt werden konnten, könnte die An- bzw. Abwesenheit von *mtrB* eine Rolle spielen. In der $\Delta mtrA$ -Mutante ist MtrB noch anwesend und könnte evtl. auf Grund des fehlenden zugehörigen Phosphorylgruppenakzeptors vermehrt fremde

Antwortregulatoren phosphorylieren, die daraufhin ihrerseits die Transkription ihrer Zielgene verändern. Im Wildtyp sind solche „Cross“-phosphorylierungen prinzipiell auch möglich, treten aber vermutlich nicht so häufig auf, da die Phosphorylgruppenübertragung von Sensorkinasen auf den zugehörigen Antwortregulator effektiver sein sollte als auf fremde (vgl. unten). Darüber hinaus können sekundäre Mutationen in der $\Delta mtrAB$ -Mutante (vgl. oben), die während oder als Folge der Deletion stattgefunden haben könnten, nicht als Ursache ausgeschlossen werden.

2 Identifizierung direkter Zielgene von MtrA

Zur Identifizierung von direkten Zielgenen des Antwortregulators wurden verschiedene DNA-MtrA-Interaktionsstudien durchgeführt, nämlich (1) Chromatin-Immunopräzipitationen gekoppelt mit DNA-Microarray-Analysen zur Identifizierung der isolierten DNA-Fragmente (ChIP-to-chip-Methode) als ein globaler Ansatz, sowie (2) DNA-Affinitätschromatographie und (3) Gelretardationsexperimente als genspezifische Ansätze.

Bei den ChIP-to-chip-Experimenten waren die ermittelten Anreicherungsfaktoren im Allgemeinen sehr gering, nur drei Genregionen waren mehr als zweifach angereichert (Tab. 6). Eine dieser Regionen umfasst die Promotorregion von *nlpC*, einem der möglichen Zielgene von MtrA. Die anderen beiden angereicherten Regionen liegen stromaufwärts des möglichen Operons *NCgl0102/0103* bzw. zwischen den divergent angeordneten Genen *nrdH* und *nadE*. *NCgl0102* und *NCgl0103* kodieren Membranproteine unbekannter Funktion, *nrdH* ein Glutaredoxin-ähnliches Protein und *nadE* eine NAD⁺-Synthetase. Die Gene in der Nähe dieser beiden angereicherten Regionen zeigten keinen signifikant veränderten mRNA-Level (vgl. Anhang A5, Tab. 11) in den Mikroarray-Experimenten und von daher ist nicht klar, welchen Einfluss MtrA auf diese Gene hat. Die ChIP-to-chip-Experimente deuten an, dass *nlpC* ein direktes Zielgen von MtrA ist, aber wegen der niedrigen Anreicherungsfaktoren erwies es sich als schwierig weitere direkte Zielgene zu benennen. Um zu versuchen höhere Anreicherungsfaktoren zu erreichen, könnte man in weiteren ChIP-to-chip Experimenten mehr Zellen, Antikörper und/oder Protein A-Agarose einsetzen. Darüber hinaus besteht auch noch die Möglichkeit die Wachstumsbedingungen der Zellen so zu verändern, dass mehr MtrA an seine Zielgene bindet. Dabei wären z. B. hyperosmotische Bedingungen oder eine Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von Ethambutol oder Penicillin denkbar. Da aber die Ergebnisse der ChIP-to-chip-Experimente mit denen der DNA-Mikroarray-Experimente vergleichbar sein sollten, wurden die Zellen für diese Experimente unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Da mit Hilfe der ChIP-to-chip-Experimente eine Bindung von MtrA an die Promotorregionen von *mepA*, *betP* und *proP* nicht klar gezeigt werden konnte, wurden als nächstes DNA-Affinitätsreinigungen mit den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP*, *nrdH-nadE*, *NCgl0102/0103* und einer Reihe von Kontrollpromotoren durchgeführt. Dabei konnte mit den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC* und *nrdH-nadE* MtrA in den Hochsalz-Eluaten als eine der dominanten Proteinbanden identifiziert werden (vgl. Abb. 18). Auch mit den Promotorregionen von *proP* und *betP* konnte MtrA im Hochsalz-Eluat identifiziert werden, obwohl in diesem Fall die entsprechenden Proteinbanden deutlich schwächer waren. Im Falle der Promotorregion von *betP* konnte MtrA nur mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse mit MtrA-spezifischen Antikörpern identifiziert werden. MtrA konnte jedoch mit keiner der Negativkontrollen (Promotoren von *icd*, *odhA*, *suCD* und *sdhCAB*) angereichert und weder mittels MALDI-TOF-MS noch durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Das beweist, dass dieser experimentelle Ansatz zumindest bzgl. MtrA spezifisch ist, auch wenn auf den silbergefärbten Gelen viele weitere Proteinbanden zu erkennen sind, die evtl. vermuten lassen, dass dieser experimentelle Ansatz unspezifisch sein könnte. Neben MtrA konnten noch eine Reihe anderer Transkriptionsregulatoren mit den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP*, *proP* und *nrdH-nadE* angereichert und identifiziert werden. Welche Rolle diese Transkriptionsregulatoren bei der Regulation der entsprechenden Gene spielen, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Fasst man die Ergebnisse der bisherigen MtrA-Bindungsstudien mit den Transkriptomdaten zusammen, wird deutlich, dass mindestens vier Gene unter der direkten Kontrolle von MtrA stehen. Die Gene *mepA* und *nlpC* werden durch MtrA reprimiert, wohingegen *betP* und *proP* durch MtrA aktiviert werden. Die Tatsache, dass MtrA effizienter mit den Promotoren der reprimierten Gene angereichert wurde, deutet darauf hin, dass MtrA unter den gewählten Bedingungen zu diesen Promotoren eine höhere Affinität hat als zu den Promotoren der aktivierten Gene. Im Fall der divergent angeordneten Gene *nrdH* und *nadE* zeigen sowohl die ChIP-to-chip-Experimente, als auch die Affinitätsreinigungen, dass MtrA an die intergenische Region bindet und somit zumindest eines dieser beiden Gene durch MtrA reguliert wird. Mit Methoden, die sensitiver als die DNA-Microarray-Analyse sind (z. B. quantitative real-time-PCR), könnten evtl. Unterschiede im mRNA-Level dieser Gene in der $\Delta mtrA$ oder $\Delta mtrAB$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp detektiert werden. Im Fall der Promotorregion von *NCgl0102/0103* deuten nur die ChIP-to-chip-Experimente auf eine Bindung von MtrA hin, wohingegen die Affinitätsreinigungen diese Bindung nicht bestätigten und die Transkriptomdaten nicht auf eine Expressionskontrolle dieser Gene durch MtrA hinwiesen.

Die Repression von Genen wird meistens dadurch bewerkstelligt, dass der Regulator in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes bindet und somit die RNA-Polymerase daran hindert, mit der DNA zu interagieren, während Aktivatorproteine in der Regel weiter stromaufwärts binden (Babu and Teichmann, 2003). Der Transkriptionsstart der MtrA-Zielgene *mepA*, *betP* und *proP* war bereits bekannt (Brocker, 2003; Möker *et al.*, 2004). Der Transkriptionsstart von *nlpC* wurde in dieser Arbeit 244 bp (Primer-Extension Methode) bzw. 242 bp (5'-RACE-Methode) stromaufwärts des Startcodons identifiziert. Wodurch der 2-bp-Unterschied zustande kam ist unklar. In beiden Experimenten wurde RNA der $\Delta mtrA$ -Mutante, die unter gleichen Bedingungen kultiviert worden war, verwendet. Da bei der „reversen Transkriptase“-Reaktion kein Transkript synthetisiert werden kann, das über die mRNA hinaus geht, wurde sich im Weiteren auf den Transkriptionsstart, der mit Hilfe der Primer-Extension-Methode ermittelt wurde, bezogen, da damit das längere Fragment erhalten werden konnte.

Um die genaue Position der Bindestellen von MtrA in den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP* und *proP* zu bestimmen, wurden Bandshift-Experimente mit den vollständigen und mit Teilen der zugehörigen Promotorregionen durchgeführt. Die Tatsache, dass MtrA an alle Fragmente 1 in Abb. 21 gebunden hat, bestätigt die Ergebnisse der DNA-Affinitätsreinigungen. Mit Hilfe der subfragmentierten Promotorregionen konnten die Bindestellen in den Promotorregionen weiter eingegrenzt werden. Im Fall von *mepA* und *proP* konnten jeweils eine Region und im Fall von *nlpC* und *betP* jeweils zwei Regionen identifiziert werden, in denen sich eine MtrA-Bindestelle befinden muss. Anhand des schwachen Shifts des Fragments 3 der Promotorregion von *betP* (Abb. 21 D) kann man vermuten, dass die Affinität von MtrA zu der darin enthaltenen Bindestelle deutlich geringer ist als zu den fünf anderen möglichen Bindestellen. Eine weitere Erklärung für den schwachen Shift könnte sein, dass das Fragment 3 nicht die vollständige Bindestelle enthält oder aber die Bindestelle so nah an einem Ende des Fragments lokalisiert ist, dass der DNA-Überhang an der einen Seite nicht für eine gute Bindung von MtrA an das Fragment ausreicht.

Die Suche nach ähnlichen Sequenzmotiven mit Hilfe der MEME-Software (<http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>) und den Fragmenten, in denen eine MtrA-Bindestelle vorhanden sein muss (ohne Fragment 3 aus Abb. 21 D), ergab bis auf eine Ausnahme die exakten Bindemotive. Dies bestätigten die anschließenden Mutationsstudien, in denen jeweils zwei bis vier Basen der möglichen Bindestellen ausgetauscht wurden und untersucht wurde, ob sich die Affinität von MtrA zu der entsprechenden Bindestelle auf Grund der Mutationen änderte (vgl. Abb. 22). Bei der Ausnahme handelt es sich um eine der beiden Bindestellen stromaufwärts von *nlpC*, nämlich um die Promotor-proximale. Hier lag die tatsächliche Bindesequenz sechs Basen neben der von MEME vorgeschlagenen. Die Lage der Bindestellen (Abb. 23) passt gut zu der Funktion des Antwortregulators als

Repressor von *mepA* und *nlpC* und als Aktivator von *betP* und *proP*, da im Falle von *mepA* und *nlpC* zumindest eine Bindestelle mit der -10-Region überlappt, wohingegen die Bindestellen in den Promotorregionen von *betP* und *proP* mehr als 100 bp vom Transkriptionsstart entfernt liegen. Die Bedeutung der zweiten MtrA-Bindestelle stromaufwärts von *nlpC*, die mehr als 60 bp vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist, ist noch unklar. Es wäre denkbar, dass *nlpC* unter verschiedenen Bedingungen durch MtrA reprimiert bzw. aktiviert wird und diese entgegengesetzte Regulation durch zwei unterschiedliche Bindestellen vermittelt wird. Möglich wäre auch, dass *in vivo* nur eine der beiden Bindestellen eine physiologische Rolle spielt. Da die Transkription von *nlpC* durch MtrA reprimiert wird, wäre in diesem Fall vermutlich die näher an *nlpC* gelegene Bindestelle die physiologisch relevante.

Die DNA-Affinitätsreinigungen deuteten an, dass die Affinität von unphosphoryliertem MtrA zu den Promotoren der reprimierten Gene (*mepA*, *nlpC*) höher ist als zu denen der aktivierten Gene (*betP*, *proP*). Diese Beobachtung wurde durch vergleichende Bandshift-Experimente mit den Fragmenten *nlpC5*, *mepA3*, *proP5* und *betP4* (Abb. 24) bestätigt. 50% der DNA-Fragmente *nlpC5* und *mepA3* wurden bei einem ca. 20-fachen MtrA-Überschuss geschiftet, wohingegen im Fall von *betP4* und *proP5* ein ca. 40-facher MtrA-Überschuss nötig war. Da die Fragmente *betP4* und *nlpC5* jeweils zwei MtrA-Bindestellen enthalten, sollen weitere Bandshift-Experimente mit Fragmenten durchgeführt werden, die nur eine Bindestelle enthalten, wie z. B. *betP2* und *nlpC7* und 8 (Abb. 21).

Da durch die Phosphorylierung des Antwortregulators seine Aktivität reguliert wird, erwartet man *in vivo* unterschiedliche Bindungsaffinitäten zwischen unphosphoryliertem und phosphoryliertem Antwortregulator. Dabei kann nicht vorhergesagt werden, ob die Phosphorylierung einen positiven oder negativen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat. Um dies *in vitro* zu untersuchen, wurden Phosphorylierungsexperimente mit gereinigtem MtrA und gereinigten Derivaten verschiedener Sensorkinasen durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren unabhängig davon, ob der Histidin-„Tag“ des MtrA-Derivats zuvor abgespalten wurde oder nicht. Alle drei in diesem Experiment verwendeten Sensorkinase-Derivate (MalE-MtrBK, MalE-PhoSK und MalE-CitAC) waren in der Lage, nach Autophosphorylierung den Phosphat-Rest auf MtrA zu übertragen (Abb. 17). Die sehr schwache Phosphorylierung von MtrA durch MalE-MtrBK ist vermutlich auf die schlechte Autophosphorylierung des MtrB-Derivats zurückzuführen. Eine deutlich bessere Phosphorylierung von MtrA konnte durch MalE-PhoSK (ebenfalls aus *C. glutamicum*) und durch MalE-CitAC (aus *K. pneumoniae*) erreicht werden. Wie erwartet ist der Phosphorylgruppentransfer von PhoSK auf den zugehörigen Antwortregulator PhoR jedoch wesentlich effektiver als der auf MtrA. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Transphosphorylierungen von Antwortregulatoren durch fremde Sensorkinasen („Cross-talk“)

zumindest *in vitro* nicht nur innerhalb einer Spezies, sondern auch zwischen verschiedenen Spezies möglich sind. Ob „Cross-talks“ in *C. glutamicum* auch *in vivo* eine Rolle spielen ist nicht klar. Solch ein „Cross-talk“ konnte in *E. coli* für die Sensorkinase ArcB und den nicht zugehörigen Antwortregulator OmpR gezeigt werden. Dabei scheint jedoch die Interaktion von der Histidin-Phosphoryl-Transfer-Domäne von ArcB abhängig zu sein (Matsubara *et al.*, 2000). Diese Domäne besitzt MtrB nicht, dennoch können „Cross“-phosphorylierungen nicht ausgeschlossen werden.

Die Bindungsaffinität von phosphoryliertem MtrA zu den getesteten Fragmenten proP5 und nlp5 (vgl. Abb. 21) ist *in vitro* kaum gegenüber unphosphoryliertem MtrA (Abb. 25) erhöht. Ob die Bindungsaffinität von MtrA *in vivo* ebenfalls so geringfügig durch die Phosphorylierung beeinflusst wird, oder ob der minimale Affinitätsunterschied darauf zurückzuführen ist, dass nur ein sehr geringer Teil des Antwortregulators phosphoryliert wurde, ist noch offen. Möglicherweise könnte eine effizientere Phosphorylierung durch ein aktiveres MtrB-Derivat oder durch niedermolekulare Phosphorylgruppendonoren wie z. B. Acetylphosphat erreicht werden. Da bei der Kristallisation von MtrA aus *M. tuberculosis* ein Calcium-Ion in der Empfänger-Domäne co-kristallisiert wurde (vgl. Abb. 30), ist es denkbar, dass für eine effiziente Phosphorylierung die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen nötig ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das in der Kristallstruktur vorhandene Ca^{2+} -Ion das üblicherweise in der Regulator-Domäne enthaltene Mg^{2+} -Ion ersetzt. Dennoch deuten die Ergebnisse an, dass durch die Phosphorylierung die Affinität von MtrA zu den Promotorregionen von sowohl reprimierten als auch aktivierten Genen erhöht wird.

Mit Hilfe weiterer Bandshift-Experimente konnten neben den Promotorregionen von *mepA*, *nlpC*, *betP* und *proP* 12 zusätzliche identifiziert werden, an die MtrA bindet (Abb. 26). Die Ergebnisse der Transkriptomchips, mit denen genom-weit die mRNA-Level von $\Delta mtrAB$ bzw. $\Delta mtrA$ mit denen des Wildtyps verglichen wurden, geben Hinweise darauf, dass acht der möglichen Gene bzw. Operons unter den getesteten Bedingungen durch MtrA reprimiert und fünf aktiviert werden (vgl. Anhang A5, Tab. 11).

Bei den reprimierten Genen bzw. Operons handelt es sich neben *mepA* und *nlpC* um die Gene *NCgl0824*, *ppmA*, *NCgl0381/0382*, *rpf2*, *NCgl0717* und *NCgl1290/1291*. Wie *mepA* und *nlpC* scheint auch *NCgl0824* für eine mögliche Zellwandpeptidase zu kodieren. *NCgl0824* besitzt im N-Terminus eine Transmembranhelix und ist somit vermutlich membrangebunden. Der C-Terminus weist mit 67 % Sequenzidentität eine starke Ähnlichkeit zu dem C-Terminus von MepA auf. Er befindet sich voraussichtlich ebenfalls auf der extracytoplasmatischen Seite und enthält eine Metallopeptidasedomäne der M23-Familie. Damit gehört *NCgl0824* in die gleiche Familie der Peptidasen wie MepA und wird MepB genannt. *NCgl0381* und *NCgl0382* kodieren für putative am Häm-Transport beteiligte Proteine (Wennerhold and Bott, 2006) und das *rpf2*-Gen für ein Protein, das Ähnlichkeit zu

Rpf („resuscitation-promoting factor“) aus *Micrococcus luteus* aufweist. In *C. glutamicum* verkürzt Rpf2 zusammen mit Rpf1 die „Lag“-Phase und erniedrigt die Verdopplungszeit von Zellen die lange gelagert wurden, bevor sie zum Inokulieren einer frischen Kultur verwendet wurden (Hartmann *et al.*, 2004). *NCgl0717*, *NCgl1290* und *NCgl1291* kodieren für Proteine unbekannter Funktion.

Bei den aktivierten Genen handelt es sich neben *proP* und *betP* um *csbD*, *kataA* und *NCgl1368*. *csbD* kodiert für ein mögliches stressinduziertes Protein, *kataA* für das Hämprotein Katalase und *NCgl1368* für eine mögliche Acetyltransferase.

Die verbleibenden drei MtrA-Bindestellen liegen stromaufwärts von *dnaA* bzw. in den intergenischen Regionen *NCgl0532-NCgl0531* und *nadE-nrdH*. Der mRNA-Level dieser fünf Gene war in den Transkriptomchip-Experimenten unverändert (vgl. Anhang A5, Tab. 11). Daher ist noch unklar, ob diese Bindestellen *in vivo* für die Expression der benachbarten Gene relevant sind und wenn ja unter welchen Bedingungen. *dnaA* kodiert das essentielle und hoch konservierte Replikationsinitiationsprotein, das vermutlich auch als Transkriptionsregulator fungieren kann (Messer, 2002), *NCgl0532* die SecY-Untereinheit der Sec-Translokase, *NCgl0531* einen Transkriptionsregulator, *nrdH* ein Glutaredoxin-ähnliches Protein und *nadE* eine NAD⁺-Synthetase. Dass MtrA auch an die Promotorregion von *dnaA* bindet deutet an, dass *dnaA* ein direktes Zielgen von MtrA ist. Dies stimmt mit den Beobachtungen in *M. tuberculosis* überein, wo *dnaA* ein direktes Zielgen des Antwortregulators MtrA zu sein scheint (Fol *et al.*, 2006). Damit ist das erste gemeinsame Zielgen von MtrA aus *C. glutamicum* und MtrA aus *M. tuberculosis* (mMtrA) identifiziert. Dies unterstützt die Vermutung, dass MtrA in allen Organismen ein zumindest teilweise überlappendes Spektrum an Zielgenen hat und somit teilweise die gleichen physiologischen Funktionen. Auf der anderen Seite scheint die Erkennungssequenz von MtrA nicht mit der von mMtrA identisch zu sein, da MtrA unter den gewählten Bedingungen nicht an die Promotorregion von *dnaA* aus *M. tuberculosis* bindet. Daher kann man aus der Tatsache, dass MtrA aus *C. glutamicum* stromaufwärts von *Rv0867* und zwischen den divergent lokalisierten Genen *Rv0951* und *Rv0950c* bindet, nicht zwangsläufig schließen, dass auch mMtrA dort bindet. *Rv0951* kodiert für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthetase, *Rv0950c* für eine putative Metallopeptidase und *Rv0867c* für Protein mit unbekannter Funktion.

In allen Fragmenten, an die MtrA bindet, konnte mittels der MEME-Software eine Sequenz identifiziert werden (Tab. 9), die dem mittels Mutationsanalysen verifizierten Bindemotiv (Abb. 23) ähnlich ist. Dieses Bindemotiv (Abb. 28) besteht aus 19 Basen bzw. aus einer direkten Wiederholung aus je acht Basen, die durch drei beliebige Basen getrennt sind (8-3-8-Form). Die Bindung von OmpR-Typ-Antwortregulatoren an „direct repeats“ ist typisch (Martinez-Hackert and Stock, 1997). So binden z. B. auch MprA aus *M. tuberculosis* und

PhoP aus *Bacillus subtilis* an „direct repeats“. Im Falle von MprA besteht die Bindestelle ebenfalls aus der 8-3-8-Form (He *et al.*, 2006), wohingegen PhoP an eine direkte Wiederholung aus je sechs Basen bindet, die durch fünf beliebigen Basen getrennt werden (Liu *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass ein DNA-Bindemotiv etwa fünf Basen erkennt (Müller-Hill, 1996) lässt vermuten, dass MtrA als Dimer an die DNA bindet. Die Untersuchungen, in welcher Form MtrA in Lösung vorliegt, ergaben kein eindeutiges Ergebnis. Sowohl in nativen Acrylamidgelen als auch bei der Gelfiltrationschromatographie konnte für MtrA ein Molekulargewicht zwischen dem eines Monomers (27,1 kDa) und dem eines Dimers (54,2 kDa) bestimmt werden. Um dieses Laufverhalten erklären zu können, kann man sich die bereits gelöste Kristallstruktur von mMtrA zu nutze machen. MtrA aus *C. glutamicum* und aus *M. tuberculosis* gehören zur OmpR-Familie der Antwortregulatoren, die sich durch ein „winged Helix-turn-Helix“ (wHTH)-Motiv auszeichnet (Kenney, 2002). Die Sequenzidentität zwischen MtrA und mMtrA beträgt 72 %, so dass man von der mMtrA-Struktur auf die MtrA-Struktur aus *C. glutamicum* rückschließen kann. Der Antwortregulator MtrA aus *M. tuberculosis* konnte als Calcium-Komplex mit einer Auflösung von 2,1 Å kristallisiert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=39480>). Dabei war ein Ca^{2+} - anstelle eines Mg^{2+} -Ion in der Regulator-Domäne lokalisiert (pinker Teil in Abb. 30). Dieser Austausch könnte auf die Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen im Kristallisationsansatz zurückzuführen sein. Die nahezu vollständig gelöste Kristallstruktur macht deutlich (Abb. 30), dass MtrA eine für Antwortregulatoren typische Zwei-Domänen-Struktur besitzt und als Monomer vorliegt. Diese Struktur könnte das Laufverhalten in der Größenausschlusschromatographie erklären. MtrA verhält sich vermutlich wie ein Protein mit größerem Molekulargewicht, da kugelige Proteine und somit auch alle Standardproteine ein größeres Masse-zu-Volumen-Verhältnis haben. Somit deutet die experimentell bestimmte Masse (31,3 kDa) an, dass MtrA in Lösung als Monomer vorliegt. Vermutlich begünstigt die Bindung von MtrA an die DNA und/oder seine Phosphorylierung die Dimerisierung von MtrA. Dies ist z.B. für OmpR aus *E. coli* gezeigt worden. OmpR liegt in Lösung als Monomer vor und seine Dimerisierung wird sowohl durch Phosphorylierung als auch durch Bindung an die DNA stimuliert (Maris *et al.*, 2005).

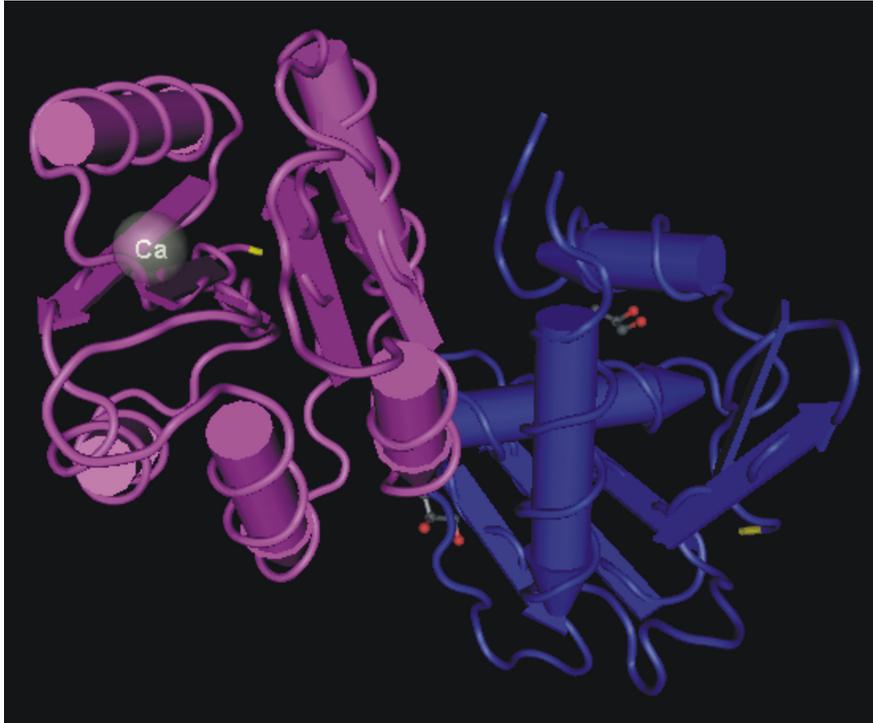


Abb. 30: Kristallstruktur des MtrA-Ca²⁺-Komplexes aus *M. tuberculosis*. Die N-terminale Regulator-Domäne ist in pink dargestellt und die C-terminale Effektor-Domäne in blau. N- und C-Terminus sind in gelb hervorgehoben.

3 Funktion des MtrAB-Zweikomponentensystems

Die Funktionen der durch die Zielgene von MtrA kodierten Proteine lassen sich auf den ersten Blick nicht in eine gemeinsame Klasse einordnen. Einige spielen z. B. eine Rolle bei verschiedenen Stresssituationen. So werden BetP und ProP bei der hyperosmotischen Stressantwort benötigt, KatA bei oxidativem Stress, MepA, MepB, NlpC und PpmA vermutlich in „cell envelope“-Stress und CsbD evtl. bei bisher unbekanntem Stresssituationen. In *Bacillus subtilis* gehört *csbD* zu dem Regulon der σ^B -abhängigen allgemeinen Stressantwort (Pragai and Harwood, 2002). Ob *csbD* in *C. glutamicum* neben MtrA auch noch durch σ^B oder einen anderen Sigmafaktor reguliert wird, ist bisher nicht bekannt. Die Funktionen dieser Zielgene lassen vermuten, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem auf eine Reihe verschiedener Stresssituationen wie „cell envelope“-Stress, hyperosmotischen Stress und oxidativen Stress reagiert und eine allgemeine zelluläre Stressantwort auslöst. Die putativen Peptidasen MepA, MepB und NlpC könnten darüber hinaus auch bei der Zellwandsynthese oder beim Zellwand-„turnover“ eine Rolle spielen, so dass es ebenfalls denkbar ist, dass MtrA einen regulatorischen Einfluss auf diese Prozesse innerhalb der Zelle hat. Die mögliche Regulation der Transkription von *dnaA* durch MtrA zeigt, dass das MtrAB-Zweikomponentensystem auch bei der Regulation der Replikation und zusammen mit MepA, MepB und NlpC bei der Zellteilung eine Rolle spielen

könnte. Da MtrA auch einen Einfluss auf die Transkription von *rpf2* hat, könnte das MtrAB-Zweikomponentensystem in die interzelluläre Kommunikation von *C. glutamicum* involviert sein (Hartmann *et al.*, 2004). MtrA könnte z. B. dafür sorgen, dass unter bestimmten Stressbedingungen das Wachstum eingestellt wird. In *E. coli* scheint der Zellzyklus bzw. die Zellteilung unter anderem ebenfalls durch verschiedene Stresssituationen, wie z. B. die SOS- oder Hitzeschockantwort, beeinflusst zu werden (Donachie, 1993; Wick and Egli, 2004). Daher ist die gleichzeitige Regulation von Genen, die an der Stressantwort und an der Zellteilung beteiligt sind, nicht verwunderlich. In *M. tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass *mtrA* unter der Kontrolle von SigC, einem alternativen RNA-Polymerase Sigmafaktor, der in der exponentiellen Wachstumsphase transkribiert wird, steht (Sun *et al.*, 2004). Dieser Sigmafaktor gehört zur Gruppe der ECF-Sigmafaktoren (ECF steht für „extracytoplasmatic function“), die in der Regel Prozesse regulieren, die nach „außen“ gerichtet sind, wie z. B. Transport und Sekretion. Der ECF-Sigmafaktor σ^E spielt z. B. bei periplasmatischem oder „cell envelope“- Stress und bei Hitzestress eine Rolle (Helmann, 2002; Wick and Egli, 2004). Ob die Transkription von *mtrA* in *C. glutamicum* ebenfalls durch SigC oder einen anderen Sigmafaktor reguliert wird, ist unbekannt. Dass jedoch Sigmafaktoren und Zweikomponentensysteme zusammen auf eine Art von Stress reagieren, ist schon in *E. coli* gezeigt worden. Dort ist z. B. die „cell envelope“-Stressantwort abhängig von dem ECF-Sigmafaktor σ^E und den Zweikomponentensystemen CpxA/CpxR und BaeS/BaeR, wobei die generelle Stressantwort in *E. coli* in erster Linie nur durch σ^S reguliert wird (Wick and Egli, 2004). Ob die Acetyltransferase (kodiert durch *NCgI1368*), die möglicherweise am Häm-Transport beteiligten Proteine (kodiert durch *NCgI0381* und *NCgI0381*) und die Proteine, denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, in der Stress-Antwort, beim Zellwandmetabolismus oder beim Zellzyklus eine Rolle spielen oder ob das MtrAB-Zweikomponentensystem noch andere Aufgaben erfüllt, in die diese Proteine involviert sind, ist noch nicht klar.

Da das Gencluster, das MtrA, MtrB und LpqB kodiert, in fast allen sequenzierten Actinobacteria hoch konserviert ist, vermuten Hoskisson und Hutchings, dass das Lipoprotein LpqB eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion durch das MtrAB-Zweikomponentensystem spielt. LpqB könnte mit der Sensorkinase MtrB interagieren und dadurch die Aktivität von MtrB modulieren (Hoskisson and Hutchings, 2006). Ob diese Hypothese zutrifft und welche Rolle LpqB in *C. glutamicum* spielt, muss in weiterführenden Experimenten noch geklärt werden.

Die Tatsache, dass einige der direkten Zielgene einen veränderten mRNA-Level in der $\Delta mtrAB$ - bzw. der $\Delta mtrA$ -Mutante verglichen mit dem Wildtyp aufwiesen, zeigt, dass MtrA unter den von uns verwendeten Standardbedingungen als Transkriptionsregulator aktiv ist und evtl. schon verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt zu sein scheint.

Fasst man die Ergebnisse aus *C. glutamicum* zusammen (vgl. Abb. 31), so scheint es, dass MtrAB eine generelle Stressantwort auslöst. Darüber hinaus könnte MtrA sowohl bei der Regulation der Zellwandsynthese oder des Zellwand-„turnover“ als auch bei der Regulation der Zellteilung und des Zellzyklus eine Rolle spielen.

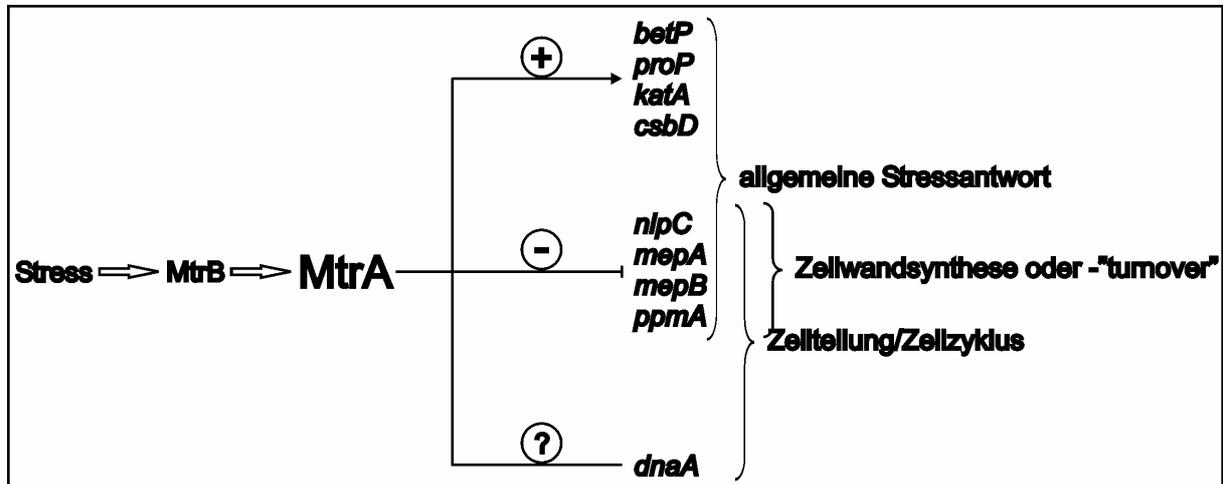


Abb. 31: Modell zur regulatorischen Funktion des MtrAB-Zweikomponentensystems aus *C. glutamicum*.

VII Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K., and Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**: 279-301.
- Akbar, S., Lee, S.Y., Boylan, S.A., and Price, C.W. (1999) Two genes from *Bacillus subtilis* under the sole control of the general stress transcription factor σ^B . *Microbiology* **145 (Pt 5)**: 1069-1078.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003) Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol* **4**: R11.
- Babu, M.M., and Teichmann, S.A. (2003) Functional determinants of transcription factors in *Escherichia coli*: protein families and binding sites. *Trends in Genetics* **19**: 75-79.
- Belanger, A.E., Besra, G.S., Ford, M.E., Mikusova, K., Belisle, J.T., Brennan, P.J., and Inamine, J.M. (1996) The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *PNAS* **93**: 11919-11924.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bott, M., Meyer, M., and Dimroth, P. (1995) Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* **18**: 533-546.
- Brocker, M. (2003) Das MtrAB-Zweikomponenten-System von *Corynebacterium glutamicum*: Identifizierung von Zielgenen. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Brocker, M., and Bott, M. (2006) Evidence for activator and repressor functions of the response regulator MtrA from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiology Letters*: **264**: 205-212.
- Cangelosi, G.A., Do, J.S., Freeman, R., Bennett, J.G., Semret, M., and Behr, M.A. (2006) The two-component regulatory system *mtrAB* is required for morphotypic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 461-468.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R. (2003) *Candida albicans* Response Regulator Gene SSK1 Regulates a Subset of Genes Whose Functions Are Associated with Cell Wall Biosynthesis and Adaptation to Oxidative Stress. *Eukaryotic Cell* **2**: 1018-1024.
- Clauser, K.R., Baker, P., and Burlingame, A.L. (1999) Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* **71**: 2871-2882.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E. (2004) WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* **14**: 1188-1190.

- Donachie, W.D. (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology* **47**: 199-230.
- Eggeling, L., and Sahm, H. (2001) The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *JBB* **92**: 201-213.
- Eggeling, L., and Bott, M. (2005) *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., and Sahm, H. (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-14868.
- Fol, M., Chauhan, A., Nair, N.K., Maloney, E., Moomey, M., Jagannath, C., Madiraju, M.V., and Rajagopalan, M. (2006) Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Mol Microbiol* **60**: 643-657.
- 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.
- Gioffre, A., Infante, E., Aguilar, D., Santangelo, M.D.I.P., Klepp, L., Amadio, A., Meikle, V., Etchechoury, I., Romano, M.I., and Cataldi, A. (2005) Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes and Infection* **7**: 325-334.
- 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*. Glover, D.M. (ed): IRL-Press, pp. 109-135.
- Hartmann, M., Barsch, A., Niehaus, K., Pühler, A., Tauch, A., and Kalinowski, J. (2004) The glycosylated cell surface protein Rpf2, containing a resuscitation-promoting factor motif, is involved in intercellular communication of *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **182**: 299-312.
- Haydel, S.E., and Clark-Curtiss, J.E. (2004) Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiology Letters* **236**: 341-347.
- He, H., Hovey, R., Kane, J., Singh, V., and Zahrt, T.C. (2006) MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **188**: 2134-2143.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47-110.

- Hoskisson, P.A., and Hutchings, M.I. (2006) MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria? *Trends in Microbiology* **14**: 444-449.
- Hubbard, B.K., and Walsh, C.T. (2003) Vancomycin Assembly: Nature's Way. *Angewandte Chemie International Edition* **42**: 730-765.
- Jäger, W., Schafer, A., Puhler, 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.
- Jones, B.N., and Gilligan, J.P. (1983) *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr* **266**: 471-482.
- Kaspar, S., Perozzo, R., Reinelt, S., Meyer, M., Pfister, K., Scapozza, L., and Bott, M. (1999) The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol* **33**: 858-872.
- Kaspar, S. (2001) Charakterisierung der Sensor-Kinasen CitA aus *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* als Citrat-Rezeptoren. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät: Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.
- Kenney, L.J. (2002) Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 135-141.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O., and Yanofsky, C. (2000) DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12170-12175.
- Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**: 193-205.
- Kocan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, 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**: 724-732.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lindroth, P., and Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by pre-column fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal Chem* **51**: 1667-1674.

- 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.
- Liu, W., Qi, Y., and Hulett, F.M. (1998) Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Molecular Microbiology* **28**: 119-130.
- Maris, A.E., Walthers, D., Mattison, K., Byers, N., and Kenney, L.J. (2005) The Response Regulator OmpR Oligomerizes *via* β -Sheets to Form Head-to-head Dimers. *Journal of Molecular Biology* **350**: 843-856.
- Martinez-Hackert, E., and Stock, A.M. (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *Journal of Molecular Biology* **269**: 301-312.
- Matsubara, M., Kitaoka, S.-i., Takeda, S.-i., and Mizuno, T. (2000) Tuning of the porin expression under anaerobic growth conditions by His-to-Asp cross-phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes to Cells* **5**: 555-569.
- Messer, W. (2002) The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 355-374.
- Mizuno, T. (2005) Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 2263-2276.
- Möker, N., Brocker, M., Schaffer, S., Krämer, R., Morbach, S., and Bott, M. (2004) Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. *Mol Microbiol* **54**: 420-438.
- Müller-Hill, B. (1996) *The Lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Niebisch, A., and Bott, M. (2001) Molecular analysis of the cytochrome *bc₁-aa₃* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c₁*. *Arch Microbiol* **175**: 282-294.
- Oka, A., Sakai, H., and Iwakoshi, S. (2002) His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* **77**: 383-391.
- Patek, M., Nesvera, J., Guyonvarch, A., Reyes, O., and Leblon, G. (2003) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 311-323.

- Peter, H., Burkovski, A., and Krämer, R. (1996) Isolation, characterization, *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding and expression of the the transport system for the compatible solute glycine betaine. *J Bacteriol* **178**: 5229-5234.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Kramer, R., and Morbach, S. (1998) *Corynebacterium glutamicum* Is Equipped with Four Secondary Carriers for Compatible Solutes: Identification, Sequencing, and Characterization of the Proline/Ectoine Uptake System, ProP, and the Ectoine/Proline/Glycine Betaine Carrier, EctP. *J. Bacteriol.* **180**: 6005-6012.
- Pragai, Z., and Harwood, C.R. (2002) Regulatory interactions between the Pho and σ^B -dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **148**: 1593-1602.
- Radmacher, E., Stansen, K.C., Besra, G.S., Alderwick, L.J., Maughan, W.N., Hollweg, G., Sahm, H., Wendisch, V.F., and Eggeling, L. (2005) Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **151**: 1359-1368.
- Robinson, V.L., Buckler, D.R., and Stock, A.M. (2000) A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* **7**: 626-633.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, 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.
- Schneider, K., Dimroth, P., and Bott, M. (2000) Biosynthesis of the prosthetic group of citrate lyase. *Biochemistry* **39**: 9438-9450.
- Schwarzer, A., and Pühler, A. (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N Y)* **9**: 84-87.
- Shalon, D., Smith, S.J., and Brown, P.O. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**: 639-645.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**: 32678-32684.
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J.N., and et al. (1997)

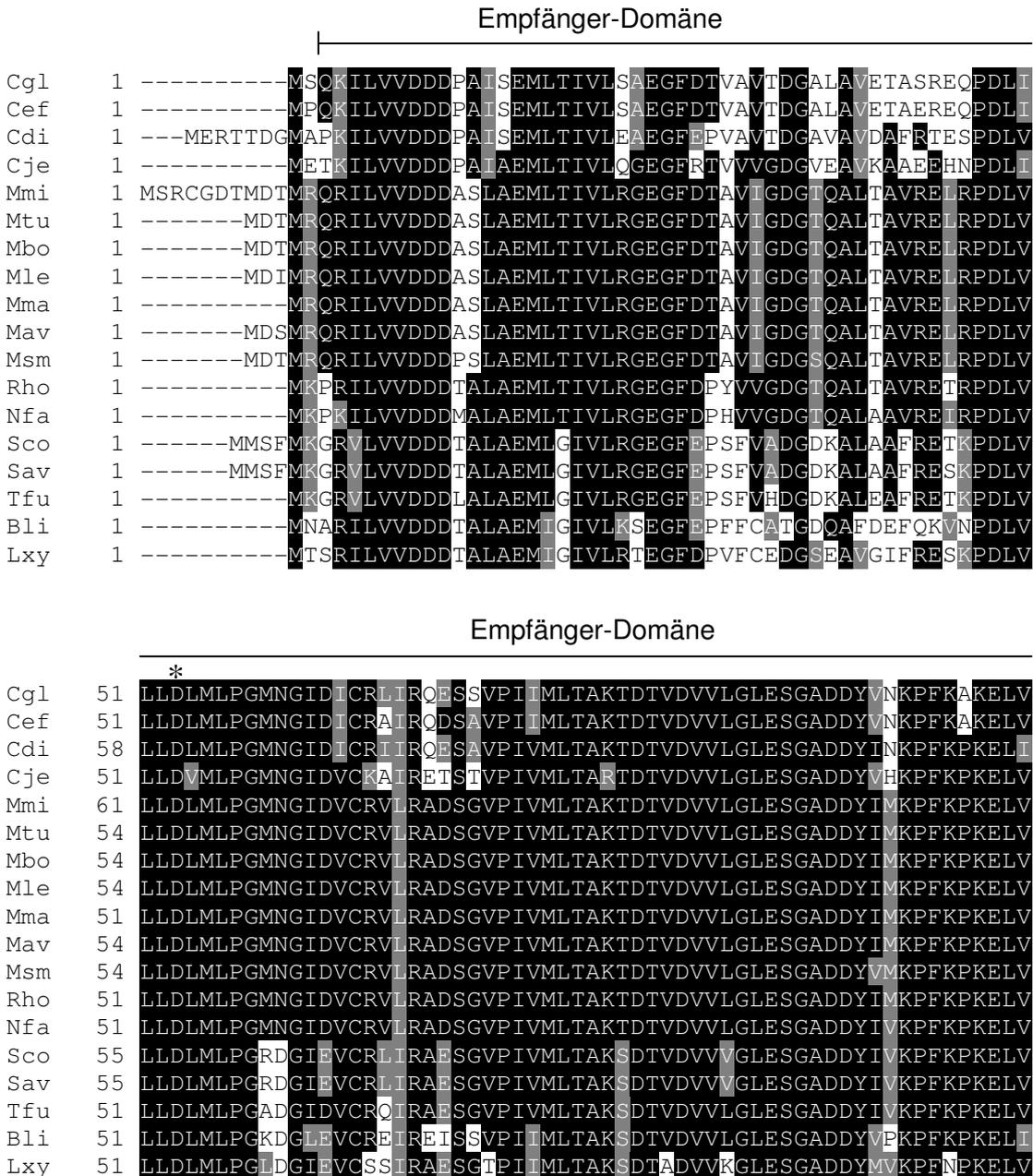
- Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* **179**: 7135-7155.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- 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 Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Sun, R., Converse, P.J., Ko, C., Tyagi, S., Morrison, N.E., and Bishai, W.R. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Molecular Microbiology* **52**: 25-38.
- Tam, R., and Saier, M.H.J. (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 320-345.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- van der Rest, M.E., Lange, C., and Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 541-545.
- Via, L.E., Curcic, R., Mudd, M.H., Dhandayuthapani, S., Ulmer, R.J., and Deretic, V. (1996) Elements of signal transduction in *Mycobacterium tuberculosis*: *in vitro* phosphorylation and *in vivo* expression of the response regulator MtrA. *J Bacteriol* **178**: 3314-3321.
- Wendisch, V.F., Zimmer, D.P., Khodursky, 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**: 205-213.
- Wennerhold, J., and Bott, M. (2006) The DtxR regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **188**: 2907-2918.
- Wessel, M. (2003) Funktionelle Analyse des essentiellen Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems CgtSR4 aus *Corynebacterium Glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

- Wick, L.M., and Egli, T. (2004) Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**: 1-45.
- Wingens, M. (2004) Charakterisierung des Zweikomponenten-Signaltransduktionssystems CgtSR4 aus *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Wright, G.D., Holman, T.R., and Walsh, C.T. (1993) Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* **32**: 5057-5063.
- Zahrt, T.C., and Deretic, V. (2000) An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **182**: 3832-3838.
- Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A., and Kustu, S. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14674-14679.

VIII Anhang

A1 Alignment von MtrA aus verschiedenen Corynebakterien und Mykobakterien

Abb. 32: Sequenzalignment des MtrA-Proteins aus *C. glutamicum* (Cgl), *C. efficiens* (Cef), *C. diphtheriae* (Cdi), *C. jeikeium* (Cje), *M. microti* (Mmi), *M. leprae* (Mle), *M. marinum* (Mar), *M. tuberculosis* (Mtu), *M. bovis* (Mbo), *M. avium* (Mav), *M. smegmatis* (Msm), *Rhodococcus* (Rho), *Nocardia farcinica* (Nfa), *Streptomyces coelicolor* (Sco), *Streptomyces avermilitis* (Sav) *Thermobifida fusca* (Tfu), *Brevibacterium linens* (Bli) und *Leifsoniy xyli* (Lxy). Die mögliche Phosphorylierungsstelle in *C. glutamicum* ist mit einem * gekennzeichnet.



Sensor-Domäne

```

Cgl 42 ASSEIDRARVIVVEEQITASGASTSVQ-----ARVNSARAALSSSLGT-SG-GTETNAAY
Cef 26 ANSEIDRARVIVVEEQIAASSASSSVQ-----LRLNSARAALASLGS-SGSGGDVTAAY
Cdi 40 ASSEIDRARASVEEQIESTGSSSSVQ-----VRLNSARAVLTSRAT-SA---DDTAAY
Cje 108 AVDSMDRARTAVEEQIGATDSSNPVS-----VRLTSARAVLTNR-S-TGVEQSSAPVY
Mbo 77 AIDQIERARTTVSGIVNGE-ETRSLD-----SSLQLARNLTLSKTD-PASGAGLAGAF
Mmi 77 AIDQIERARTTVSGIVNGE-ETRSLD-----SSLQLARNLTLSKTD-PASGAGLAGAF
Mtu 77 AIDQIERARTTVSGIVNGE-ETRSLD-----SSLQLARNLTLSKTD-PASGAGLAGAF
Mma 77 AIDQIERARNTVSGIVNGE-ETRSLD-----SSLQLARNLTLSKTD-PASGAGQAGAF
Mle 77 AIEQIERARTTVTGIVNGE-ETRSLD-----SSLQLARNLTLSKTD-PTSGAGLVGAF
Mav 76 AIEQIERARTTVGGIVNGE-EARSLD-----SSLQLARNLTLSKTD-SASGAGTAGTF
Msm 77 ATEEVERARNTVSGIVGGE-ESRSLD-----SSLQLARNLTVDKKA-DVR-ADMAGAF
Rho 52 ATEEVERSRALVEGQLAGADDSGSLQ-----VRLDGAAAALTNRGSACQDTCVACTF
Nfa 95 AVEEMGRARNTVESQLAGVHDLGTQQ-----QRLADARSALSNRGG-SCRSTGAAGSF
Sco 58 SQSQATGGFTAAKQKAEAAASTNG-DDGTPADGRPSQNVIQWMSSELVKSLSS--GGQSAF
Sav 110 SQSQAVGGFTVAGQRADSTASASGGDENAGAAGTPVQNVSGWMTDLVASLSS--GGQSAF
Tfu 98 AFSDHHMGLTAALGIIQDSG-----QQDPERQLDEIVEELSARSGATGLY
Bli 72 LS---SQAGTIIVSELRLSLAPVDGQAVTQ-----ENLSSQLSSIYNRSTGVSVYSLSLPESD
Lxy 65 ALRDSSRATTAAQATLNASDVSAAGDSGK-----NLLTTALQSVQGSTSSRLVAAYRVPGQ

```

Sensor-Domäne

```

Cgl 93 DPVVLVNNDD-----LVSPEGYQIPERLRYFVSENOVSYQFSSIDQGDGSSY-
Cef 78 EPVILVDGAD-----VIVSPEGYRIPDRLRYVSENOVSYQFSSIDQGDGAAY-
Cdi 89 EPVLVSNPDG-----STVTSPEGYRIPERLRSFVDQGVSYQFATIDRVDGSTY-
Cje 159 DSVLIASNASD-----AETRI PDNIDIPANLREFVVRQGVAYQYARVD-GENGTY-
Mbo 128 DAVLMVPGDGP-----RAASTAGPVDQVPNALRGFVKAGQAAAYQYATVQT-EGFSG-
Mmi 128 DAVLMVPGDGP-----RAASTAGPVDQVPNALRGFVKAGQAAAYQYATVQT-EGFSG-
Mtu 128 DAVLMVPGDGP-----RAASTAGPVDQVPNALRGFVKAGQAAAYQYATVQT-EGFSG-
Mma 128 DAVLMVPGDGP-----RAASAAGPVDQVPSALRGFVKAGQAAAYQYATVHT-DGFSG-
Mle 128 DAVLIVPGDGP-----RTATTAGPVDQVPNSLRGFVKAGQAAAYQYATVHT-EGFSG-
Mav 127 DAVLMVPGDGP-----RAATTAGPVDQVPASLRGFVKAGQASYQYATVHT-DGFSG-
Msm 127 DAVLVVPGDGP-----RAAAAAGPVAQIPEALRDFVKAGQVSYQYATVQT-EGFSG-
Rho 105 DPVLI VPGDGP-----RAPTSAGPADQIPENLRAFVQKQOISYQFATVSDPDGYSG-
Nfa 147 DSALSMVGGTP-----QQQIATGPIQEVPEELRRFVQRNQSRYQFATVADPDGMHG-
Sco 115 DVVTLPMGGESGSGR--GPRASGSVDWAVSVPEALRERIDGDTAAAQS--YTRIVYNSD-
Sav 168 DVVTLSTRAADNENRGLGPRASGGVEEISLSPVEGLRKRVDAGLVAQS--YTRIVYTDHG
Tfu 143 DVVILPSVGG-----MTGRASGGVG-EASIPAQLREEVQNSNGDTQHCRYTEIRGPN-
Bli 124 PNSSFSTVSAG-----KTESDGSAAVEVPATDELKEAIGKAPTDDMLYQSVLPDGS--
Lxy 120 DTSILAPPDR-----GSPALNPVTSAPLRLTLVQNGGTKQFYQSVLPAGTGS-

```

Sensor-Domäne

Transmembranhelix

Cgl 141 ----QALIIGTPTES-DIPNLQVYLVFSMESDESSLALMRGLLSAALLIVVVLLVGIAWL
 Cef 126 ----NALIIGTPTES-DIPGLQVYLVFSMENDEASLALMRGLLSAALVVVVVLLVGIAWL
 Cdi 139 ----KALIIGSPTAS-DIPNTQVYLVLSMESDEATLALLRGLFSGAAVVLVLLVGITWL
 Cje 208 ----KALIIGSPVYS-DIPGLELYLVPLTSEEATINLMRGLLMAGGIVLIILLLVISWV
 Mbo 178 ----PALIIGTPTLS-RVANLELYLIFPLASEQATITLVRGTMATGGLVLLVLLAGIALL
 Mmi 178 ----PALIIGTPTLS-RVANLELYLIFPLASEQATITLVRGTMATGGLVLLVLLAGIALL
 Mtu 178 ----PALIIGTPTLS-RVANLELYLIFPLASEQATITLVRGTMATGGLVLLVLLAGIALL
 Mma 178 ----PALIIGTPTSS-RVANLELYLIFPLANEQATITLVRGTMATGSLVLLVLLAGIALL
 Mle 178 ----PALIIGTPTSS-QVTNLELYLIFPLKNEQATITLVRGTMATGGMVLLVLLSGIALL
 Mav 177 ----PALIVGSPASS-QVANLELYLIFPLKNEQATIQLVRGTMITGGAVLLVLLAGIALL
 Msm 177 ----PALIVGSPTTS-SVPNLELYLIFPLNNEESTIALVRGTMATGGVVLLGLLAAIALV
 Rho 156 ----PALIVGTPTAS-DISTLELYLVFPLAGEENTLSLVRGTLVVGAVLLVLLAAITSMI
 Nfa 198 ----RALIIGSPSA--EIPTLEYLVFPLVNEERSLALMRGTMMIGGLVLLVLLAAITALL
 Sco 170 QPSQPGLVIGKQVNDPNGEPYQLYYLFPLTQEEKSLSLVRGTLATAGLEVVVLLGAIWAL
 Sav 226 REAQPALIIGKQVNDPNGDPYQLYYLFPLTQEEKSLSLVKGTATAGLEVVVLLGAIWAL
 Tfu 195 --REPGLAVGAQLSS----AYELYLLEPLDHEQQMLDLVQRTLALVASVMVLLAAIAXV
 Bli 176 ----PGLLITQELQIPGAGQFQLYLLGDLSEQQDTLDFVQRSMLVAALVLLVVLGAVAWI
 Lxy 167 -TDPGIVVGTQLTLPSYGHYELYIGYNLRDSEITLIFVQNTLLFAGLALIALIGGIWV

┌───┐
 ┌───┐

Cgl 196 ATQQVTPVRSASRIAERFAQGKLRERMVVEGEDEMARLAVSFNMAESLSAQITKLEEEY
 Cef 181 ATQQVTPVRSASRIAERFAQGKLRERMVVDGEDEMARLAVSFNMAESLSAQITKOLEEY
 Cdi 194 LTQQVITPVRSASRIAERFSSGHLRERMVVTGEDEMARLAVSFNSMAESLSRQITHOLEEY
 Cje 263 FSQQITGPVRAASKIAEKLAAGHLHERMVVDGQDEVARLAVSFNDMAEKLSTQIRNLEEF
 Mbo 233 VSRQVVVPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Mmi 233 VSRQVVVPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Mtu 233 VSRQVVVPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Mma 233 VSRQVVVPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Mle 233 VSRQVVVPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Mav 232 VSRQVVVPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Msm 232 VARQIVQPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Rho 211 VARQVVLPIRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNMAESLSRQITAOLEEF
 Nfa 252 VTRQVVLPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNMAESLSRQITAOLEEF
 Sco 230 VVRQVVTPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Sav 286 VVRQVVTPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Tfu 249 VTRQVVTPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Bli 232 VTRLVVTPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF
 Lxy 225 VVRQVVTPVRSASRIAERFAEGHLSERMPVRGEDDMARLAVSFNDMAESLSRQITAOLEEF

Kinase-Domäne

Cgl	376	I E R I I R N L L A N A I D H S K G L P V E L K V A D N V -- D A V A I T V V I D H G V G L K P G Q E L V E N R F W R A
Cef	361	I E R I V R N L L A N A I D H A R G R P V E V T L R A N D -- E A V A I T V L D H G V G L K S G Q E E L V E N R F W R A
Cdi	374	I E R I L R N L L A N A I D H S E G K P V T L L C R E N D -- E A V S V A V I D H G V G L K P G Q E D L V E N R F W R A
Cje	443	V E R I L R N L L A N A V D H S E G K P I E V K M A V G E -- D A I A V A V T D H G V G L K P G E E E M V E N R F W R S
Mbo	413	V E R I L R N L I A N A I D H A E H K P V R I R M A A D E -- D T V A V T V R D Y G V G L R P G E E K L V F S R F W R S
Mmi	413	V E R I L R N L I A N A I D H A E H K P V R I R M A A D E -- D T V A V T V R D Y G V G L R P G E E K L V F S R F W R S
Mtu	413	V E R I L R N L I A N A I D H A E H K P V R I R M A A D E -- D T V A V T V R D Y G V G L R P G E E K L V F S R F W R S
Mma	413	V E R I L R N L I A N A I D H A E H K P V R I R M A A D E -- D T V A V T V R D Y G V G L R P G E E K L V F S R F W R A
Mle	413	V E R I L R N L I A N A I D H S E H K P V R I R M A A D E -- D T V A V T V R D Y G I G L R P G E E K L V F S R F W R S
Mav	412	V E R I L R N L I A N A I D H A E H K P V K I R M A A D E -- D T V A V T V R D Y G V G L R P G E E K L V F S R F W R A
Msm	412	V E R I L R N L I A N A I D H A E S K P V Q I R M A A D E -- D T V A V T V R D F G V G L R P G E E K L V F S R F W R S
Rho	391	V E R I L R N L L A N A I D H G E G K P I L L R L R A D D -- N A A A F T V R D Q G V G C -----
Nfa	432	V E R V L R N L L A N A I D H S E G K P V L I R M R G D S E A N A V A F V V R D Q G V G L R P G E E K L V E N R F W R S
Sco	410	V E R V L R N L V V N A V E H G E G R D V V V K L A A A G -- G A V A V A V R D Y G V G L K P G E A T R V F S R F W R A
Sav	466	V E R V L R N L V V N A V E H G E G K D V V V K L A A A G -- G A V A V A V R D Y G V G L K P G E A T R V F S R F W R A
Tfu	429	I N R I L R N L I V N A I E H S E G K D V I V T A A A D R -- D A V A V A V R D F G V G L K E G E E H L C F D R F W R A
Bli	412	I T R I V R N L V V N A I E H G E S N P I D I Y V A S N A -- E A V A V S V R D H G V G M N E E Q V E H V E D R F W R A
Lxy	405	I R R V V R N L L G N A I E H G E G K P V V V T V D S N E -- T A V A L T V R D D G I G M N Q Q D V N H V E D R F W R A

Kinase-Domäne

Cgl	434	D P S R V R H S G G T G L G L A I S R E D A M L H G G N L D A A G T I G V G S I F R L V L P K E P H -----
Cef	419	D P S R V R H S G G T G L G L A I A R E D A I L H G G T L D A A G N L D V G S M F R L V I P R E P H -----
Cdi	432	D P S R V R H S G G T G L G L A I S R E D A I L H G G Q L S A A G R P G V G S M F L L T V P R V P K -----
Cje	501	D P S R E R R T G G T G L G L A I A K E D A N L H G G R L E A I G E I G V G A C F R L T L P M E Q G -----
Mbo	471	D P S R V R R S G G T G L G L A I S V E D A R L H Q G R L E A W G E P G E G A C F R L T L P L V R G -----
Mmi	471	D P S R V R R S G G T G L G L A I S V E D A R L H Q G R L E A W G E P G E G A C F R L T L P L V R G -----
Mtu	471	D P S R V R R S G G T G L G L A I S V E D A R L H Q G R L E A W G E P G E G A C F R L T L P M V R G -----
Mma	471	D P S R V R R S G G T G L G L A I S V E D A R L H Q G R L E A W G E P G Q G A C F R L T L P L V R G -----
Mle	471	D P S R V R R S G G T G L G L A I S I E D A R L H Q G R L E A W G E P G Q G A C F R L T L P L V R G -----
Mav	470	D P S R V R R S G G T G L G L A I S I E D A R L H Q G R L E A W G E P G V G S C F R L T L P L V R G -----
Msm	470	D P S R V R R S G G T G L G L A I S I E D A R L H Q G R L E A W G E P G K G A C F R L T L P L V R G -----
Rho	434	--V R A R R N S S S ----- T G S G A R T R ----- R G -----
Nfa	492	D P S R M R R S G G T G L G L S I S V E D A N L H D G R L E A W G E P G V G A S F R L T L P L V R G R K M G P S P L P L
Sco	468	D P A R A R T T G G T G L G L S I A I E D A R L H G G W L Q A W G E P G G G S Q F R L T L P R T A D -----
Sav	524	D P A R A R T T G G T G L G L S I A I E D A R L H G G W L Q A W G E P G G G S Q F R L T L P R T A D -----
Tfu	487	D P A R A R T T G G T G L G L A I A K E D A Q L H G G W L Q A W R P G K G A Q F R L S L P R V A G -----
Bli	470	D P A R K R T L G G S G L G L A I S L E D A H L H N G W L Q V W G K L G E G S C F R L T L P R R P D -----
Lxy	463	D P S R K R T I G G T G L G L A I S L E D V T L H S G W L Q V W S A P G E G S C F R L T L P R V P G -----

```

Cgl 484 -----GNYREAPIPLIAPETP-----
Cef 469 -----LGYRDAPLELAAPSQP-----
Cdi 482 -----RSFTETPIELAAPEPP-----
Cje 551 -----HIVKTSPLPLAVEAEG-----
Mbo 521 -----HKVTTSP LPMKPIQPV-----
Mmi 521 -----HKVTTSP LPMKPIQPV-----
Mtu 521 -----HKVTTSP LPMKPIQPV-----
Mma 521 -----HKVTTSP LPMKPIQ-----
Mle 521 -----HKVTTSP LPMKPILO-----
Mav 520 -----HKVTTSP LPMKPIQP-----
Msm 520 -----HKVTTSP LPLKPASEQ-----
Rho 453 -----SGGPAEPVSAWRSASRT-----
Nfa 552 EPAVRKAVPPRPAEPEAVDGDAPTM-----
Sco 518 -----EPLRGSPIPLEPTDSRRNRGLNDAGLADPAVAGGADKSVGVPVPAQVPAGQVSA
Sav 574 -----EPLRGSPIPLEPKDSRRNRGLNGAGLPLGGSGKLATVPVQFAGENAPPQMP
Tfu 537 -----TELRGSPLPLVPP-----
Bli 520 -----QEITSSPLPLPPRDAQIQGAALVAGPLSSDGSVRIQTGSIPIVVETGQTGPA
Lxy 513 -----GEIAASPLPLPP-----

```

```

Cgl 500 -----WEGEQQ-----
Cef 485 -----WEVEV-----
Cdi 498 -----LEDTDA-----
Cje 567 -----VTTQEQEGCE-----
Mbo 538 -----LQPVAQPNPQMPPEYKERQRPREHAE-----
Mmi 538 -----LQPVAQPNPQMPPEYKERQRPREHAE-----
Mtu 538 -----LQPVAQPNPQMPPEYKERQRPREHAE-----
Mma 536 -----PAAQPN----ALEHTDRLRPREHAE-----
Mle 536 -----PSPQASTAG--QQHGTQRQLREHAE-----
Mav 536 -----SPSGGQSPSTGPHAKDRARQREHAE-----
Msm 536 -----RPARRRSNKDRREHAE-----
Rho 470 -----PTSTT-----ASSRRGASPARCP-----
Nfa 577 -----PVPRTPEGPAADGAGSAAVSGAPAAEP-----
Sco 570 RGPIT--PRQATVAPTADPTALPGNGARVVPRPVSGARRQDGGPAPEAAGRQDAGPEEDSS
Sav 626 RAPMA--PRLATATPTADPTALPGNGARVVPRPAGGARKQNDTPPASGGRSTQEPPEESCS
Tfu 550 -----EMALGGN-----LSVLSGQQVDLETGRGT-----
Bli 572 HDGFVDEPEVISGDSAIIDDGTDIDTSDDETLDVDEAGTATEVSDDPDAANDSEARKCS
Lxy 525 -----IDADAAACA-----

```

```

Cgl -----
Cef -----
Cdi -----
Cje 577 DE-----
Mbo 565 WSG-----
Mmi 565 WSG-----
Mtu 565 WSG-----
Mma 557 WSG-----
Mle 560 RSR-----
Mav 562 RSL-----
Msm 551 ESV-----
Rho 488 ASG-----
Nfa 604 DSGGTGGAVLTEPGDEQS-----
Sco 628 RQGEASRGR-----
Sav 684 GQGEAFRGR-----
Tfu 574 SAGEEA-----
Bli 632 ETRKDSDTGRDSEGEPPDSDAEAGSSEPEPDAAGDAEIHIDMDTVWHPSTTPEGGSKS
Lxy 534 SRR-----AATEEPRP-----LPESGARA-----

```

A3 Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

pCR2.1-*mtrAB*

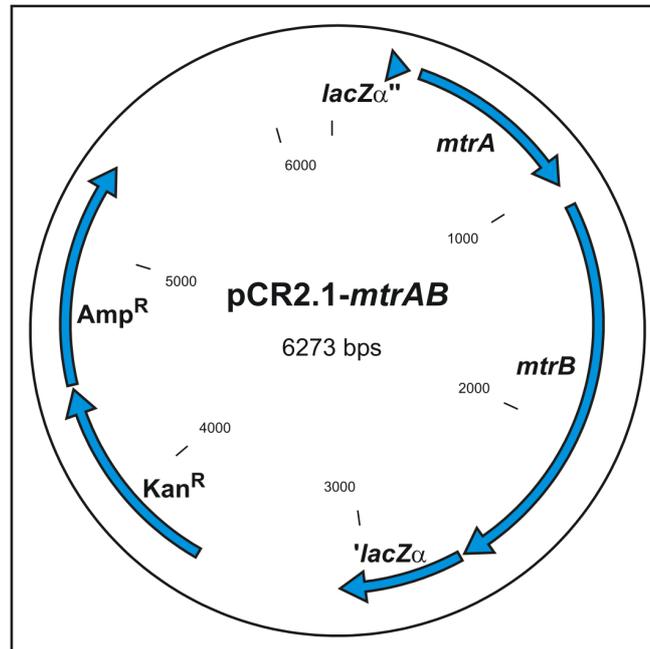


Abbildung 34: Plasmid pCR2.1-*mtrAB* mit einem 2,3 kbp PCR-Fragment (Primer MtrA_BamHI_fw und MtrB_BamHI_rv), das die *mtrAB*-Gene inkl. der putativen RBS aus *C. glutamicum* enthält.

pEKEx2-*mtrAB*

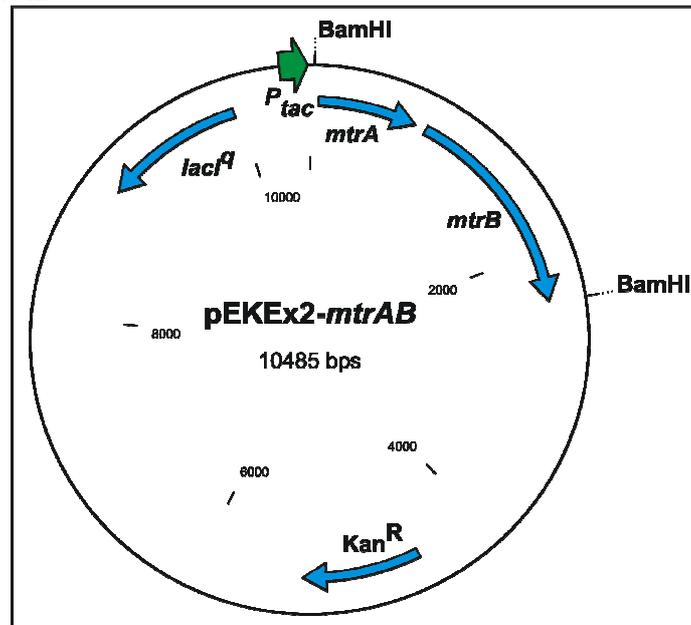


Abbildung 35: Plasmid pEKEx2-*mtrAB* mit einem 2,3 kbp PCR-Fragment, das die *mtrAB*-Gene inkl. der putativen RBS aus *C. glutamicum* enthält und zuvor aus dem pCR2.1-*mtrAB* mittels BamHI herausgeschnitten wurde, in der BamHI-Schnittstelle.

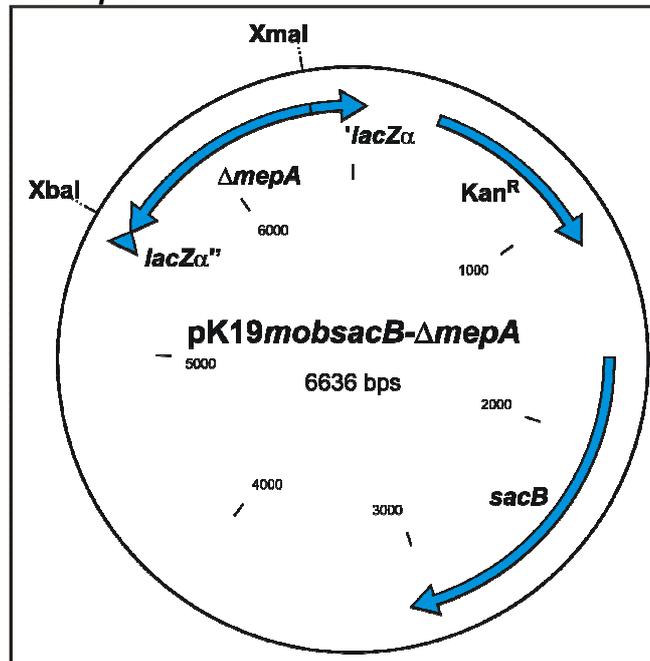
pK19mobsacB- Δ mepA

Abbildung 36: Plasmid pK19mobsacB- Δ mepA mit einem 925 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer Delta mepA-1, Delta mepA-2, Delta mepA-3, Delta mepA-4) in den XmaI- und XbaI-Schnittstellen, das die *mepA*-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* enthält.

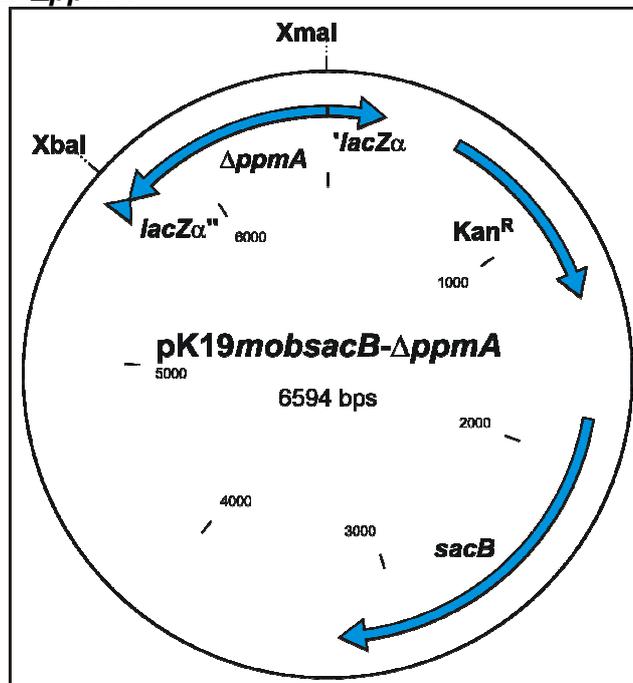
pK19mobsacB- Δ ppmA

Abbildung 37: Plasmid pK19mobsacB- Δ ppmA mit einem 883 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer Delta ppmA-1, Delta ppmA-2, Delta ppmA-3, Delta ppmA-4) in den XmaI- und XbaI-Schnittstellen, das die *ppmA*-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* enthält.

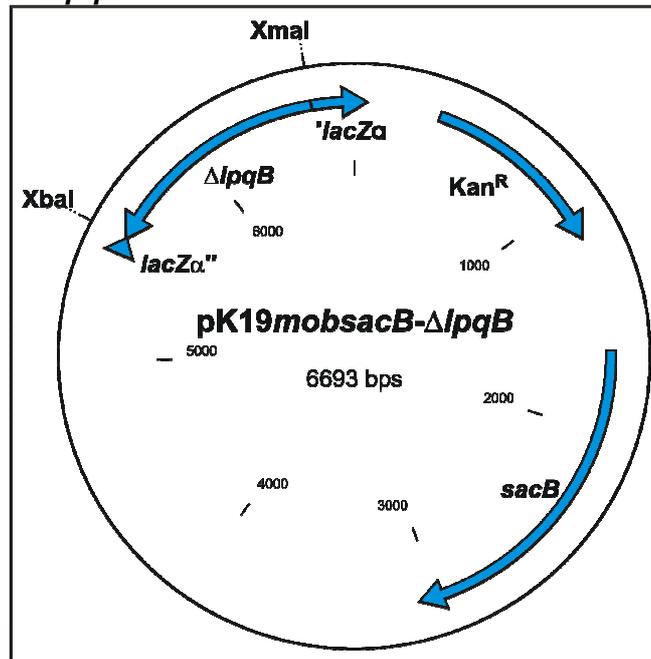
pK19mobsacB-ΔlpqB

Abbildung 38: Plasmid pK19mobsacB-ΔlpqB mit einem 982 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer Delta lpqB-1, Delta lpqB-2, Delta lpqB-3, Delta lpqB-4) in den Xmal- und XbaI-Schnittstellen, das die lpqB-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* ΔmtrAB enthält.

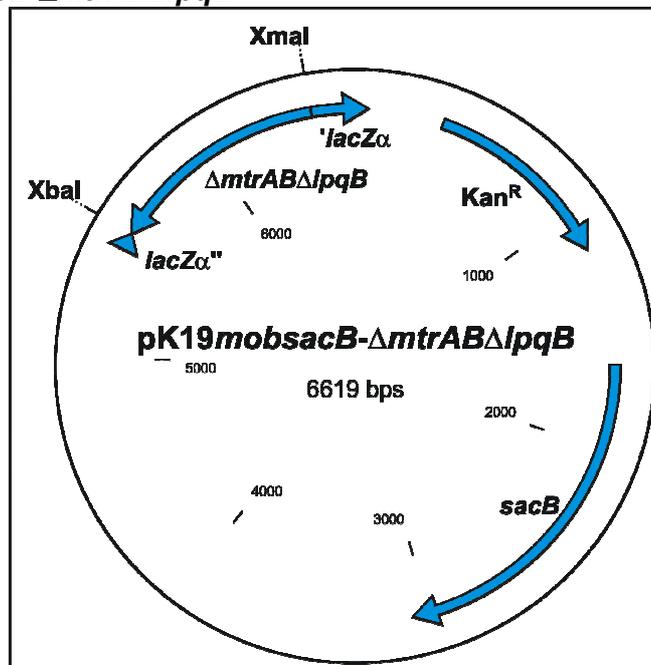
pK19mobsacB-ΔmtrABΔlpqB

Abbildung 39: Plasmid pK19mobsacB-ΔmtrABΔlpqB mit einem 908 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer Delta mtrAB lpqB-1, Delta mtrAB lpqB-2, Delta mtrAB lpqB-3, Delta mtrAB lpqB-4) in den Xmal- und XbaI-Schnittstellen, das den 5'-flankierenden Bereich von mtrA und den 3'-flankierenden Bereich von lpqB aus *C. glutamicum* enthält.

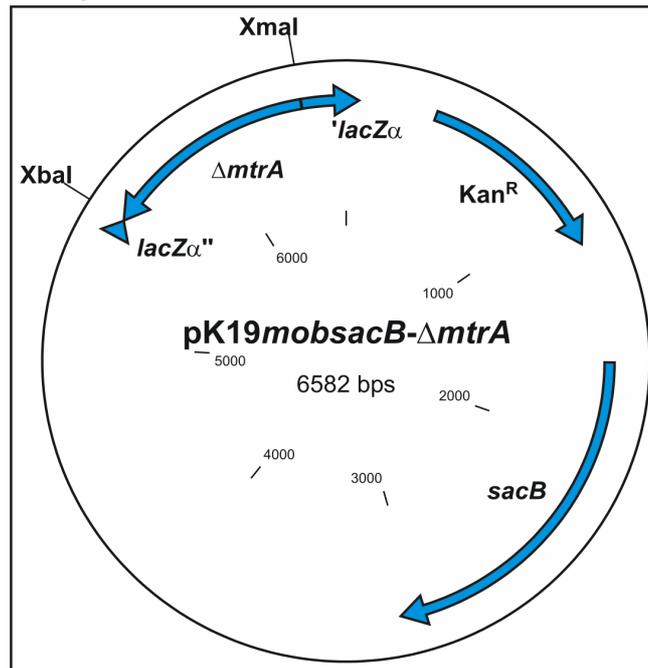
pk19mobsacB- Δ mtrA

Abbildung 40: Plasmid pK19mobsacB- Δ mtrA mit einem 871 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer Delta mtrA-1, Delta mtrA-2, Delta mtrA-3, Delta mtrA-4) in den XmaI- und XbaI-Schnittstellen, das die *mtrA*-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* enthält.

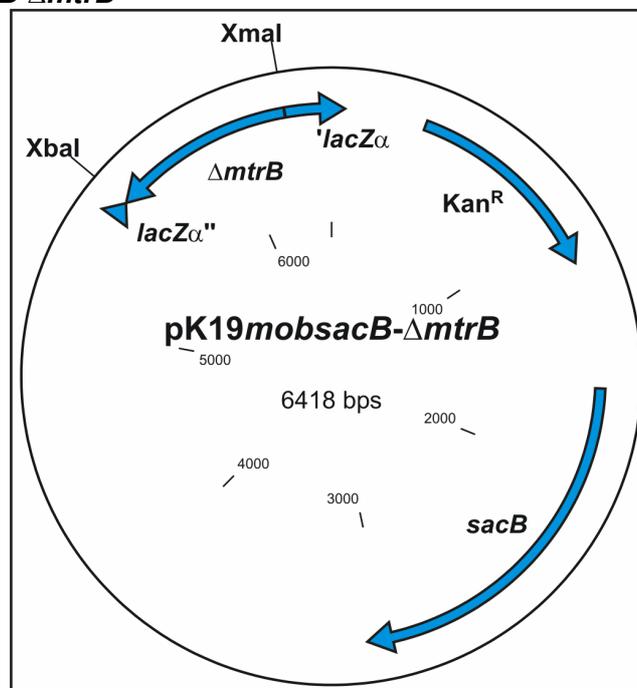
pk19mobsacB- Δ mtrB

Abbildung 41: Plasmid pK19mobsacB- Δ mtrB mit einem 707 bp „Crossover“-PCR-Fragment (Primer Delta mtrB-1, Delta mtrB-2, Delta mtrB-3, Delta mtrB-4) in den XmaI- und XbaI-Schnittstellen, das die *mtrB*-flankierenden Bereiche aus *C. glutamicum* enthält.

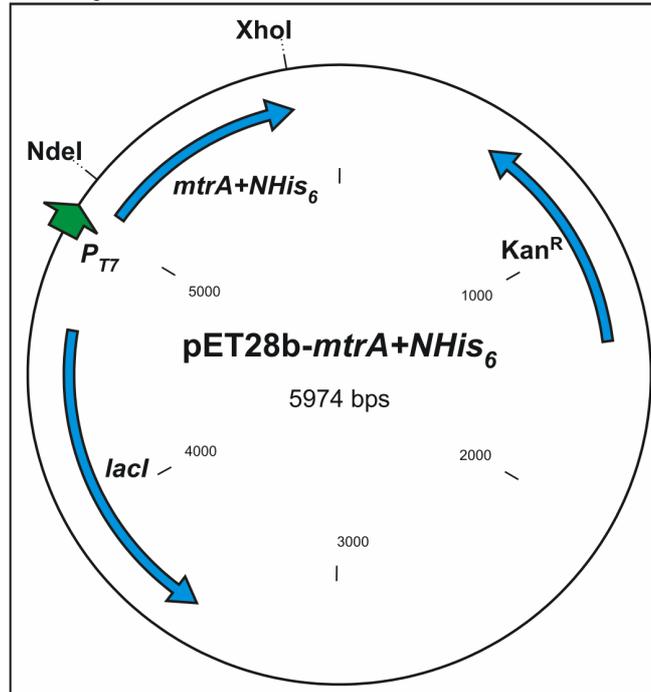
pET28b-MtrA+NHis₆

Abbildung 42: Expressionsplasmid pET28b-MtrA+NHis₆ für den Antwortregulator MtrA aus *C. glutamicum*. Es kodiert ein MtrA-Derivat, das zusätzliche 20 aminoterminalen Aminosäure-Reste enthält (MGSSHHHHHSSGLVPRGSH).

A4 PCR-Fragmente für Gelretardationsexperimente

Tab. 10: Liste der PCR-Fragmente, die für Bandshift-Experimente verwendet wurden.

Gen	Position des PCR-Fragments in Bezug auf den Translationsstart	Länge des PCR-Fragments
<i>C. glutamicum</i>		
nlpC1	-496 bis +53	549 bp
nlpC2	-496 bis -313	184 bp
nlpC3	-313 bis -129	185 bp
nlpC4	-129 bis +53	182 bp
nlpC5	-405 bis -220	186 bp
nlpC6	-220 bis -39	182 bp
nlpC7	-496 bis -288	209 bp
nlpC8	-285 bis -39	247 bp
mepA1	-511 bis +59	570 bp
mepA2	-322 bis -130	193 bp
mepA3	-130 bis +59	189 bp
mepA4	-223 bis -38	186 bp
proP1	-507 bis +58	565 bp
proP2	-507 bis -218	290 bp
proP3	-218 bis +58	276 bp
proP4	-507 bis -374	134 bp
proP5	-374 bis -218	157 bp
proP6	-374 bis -297	78 bp
proP7	-297 bis -218	80 bp
betP1	-373 bis +59	432 bp
betP2	-234 bis -88	147 bp
betP3	-88 bis +59	147 bp
betP4	-174 bis -21	154 bp
betP5	-296 bis -174	123 bp
nlpC1_M	-404 bis -290	116 bp
nlpC2_M	-273 bis -119	155 bp
mepA_M	-75 bis +43	118 bp
proP_M	-293 bis -85	209 bp
betP_M	-250 bis -135	116 bp
nadE-nrdH	-631 bis -282 (bzgl. <i>nadE</i>) -597 bis -248 (bzgl. <i>nrdH</i>)	350 bp

Gen	Position des PCR-Fragments in Bezug auf den Translationsstart	Länge des PCR-Fragments
NCgl0381/NCgl0382	-170 bis +47	217 bp
csbD	-153 bis + 26	179 bp
katA	-247 bis +51 (bzgl. <i>katA</i>) -254 bis +44 (bzgl. <i>NCgl0250</i>)	298 bp
NCgl1291/1290	-380 bis +20	400 bp
NCgl1368	-265 bis +49 (bzgl. <i>NCgl1368</i>)	314 bp
dps	-187 bis +45 (bzgl. <i>dps</i>)	232 bp
lcoP	-140 bis +48 (bzgl. <i>lcoP</i>)	188 bp
mtrA	-97 bis + 37	134 bp
lpqB	-68 bis +53	121 bp
ppmA	-252 bis +50 (bzgl. <i>ppmA</i>)	302 bp
mscL	-119 bis +50	169 bp
dnaA1-NCgl2993	-575 bis -262 (bzgl. <i>dnaA</i>) -587 bis -274 (bzgl. <i>NCgl2993</i>)	314 bp
dnaA2-NCgl2993	-283 bis +38 (bzgl. <i>dnaA</i>) -886 bis -566 (bzgl. <i>NCgl2993</i>)	321 bp
NCgl2561-NCgl2562	-168 bis +32 (bzgl. <i>NCgl2561</i>) -330 bis -131 (bzgl. <i>NCgl2562</i>)	200 bp
NCgl0532-NCgl0531	-195 bis +5 (bzgl. <i>NCgl0532</i>) -381 bis -182 (bzgl. <i>NCgl0531</i>)	200 bp
rpf2	-170 bis +30	200 bp
NCgl0718-NCgl0717	-268 bis +21 (bzgl. <i>NCgl0718</i>) -264 bis +25 (bzgl. <i>NCgl0717</i>)	289 bp
yggB-NCgl1222	-211 bis +20 (bzgl. <i>yggB</i>) -457 bis -227 (bzgl. <i>NCgl1222</i>)	231 bp
NCgl0824-NCgl0825	-363 bis +10 (bzgl. <i>NCgl0824</i>) -365 bis +8 (bzgl. <i>NCgl0825</i>)	373 bp
NCgl0102/0103	-131 bis +45	176 bp
<i>M. tuberculosis</i>		
dnaA1-Rv3924c	-624 bis -424 (bzgl. <i>dnaA</i>) -180 bis +21 (bzgl. <i>Rv3924c</i>)	201 bp
dnaA2-Rv3924c	-444 bis -214 (bzgl. <i>dnaA</i>) -390 bis -160 (bzgl. <i>Rv3924c</i>)	231 bp
dnaA3-Rv3924c	-236 bis +23 (bzgl. <i>dnaA</i>)	259 bp

Gen	Position des PCR-Fragments in Bezug auf den Translationsstart	Länge des PCR-Fragments
	-626 bis -368 (bzgl. <i>Rv3924c</i>)	
Rv0867	-470 bis -246	225 bp
Rv0951-Rv0950c	-358 bis -161 (bzgl. <i>Rv0951</i>)	198 bp
	-149 bis +49 (bzgl. <i>Rv0950c</i>)	

A5 Auflistung aller möglichen Zielgene und die zugehörigen Ergebnisse aus den Transkriptomchip- und den CHIP-to-chip-Experimenten

Tab. 11: Zusammenstellung aller Fragmente, an die MtrA bindet und die möglichen Zielgene. Darüber hinaus sind die Daten aus den Transkriptomchip- und den CHIP-to-chip-Experimenten für die möglichen Zielgene aufgeführt.

MtrA-Bindestelle	Mögliche(s) Zielgen(e) NCgl-Nr.	Gen	Mögliche Funktion	Transkriptomchip-Daten		CHIP-to-chip-Daten	
				$\Delta mtrAB$ / WT	$\Delta mtrA$ / WT	WT/ $\Delta mtrA$	+AK/ -AK
mepA	NCgl2411	<i>mepA</i>	Metallopeptidase	14,5*	6,2*		
	NCgl2410		Protein unbekannter Funktion	(1,0)	1,0	1,5	1,5
nlpC1 und nlpC2	NCgl2108	<i>nlpC</i>	Zellwandpeptidase	2,7*	2,3*	3,2*	3,4*
betP	NCgl0856	<i>betP</i>	Importer für Betain	0,2*	0,4*	1,1*	1,3*
proP	NCgl2961	<i>proP</i>	Importer für Proline	0,1*	0,3*	1,0	1,0
csbD	NCgl0226	<i>csbD</i>	Stressantwortprotein	0,3*	0,4*	1,7*	1,5
katA	NCgl0251	<i>katA</i>	Katalase	0,8	0,3*		
	NCgl0250	<i>sicC</i>	ECF-Typ Sigmafaktor	(0,7)	-	1,0	1,0
NCgl1368	NCgl1368		Acetyltransferase	(0,6)	0,3*		
	NCgl1369		Schwefeltransferase	1,1	0,8*	1,4*	1,2*
NCgl0381/0382	NCgl0381		Am Häm-Transport beteiligtes Protein	(1,7)	3,7*	1,3	1,3
	NCgl0382		Am Häm-Transport beteiligtes Protein	(1,3)	2,7*		
ppmA	NCgl2737	<i>ppmA</i>	Proteasemodulator	3,9*	0,9		
	NCgl2736		Nukleosid- Hydrolase	1,0	1,0	1,3*	1,4*
NCgl1291/1290	NCgl1291		Protein unbekannter Funktion	0,4*	(0,6)	1,5*	1,1
	NCgl1290		Protein unbekannter Funktion	0,3*	0,6*		
dnaA1 und dnaA2	NCgl0001	<i>dnaA</i>	Replikations- Initiierungs-Protein	1,0	1,1*	1,1	1,7

MtrA-Bindestelle	Mögliche(s) Zielgen(e) NCgl-Nr.	Gen	Mögliche Funktion	Transkriptomchip-Daten		ChIP-to-chip-Daten	
				$\Delta mtrAB$ / WT	$\Delta mtrA$ / WT	WT/ $\Delta mtrA$	+AK/ -AK
NCgl0532- NCgl0531	<i>NCgl0532</i>	<i>secY</i>	Kanalbildende Untereinheit der Sec-Translokase	1,0	1,1	1,5	1,1*
	<i>NCgl0531</i>		Transkriptionsregula- tor	(0,8)	0,9		
rpf2	<i>NCgl0872</i>	<i>rpf2</i>	Wachstumsfaktor	2,25	1,3	1,4*	1,6*
NCgl0717- NCgl0718	<i>NCgl0717</i>		Protein unbekannter Funktion	2,8*	1,8*		
	<i>NCgl0718</i>		Protein unbekannter Funktion	0,7*	0,8*	1,2	1,2
NCgl0824- NCgl0825	<i>NCgl0824</i>	<i>mepB</i>	Metallopeptidase	1,4*	1,5*		
	<i>NCgl0825</i>		Transporter	1,0	0,7	1,4*	1,6
nadE-nrdH	<i>NCgl2446</i>	<i>nadE</i>	NAD ⁺ -Synthetase	1,2	1,1		
	<i>NCgl2445</i>	<i>nrdH</i>	Glutaredoxin- ähnliches Protein	0,9	0,9	3,7	3,0

Danksagungen

Ein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Michael Bott für die Vergabe des spannenden Themas, die inspirierende und intensive Betreuung sowie der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Hegemann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

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

Den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Andreas, Armin, Axel, Brita, Christian, Christina, Jens, Julia, Kerstin, Lena, Marc, Martina, Mirja, Sabina, Sabine, Sarah, Sonja, Steffen und Tanja möchte ich für die gemeinsamen Zeit im Büro und Labor danken. Die Zusammenarbeit war stets unterstützend, kreativ und freundschaftlich.

Für den regen Gedankenaustausch in fachlicher und privater Hinsicht danke ich Armin sehr. Er ist nicht nur ein Arbeitskollege, sondern auch ein guter Freund.

Julia, Sarah und Verena danke ich für die immer wieder erfrischenden Frauenabende.

Darüber hinaus sei allen Institutsangehörigen für die nette Atmosphäre und die stete Unterstützung gedankt.

Mit Silke bin ich durch die schönen und auch weniger schönen Phasen des Studiums gegangen. Sie ist mir eine sehr gute Freundin geworden, die mich hoffentlich bei meinem weiteren Lebensweg begleiten wird.

Anja und Ariane gilt mein besonderer Dank dafür, dass sie seit der gemeinsamen Schulzeit mit mir zusammen alle Hochs und Tiefs erlebt haben.

Nina und Andre danke ich für viele kulinarische Abende, nette Gespräche an der Außenlinie und lange Spaziergänge :-)

Marc danke ich für die langjährige Freundschaft. Sie liegt mir sehr am Herzen und ich möchte sie niemals missen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Daniel für seine unendliche Geduld, sein Verständnis, seine permanente Hilfsbereitschaft und dafür, dass es ihn gibt.

Ich freue mich diesen Erfolg mit meiner Familie zusammen feiern zu können. Ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung hat einen Großteil dazu beigetragen. Dafür danke ich ihnen von ganzem Herzen!

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Krefeld, den 09.10.2006