

**Untersuchung von Proteinen mit
„Resuscitation-Promoting Factor“-Motiv
und der für sie kodierenden Gene in
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

**vorgelegt von
Michael Hartmann
aus Bielefeld**

Bielefeld im März 2004

INHALTSVERZEICHNIS

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG	2
1	Taxonomische Einordnung von Corynebakterien	2
2	Wirtschaftliche Bedeutung	3
3	Molekulargenetische Methoden für <i>Corynebacterium glutamicum</i>	4
4	Stammentwicklung im Zeitalter der Postgenomik	5
5	Bakterielle Wachstumsfaktoren	6
6	Der <i>resuscitation-promoting factor</i> (Rpf) aus <i>Micrococcus luteus</i>	7
7	<i>M. tuberculosis</i> -Zellen synthetisieren fünf Proteine mit Rpf-Motiv	12
8	Ziele dieser Arbeit.....	14
III	MATERIAL UND METHODEN	15
1	Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Primer.....	15
1.1	Bakterienstämme	15
1.2	Plasmide	16
1.3	Primer	17
2	Medien	18
2.1	Nährmedien	18
2.2	Zusätze zu Nährmedien.....	19
3	Puffer und Lösungen	19
3.1	Lösungen und Puffer für DNA-Isolierung, -Reinigung und -Bearbeitung.....	19
3.2	Lösungen und Puffer für DNA-Gelelektrophoresen	20
3.3	Lösungen für DNA-Transfer.....	21
3.4	Lösungen und Puffer für PCR-Reaktionen	21
3.5	Lösungen und Puffer zur Darstellung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.....	21
3.6	Puffer zur Aufreinigung Poly-His-markierter Proteine mittels magnetischer Ni-NTA Agarosepartikel	22
3.7	Lösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen.....	22
3.8	Lösungen und Puffer für Proteinfärbungen.....	23
3.9	Lösungen und Puffer für tryptischen Proteinverdau und MALDI-TOF MS.....	24
3.10	Lösungen und Puffer für Semi-Dry-Blot / Western Blot	24

4	Enzyme, Chemikalien, Materialien, Geräte und Software.....	25
4.1	Enzyme, Antikörper und Längenstandards.....	25
4.2	Chemikalien.....	26
4.3	Materialien.....	28
4.4	Kits.....	29
4.5	Geräte.....	29
4.6.	Software zur Gerätesteuerung und Datenanalyse.....	30
5	Kultivierung von Bakterien.....	31
5.1	Bakterienanzucht auf Festmedien und in Flüssigkultur.....	31
5.2	Lagerung von Bakterien.....	31
5.3	Bestimmung des Bakterientiters.....	31
6	Isolierung von DNA.....	31
6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit.....	31
6.2	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>C. glutamicum</i>	32
6.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>	33
7	Reinigung von DNA.....	34
7.1	Sephadex-Gelfiltration.....	34
7.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	34
8	DNA-Analysen.....	34
8.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
8.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
9	Klonierungsexperimente.....	36
9.1	DNA-Restriktion.....	36
9.2	Erzeugung von <i>blunt ends</i>	36
9.3	5'-Dephosphorylierung gespaltener DNA.....	36
9.4	Ligation von DNA.....	36
10	DNA-Transfer.....	37
10.1	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	37
10.2	Elektrotransformation von <i>C. glutamicum</i>	38
11	Polymerase-Kettenreaktion.....	39
11.1	PCR-Primerdesign.....	40
11.2	PCR-Reaktion.....	40
11.3	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten.....	40
12	Klonierung von PCR-Amplifikaten.....	41
13	Gendelektion durch die „GeneSOEing“-Methodik.....	42
13.1	PCR-Schnelltest zum Nachweis von Integrationen und Deletionen im Chromosom von <i>C. glutamicum</i>	43

14	Auswertung von DNA- und Aminosäuresequenzen.....	44
15	RNA-Isolierung	44
15.1	Gesamt-RNA-Isolierung aus <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	44
15.2	RNA-Reinigung und DNase-Behandlung	45
15.3	Bestimmung von RNA-Reinheit und Konzentration.....	46
15.4	Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA in denaturierenden Agarose-Gelen	46
15.5	PCR-basierter Test auf DNA-Freiheit von RNA-Proben	47
16	Transkriptionsmessungen mit dem LightCycler	47
17	Extraktion von Proteinen.....	48
17.1	Herstellung von cytosolischen Proteinrohextrakten.....	48
17.2	Isolierung und Konzentration von Proteinen aus Überständen bakterieller..... Kulturen	49
17.3	Aufreinigung Poly-His-markierter Proteine aus komplexen Gemischen	50
17.4	Bestimmung des Proteingehalts	51
18	Trennung und Visualisierung von Proteinen	51
18.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
18.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	53
18.3	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue	54
18.4	Colloidale Proteinfärbung mit Coomassie G-250.....	55
19	Nachweis von Proteinen: Immunoblotting (Western Blot).....	55
19.1	Semi-Dry-Proteinblot	55
19.2	Ponceau-Färbung	56
19.3	Immunologische Detektion geblotteter Proteine	56
20	Lokalisierung von Proteinen durch Immunofluoreszenzmikroskopie	56
21	Proteinidentifizierung durch <i>peptide mass fingerprints</i>	57
21.1	Tryptischer Verdau	57
21.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	58
21.3	Auswertung von <i>peptide mass fingerprints</i> mittels MASCOT	59
22	Detektion von Glykoproteinen.....	60
23	Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung von Glykoproteinen durch GC/MS	61
23.1	Hydrolyse und Derivatisierung von Glykoproteinen.....	61
23.2	Gaschromatographie	61
23.3	Massenspektrometrie	61
23.4	Auswertung der Chromatogramme.....	62

IV	ERGEBNISSE	63
1	Das Genom von <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 besitzt zwei Gene, <i>rpf1</i> und <i>rpf2</i> , die für Proteine mit <i>resuscitation-promoting factor</i> -Motiven kodieren	63
2	<i>In vivo</i> -Expression des <i>rpf1</i> - und <i>rpf2</i> -Gens in <i>C. glutamicum</i>	68
3	Konstruktion von <i>C. glutamicum</i> -Mutanten, die Deletionen innerhalb der <i>rpf</i> -Gene tragen bzw. eines der Gene verstärkt exprimieren	70
4	Überstände von <i>C. glutamicum</i> -Kulturen enthalten verschiedene Formen des Rpf2-Proteins.....	71
5	Das Rpf2-Protein aus <i>C. glutamicum</i> wird durch Glykosylierung modifiziert	77
6	Mannose und Galaktose sind zwei Hauptbestandteile des Kohlenhydratanteils des Rpf2-Glykoproteins aus <i>C. glutamicum</i>	78
7	Das Rpf2-Protein ist auf der Oberfläche von <i>C. glutamicum</i> -Zellen lokalisiert.....	80
8	Eine gleichzeitige Deletion beider <i>rpf</i> -Gene führt zu beeinträchtigtem Wachstum von <i>C. glutamicum</i> -Zellen nach Transfer eines kleinen Inokulums	81
9	Die gleichzeitige Deletion beider <i>rpf</i> -Gene führt nach Inokulation aus einer langandauernden Stationärphase zu beeinträchtigtem Wachstum..	82
10	Der Kulturüberstand logarithmisch wachsender <i>C. glutamicum</i> -Zellen besitzt einen wachstumsfördernden Effekt	83
V	DISKUSSION	85
1	<i>C. glutamicum</i> -Zellen synthetisieren zwei Proteine mit Rpf-Motiv	85
2	Das Rpf2-Protein aus <i>C. glutamicum</i> kommt in verschiedenen Formen vor	87
3	Die <i>rpf</i> -Gene sind für <i>C. glutamicum</i> nicht essentiell	89
4	Die gleichzeitige Ausschaltung beider <i>rpf</i> -Gene in <i>C. glutamicum</i> kann zu beeinträchtigtem Wachstum führen.....	90
5	Der Kulturüberstand logarithmisch wachsender <i>C. glutamicum</i> -Zellen enthält einen wachstumsbeeinflussenden Faktor	92

6	Ein Modell für eine auf mehreren Komponenten basierende interzelluläre Kommunikation von <i>C. glutamicum</i>	93
VI	LITERATURVERZEICHNIS	96
VII	ANHANG	102
1	Abbildungverzeichnis	102
2	Tabellenverzeichnis	104
3	Häufig verwendete Abkürzungen	105
4	Ein- und Drei-Buchstaben-Code für Aminosäuren	106
5	Sequenzdaten	107
5.1	Sequenz des <i>rpf1</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i>	107
5.2	Sequenz des <i>rpf2</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i>	108
5.3	Gen- und Mutationskarte des <i>rpf1</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i>	109
5.4	Gen- und Mutationskarte des <i>rpf2</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i>	109
6	Proteine mit Ähnlichkeit zu den Rpf-Proteinen aus <i>C. glutamicum</i>	110
6.1	tBlastN-Abfrage gegen die <i>nr</i> -Datenbank mit der Aminosäuresequenz des Rpf1-Proteins aus <i>C. glutamicum</i>	110
6.2	tBlastN-Abfrage gegen die <i>nr</i> -Datenbank mit der Aminosäuresequenz des Rpf2-Proteins aus <i>C. glutamicum</i>	111
6.3	Rpf-Proteine ausgewählter <i>Actinomycetales</i>	112
6.4	Multiples Alignment von Rpf-Proteinen ausgewählter <i>Actinomycetales</i>	113
6.5	Phylogenetische Einordnung der Rpf-Proteine	115
6.6	Multiples Alignment Rpf2-ähnlicher Proteine	116
7	Plasmidkarten	117
7.1	In dieser Arbeit verwendete Vektoren	117
7.2	Vektorkonstrukte zur Erzeugung definierter Deletionen im Chromosom	118
7.3	Vektorkonstrukte zur verstärkten Expression des <i>rpf1</i> - bzw. <i>rpf2</i> - Gens aus <i>C. glutamicum</i> im homologen System	119
8	Massenspektren	120
8.1	Massenspektren zur Identifizierung von Galaktose als Bestandteil des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung	120
8.2	Massenspektren zur Identifizierung von Mannose als Bestandteil des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung	121

I ZUSAMMENFASSUNG

Durch Analyse der Gesamtgenomsequenz von *Corynebacterium glutamicum* wurden zwei offene Leseraster, *rpf1* und *rpf2*, identifiziert, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Ähnlichkeiten mit dem essentiellen *Resuscitation-promoting factor* (Rpf) aus *Micrococcus luteus* aufweisen. Vorallem ein Bereich von ca. 80 Aminosäuren, das sogenannte Rpf-Motiv, ist bei diesen Proteinen hochkonserviert. Beide *rpf*-Gene werden *in vivo* transkribiert und die von ihnen kodierten Proteine von *C. glutamicum*-Zellen an das umgebende Medium abgegeben. Durch Amplifizierung und Klonierung entsprechender DNA-Bereiche aus *C. glutamicum* wurden rekombinierte Stämme konstruiert, die jeweils eines der *rpf*-Gene verstärkt exprimieren bzw. in einem oder beiden Genen definierte Deletionen tragen.

Das Rpf1-Protein konnte bei verstärkter Expression seines kodierenden Gens aus dem Überstand von *C. glutamicum*-Kulturen aufgereinigt werden, während das Rpf2-Protein sowohl im Kulturüberstand als auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurde. Durch Aufreinigung aus Kulturüberständen und anschließender MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten drei Rpf2-Formen mit molekularen Massen von 35, 42 und 47 kDa sowie mehrere verkürzte Formen des Proteins identifiziert werden. Mit einem Enzym-Immunoassay kombinierte Western-Blot-Analysen zeigten eine Glykosylierung der beiden größeren Rpf2-Formen, die ihre reduzierte Mobilität bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen begründen könnte. Galaktose und Mannose wurden durch kombinierte gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen als Hauptbestandteile des Oligosaccharidanteils der Rpf2-Glykosylierung identifiziert.

Rekombinante *C. glutamicum*-Stämme, die definierte Deletionen in einem der beiden *rpf*-Gene tragen, zeigten im Vergleich zu Kontrollstämmen unter Standardanzuchtbedingungen keine phänotypischen Veränderungen. Allerdings besitzt eine *rpf*-Doppelmutante von *C. glutamicum* nach Überimpfung eines kleinen Inokulums eine deutlich verlängerte lag-Phase, wächst im Vergleich zu den Einzelmutanten und dem Kontrollstamm verlangsamt und erreicht am Ende der Kultivierung geringere Zelldichten. Das Wachstum der Doppelmutante ist in ähnlicher Weise beeinträchtigt, wenn die Zellen vor Überimpfung in frisches Medium einer langandauernden Stationärphase ausgesetzt waren. Die Zugabe von sterilen Kulturüberständen logarithmisch wachsender *C. glutamicum*-Kulturen sorgt unter diesen Bedingungen für eine signifikante Reduktion der apparenten lag-Phase aller getesteten Stämme mit Ausnahme der *rpf*-Doppelmutante. Diese Befunde legen nahe, dass es in *C. glutamicum* vermutlich ein funktionales Zusammenspiel der Rpf-Proteine mit mindestens einer weiteren wachstumsfördernden Substanz im Kulturüberstand dieser Bakterien gibt, welches eine Verkürzung der apparenten lag-Phase bewirken kann.

II EINLEITUNG

1 Taxonomische Einordnung von Corynebakterien

Corynebakterien sind fakultativ anaerobe, nicht-sporulierende und nicht-motile Stäbchen, die eine keulen- oder hantelförmige Zellmorphologie besitzen. Charakteristisch für diese Spezies ist ein lichtmikroskopisch sichtbares Abwinkeln der Zellen, bedingt durch eine asymmetrische Auftrennung der Zellwand während der Zellteilung (*snapping division*). Die Zellwandzusammensetzung aus dem Polymer Arabinogalaktan und kurzkettigen Mycol-säuren von 22 bis 36 Kohlenstoffatomen Länge sowie der Aufbau des Peptidoglykans auf der Basis von *meso*-Diaminopimelinsäure (Collins *et al.*, 1982) sind weitere wichtige taxonomische Merkmale.

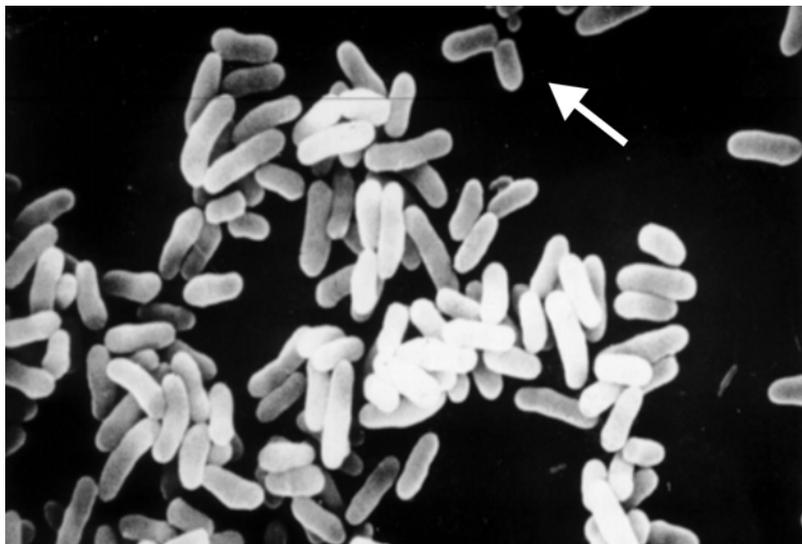


Abbildung II.01: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *C. glutamicum*-Zellen. Die keulenförmige Morphologie und die Ausbildung der *snapping division* (Pfeil) sind deutlich zu erkennen.

Aufgrund chemotaxonomischer Studien konnte unter Berücksichtigung des Zellwandaufbaus, der Peptidoglykanstruktur, dem Vorkommen von Mycolsäuren und der Lipidzusammensetzung eine enge phylogenetische Verwandtschaft von Corynebakterien mit den Gattungen *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* nachgewiesen werden. Nach Barksdale (1970) werden diese vier Gattungen deshalb in der CMN-Gruppe zusammengefasst. Mit einem G+C-Gehalt zwischen 46 und 74 mol% (Funke *et al.*, 1995) gehören Corynebakterien der großen Gruppe hoch-G+C-haltiger Gram-positiver Bakterien an, welche die Actinomyceten-Unterfamilie der Eubakterien bildet (Stackebrandt und Woese, 1981). In dieser Sektion werden vorwiegend human- und tierpathogene Stämme, aber auch einige apathogene Spezies der Boden-, Wasser- und Hautflora taxonomisch erfasst.

Pflanzenpathogene Vertreter wurden inzwischen zumeist in den Gattungen *Curtobacterium* bzw. *Clavibacter* reklassifiziert (Collins *et al.*, 1982; Davis *et al.*, 1984; Jones und Collins, 1986). Die Gattung *Corynebacterium* (griech.: Koryne = Keule) wurde ursprünglich 1896 von Lehmann und Neumann zur Klassifizierung der medizinisch bedeutsamen Spezies *Corynebacterium diphtheriae* definiert. Heute werden Corynebakterien in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2, 1986) als Genus „*Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896“ der Sektion 15 „*Irregular, nonsporing Gram-positive rods*“ zugeordnet (Collins und Cummins, 1986).

2 Wirtschaftliche Bedeutung

Durch ihr breites Spektrum unterschiedlicher Stoffwechseleleistungen erlangten Corynebakterien nicht nur wissenschaftliches, sondern auch wirtschaftliches Interesse. So werden heute hauptsächlich bodenbewohnende, apathogene Vertreter dieser Gruppe zur Produktion und Umsetzung einer Vielzahl von Stoffen eingesetzt (Tab. II.01). Bereits 1957 wurden Corynebakterien als Aminosäureproduzenten entdeckt (Kinoshita *et al.*, 1957). Damals konnte gezeigt werden, dass Kulturüberstände von *Corynebacterium glutamicum* (ehemals *Micrococcus glutamicus*) große Mengen der Aminosäure L-Glutamat enthalten. Seitdem wurden für verschiedene Aminosäuren, die sowohl in der Industrie und als auch in medizinischen Bereichen Anwendung finden, fermentative Herstellungsverfahren unter Verwendung von coryneformen Bakterien entwickelt (Leuchtenberger, 1996).

Tab. II.01: Industrielle Einsatzgebiete coryneformer Bakterien.

Spezies	Einsatzgebiet	Referenz
<i>C. glutamicum</i>	Produktion von Aminosäuren	Leuchtenberger <i>et al.</i> , 1996
<i>C. glutamicum</i>	Produktion von Carotinoiden	Sandmann, 1994
<i>C. glutamicum</i>	Produktion von Pantothenat	Sahm und Eggeling, 1999
<i>C. ammoniagenes</i>	Nukleotid-Produktion	Ogata <i>et al.</i> , 1976
<i>Brevibacterium linens</i>	Käsereifung	Lee <i>et al.</i> , 1985

Besondere industrielle Bedeutung erlangte das Bodenbakterium *C. glutamicum* durch seinen Einsatz bei der fermentativen Gewinnung von essentiellen Aminosäuren und Vitaminen, die in der Landwirtschaft als Supplemente zur ernährungsphysiologischen Aufwertung von Futtermitteln dienen, darunter insbesondere L-Lysin und L-Threonin (Leuchtenberger, 1984; Pühler und Kalinowski, 1995; Kircher und Leuchtenberger, 1998).

In einem jährlich für die meisten Aminosäuren um mehr als 10% wachsenden Markt werden heute insgesamt mehr als zwei Millionen Tonnen an Aminosäuren, zumeist durch Bioprozesse mit coryneformen Bakterien, hergestellt. Im Jahre 2002 wurden mit optimierten *C. glutamicum*-Stämmen ca. 1,5 Millionen t L-Glutamat und 550.000 t L-Lysin produziert (Hermann, 2003). Der Bedarf an Aminosäuren nimmt weiterhin ständig zu, da sie außer als Tierfutteradditive auch als Geschmacksverstärker (Natrium-L-Glutamat), kalorienarmer Süßstoff (L-Aspartyl-L-Phenylalanin-Methylester, Aspartam) und Antioxidationsmittel (L-Cystein, L-Histidin, L-Tryptophan) in der Lebensmittelindustrie sowie als Rohstoff für die Produktion von Kosmetika und Infusionslösungen zur postoperativen Therapie verwendet werden (Hoppe und Martens, 1983). Mittlerweile stellen fermentativ produzierte Aminosäuren bezüglich Volumen und Marktwert die wichtigsten biotechnologischen Produkte dar (Ikeda 2003).

3 Molekulargenetische Methoden für *Corynebacterium glutamicum*

Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten coryneformer Bakterien bei industriellen Prozessen war die Entwicklung gentechnischer Methoden von entscheidender Bedeutung für die Konstruktion und Leistungssteigerung geeigneter Produktionsstämme (Pühler und Kalinowski, 1995). Zunächst erfolgte die Stammentwicklung durch ein iteratives System aus ungerichteter chemischer Mutagenese und anschließender Selektion auf eine Überproduktion des gewünschten Produktes (Rowlands, 1984). Allerdings ist bei dieser Methode eine molekulargenetische Charakterisierung der entstehenden Mutanten kaum möglich. Zudem treten häufig Mehrfachmutationen auf, deren Einfluss auf den gesuchten Phänotyp nicht abzuschätzen ist (Ohnishi *et al.*, 2002) und die daher eine rationale Stammentwicklung erschweren. Aus diesem Grund kamen in den vergangenen Jahren zunehmend neuentwickelte molekulargenetische Methoden zur gezielten Manipulation der Synthesewege und ihrer Regulationsmechanismen zum Einsatz. Mit den rekombinanten DNA-Techniken ist die Stammentwicklung damit nun hauptsächlich auf rationales *metabolic engineering* ausgerichtet.

Die genetische Manipulation von Corynebakterien basiert dabei im wesentlichen auf Vektoren, die von den kryptischen Plasmiden pBL1 aus *Brevibacterium lactofermentum* (Santamaria *et al.*, 1984) und pHM1519 aus *C. glutamicum* (Miwa *et al.*, 1985) abgeleitet sind. Ausgehend von diesen Systemen wurden sowohl *Escherichia coli*-*C. glutamicum* *shuttle*-Vektoren (Martin, 1989; Wohlleben *et al.*, 1993, Kirchner und Tauch, 2003), Expressions- und Integrationsvektoren (Kirchner und Tauch, 2003; Schäfer *et al.*, 1994) als auch Promotor- und Terminator-Testvektoren (Morinaga *et al.*, 1987; Cardenas *et al.*, 1991;

Eikmanns *et al.*, 1991; Bardonnnet und Blanco, 1991; Schwarzer und Pühler, 1991; Sonnen *et al.*, 1991; Deb und Nath, 1999) entwickelt. Durch den Einsatz des *sacB*-Gens aus *Bacillus subtilis*, welches in *C. glutamicum* Saccharose-Sensitivität verleiht (Jäger *et al.*, 1992; 1995; Schäfer *et al.*, 1994), lassen sich darüber hinaus positiv selektionierbare, definierte Deletionsmutanten konstruieren, die zur molekulargenetischen Analyse von Stoffwechselwegen einsetzbar sind. Durch Optimierung von Konjugations- und Elektroporationstechniken (Bonassie *et al.*, 1991; Haynes und Britz, 1989; Kirchner und Tauch, 2003; Schäfer *et al.*, 1990; Tauch *et al.*, 2002) stehen inzwischen auch effiziente Methoden für den DNA-Transfer nach Corynebakterien zur Verfügung.

4 Stammentwicklung im Zeitalter der Postgenomik

Eine weitere grundlegende Veränderung erfuhr die Stammentwicklung von bakteriellen Aminosäureproduzenten durch die Sequenzierung und Annotation kompletter Genome. Die vollständige Nukleotidsequenz von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde durch zwei voneinander unabhängige Genomprojekte (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003) entschlüsselt. Ebenso sind die Genome von *C. efficiens*, einer sehr nahe mit *C. glutamicum* verwandten Spezies (Fudou *et al.*, 2002), *C. diphtheriae* und einiger verwandter Mycobacterien und Streptomyceten in öffentlichen Datenbanken zugänglich.

Neben dem Vorteil, dass nun sämtliche Gene des Kohlenstoffflusses von der Substrataufnahme bis zur Sekretion eines gewünschten Endproduktes leicht identifiziert werden können und damit einer Manipulation zugänglich sind, bieten vollständige Genomsequenzen darüber hinaus die Möglichkeit zur umfassenden Analyse zellulärer Vorgänge sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomeebene (Loos *et al.*, 2001; Hermann *et al.*, 2001). Eindimensionale Entwicklungsstrategien (z. B. die exklusive Anwendung von *Screening*-Techniken) können nun durch schnellere, hochparallele Vorgehensweisen auf der Grundlage von DNA-Mikroarrays und Techniken der *Proteomics*, *Metabolomics* und *Fluxomics* abgelöst werden (Hermann, 2003). Somit bietet sich die Chance, ein umfassendes Bild der physiologischen Zustände von *C. glutamicum*-Zellen während der Überproduktion eines gewünschten Stoffes zu erhalten, das mit großer Wahrscheinlichkeit neue Ansatzpunkte für eine weitere Verbesserung von bereits bestehenden Produktionsstämmen liefern kann (Hodgson, 1998). Ein wichtiger Aspekt ist dabei der Vergleich von Phasen optimalen Wachstums mit Phasen optimaler Produktsynthese. So hofft man, regulatorische Netzwerke, die für eine maximale Aminosäureproduktion relevant sind, identifizieren und detailliert untersuchen zu können (Pfefferle *et al.*, 2003).

5 Bakterielle Wachstumsfaktoren

Bakterielle wachstumsregulierende Faktoren sind bei der weiteren Verbesserung industriell genutzter Produktionsstämme von besonderem Interesse, stellen sie doch potentielle Ansatzpunkte für eine gesamtphysiologische Ausrichtung von Produktionsstämmen auf möglichst hohe Produktausbeuten in Fermentationen möglichst kurzer Dauer dar. Für Eukaryonten ist seit längerem bekannt, dass bestimmte von den Zellen produzierte Faktoren, die sogenannten Cytokine, bei der Kontrolle, Aktivierung und Regulation komplexer metabolischer Aktivitäten sowie beim Wachstum und der Zellteilung eine herausragende Rolle spielen (Callard und Gearing, 1994). Auch Gewebekulturen höherer, sich differenzierender Zellen benötigen in der Regel komplexe Wachstumsfaktoren, um sich erfolgreich teilen zu können. Die Funktion dieser Cytokine wird generell darin gesehen, an die Zellmembran anderer Zellen zu binden (parakrine Wirkung) und dadurch die Produktion von *second messenger*-Molekülen (z. B. cGMP) auszulösen. Diese sorgen dann ihrerseits für die Aktivierung verschiedenster, zum Teil sehr komplexer Regulationsnetzwerke, die auch die Steuerung des *second messengers* selbst beinhalten können (Alberts, 1996).

In Gegensatz zu den Erkenntnissen für Eukaryonten wurden bakterielle Zellen lange Zeit als „autonom“ angesehen. Sie wachsen und teilen sich scheinbar unabhängig von der Anwesenheit weiterer Zellen oder exogener Faktoren (Kaprelyants und Kell, 1996; Kell und Young, 2000). Tatsächlich scheint eine einzelne Bakterienzelle unter geeigneten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Verfügbarkeit von Nährstoffen, Vitaminen, Spurenelementen etc.) in der Lage zu sein, in Flüssigmedium eine Trübung hervorzurufen bzw. auf Festmedium eine Kolonie auszubilden. Dieses Phänomen wird als „autonomes Wachstum“ bezeichnet (Kaprelyants und Kell, 1996).

Im Gegensatz zu dieser konventionellen Sichtweise mehren sich in jüngerer Zeit jedoch Hinweise für eine weitreichende Beteiligung von chemischen Signalstoffen bei der interzellulären Kommunikation zwischen bakteriellen Zellen (Swift *et al.*, 1994; Kell *et al.*, 1995; Dunny und Leonhard, 1997; Kleerebezem *et al.*, 1997). Diese spielt insbesondere bei spezifischen zellulären Ereignissen, etwa der Sporulation und der Ausbildung von Kompetenz bei *Bacillus subtilis* (Kaiser und Losick, 1993; Lazazzera und Grossann, 1998) der Konjugation zwischen Enterococcen (Clewell, 1993), der Regulation von Pathogenitätsfaktoren bei *Pseudomonas aeruginosa* und verschiedenen *Erwinia*-Spezies sowie der Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* (Greenberg *et al.*, 1996) eine sehr bedeutsame Rolle. Es kann also festgestellt werden, dass eine Vielzahl verschiedener, von Bakterien produzierter Sekundärmetabolite bei der Initiation und Regulation zellulärer Differenzierungen bei Prokaryonten beteiligt ist (Stephens, 1986). Ähnliche Mechanismen der Signalweiterleitung zwischen bakteriellen Zellen könnten demnach auch generell für die Zellteilung in wachsenden Bakterienkulturen von Bedeutung sein (Kaprelyants und Kell, 1996).

6 Der *resuscitation-promoting factor* (Rpf) aus *Micrococcus luteus*

Ein Beispiel für ein Signalmolekül, das bakterielles Wachstum beeinflusst, wurde mit dem *resuscitation-promoting factor* (Rpf) aus *Micrococcus luteus* veröffentlicht (Mukamolova *et al.*, 1998). Nach Kultivierung bis zur Stationärphase und anschließender Fortführung der Inkubation im aufgezehrten Nährmedium können Zellen des Gram-positiven, nicht sporulierenden Bakteriums *M. luteus* in einen „schlafenden“ Zustand (*dormant state*) übergehen, in dem sie über mehrere Monate hinweg weiter existieren können (Abb.III.02).

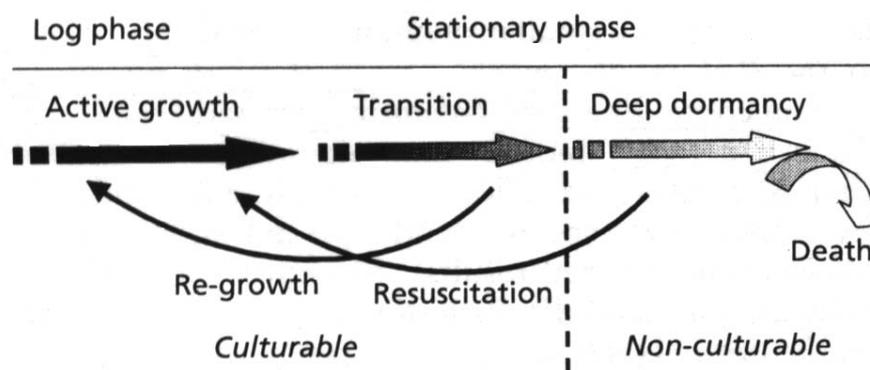


Abb.II.02: Modell zur Darstellung des Übergangs aktiv wachsender Bakterienzellen in einen „schlafenden“- Zustand (*dormant state*) während einer ausgedehnten Stationärphase. Die Farbintensität der Pfeile gibt die Stoffwechselaktivität der Bakterienzellen wieder. Der Ausdruck „*Non-culturable*“ ist in diesem Zusammenhang gleichbedeutend mit einer Unfähigkeit der Bakterien, auf geeignetem Festmedium Kolonien auszubilden. (Shleeva *et al.*, 2002)

In diesem Zustand zeigen die Zellen nur eine äußerst geringe Stoffwechselaktivität und sind zum größten Teil temporär nicht kultivierbar. Während in logarithmisch wachsenden Kulturen die Zahl kultivierbarer Zellen annähernd 100 % beträgt, abgeschätzt durch den Vergleich von *colony forming units* (*cfu*) auf Agarplatten und der optisch bestimmten Gesamtzellzahl, liegt der Anteil kultivierbarer Zellen in Kulturen mit *M. luteus*-Zellen im *dormant state* unter 0,01 % (Kaprelyants und Kell, 1993).

Wird zu einer derartigen Kultur allerdings steril filtrierter Überstand aus einer *M. luteus*-Kultur, die sich in der spät logarithmischen Wachstumsphase befindet, zugegeben, ist eine „Wiederbelebung“ (*resuscitation*) der Zellen feststellbar. Die Zahl der *cfu* nimmt sehr stark zu und erreicht annähernd den Wert der Gesamtzellzahl. Diese und weitere Experimente zeigten, dass logarithmisch wachsende *M. luteus*-Zellen einen Pheromon-ähnlichen, hitzeempfindlichen, nicht dialysierbaren und Trypsin-sensitiven Stoff produzieren, der die *resuscitation* von Zellen im *dormant state* hervorruft (Votyakova *et al.*, 1994). Im Jahre 1998 gelang schließlich die Aufreinigung eines ca. 16-17 kDa großen Proteins aus dem Überstand einer logarithmisch wachsenden *M. luteus*-Kultur, das eine Aktivität als *resuscitation-promoting factor* (Rpf) zeigte (Mukamolova *et al.*, 1998). Das Protein verlor seine biologische

Aktivität nach Erwärmung über 100°C und nach Trypsinbehandlung. Außerdem wurden die aktiven Biomoleküle von einem 12 kDa *cut-off* Filter zurückgehalten. Aufgereinigtes Rpf war bereits in picomolarer Konzentration in der Lage, den Anteil lebender Zellen einer Kultur im *dormant state* um einen Faktor von ca. 100 zu erhöhen (Mukamolova *et al.*, 1998).

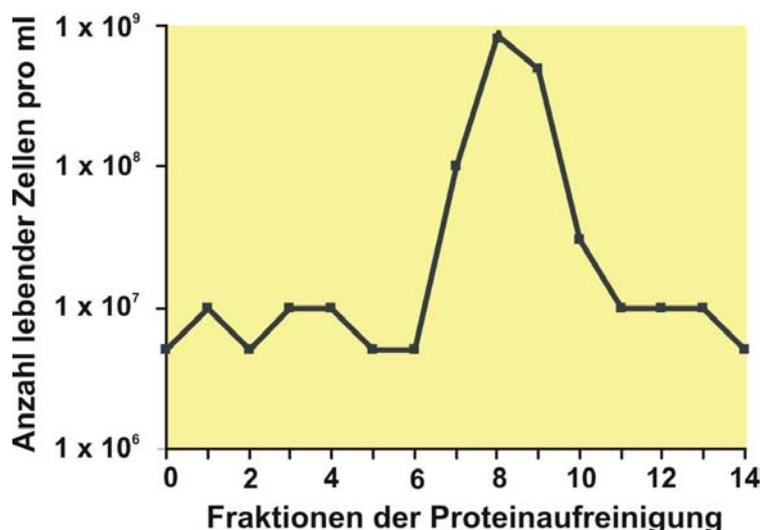


Abb.II.03: *Resuscitation*-Aktivität verschiedener Fraktionen einer Proteinaufreinigung aus dem Kulturüberstand logarithmisch wachsender *M. luteus*-Zellen. Die Proteine des Kulturüberstands wurden durch Gelfiltration mit einer DEAE-Sepharose- und einer Mono Q-Säule aus dem Kulturüberstand isoliert. 200 µl Lactatminimalmedium mit 2 µl der jeweiligen Fraktion wurden mit gehungerten *M. luteus*-Zellen (*cfu*: $3 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$; Gesamtzellzahl: $5 \times 10^9 \times \text{ml}^{-1}$) inokuliert. Die Kulturen wurden 120 h in einem Bioscreen C optical growth analyser inkubiert. Die optische Dichte wurde dabei automatisiert einmal pro Stunde bestimmt und die Anzahl lebender Zellen durch die *most probable number*-Methodik (MPN) anhand publizierter Tabellen berechnet (nach Mukamolova *et al.*, 1998).

Das Rpf-Protein wurde N-terminal ansequenziert und anhand der erhaltene Aminosäuresequenz wurden Primer synthetisiert, die zur Amplifizierung eines Teils des *rpf*-Gens aus *M. luteus* benutzt wurden. Durch Southern-Hybridisierungen dieser Genprobe gegen eine Genbank von *M. luteus* konnte schließlich das 660 bp große *rpf*-Gen identifiziert und vollständig sequenziert werden (Mukamolova *et al.*, 1998). Das von ihm abgeleitete Genprodukt besitzt N-terminal ein 38 Aminosäuren umfassendes putatives Leaderpeptid, wie es für exkretierte Proteine Gram-positiver Bakterien typisch ist (Nielsen *et al.*, 1997). Für das prozessierte Rpf-Protein wurde eine molekulare Masse von 19,15 kDa berechnet, die damit größer als die elektrophoretisch bestimmte apparente Masse von 16-17 kDa ist. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Rpf-Proteins aus *M. luteus* mit Sequenzdatenbanken zeigten bereits zum damaligen Zeitpunkt eine hohe Ähnlichkeit des N-terminalen Bereichs des prozessierten Rpf-Moleküls mit fünf Kodierbereichen aus dem Genom von *Mycobacterium tuberculosis* und zwei weiteren Proteinen aus *Mycobacterium leprae*. Weitere Analysen der Aminosäuresequenz des Rpf-Proteins aus *M. luteus* zeigten später,

dass es zudem am C-Terminus ein LysM-Modul besitzt (Mukamolova *et al.*, 2002a). Für eine derartige Proteindomäne wird angenommen, dass sie eine Bindung an das Peptidoglycan der Zellhülle vermitteln kann (Bateman und Bycroft, 2000).

Southern-Hybridisierungen bzw. PCR-Experimente mit vom *rpf*-Gen abgeleiteten Primern deuteten ferner darauf hin, dass *rpf*-ähnliche Gene unter den Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt weit verbreitet sein könnten. Positive Resultate wurden u. a. für verschiedene Mycobakterien und Streptomycceten sowie für *C. glutamicum* erhalten. In anderen vollständig sequenzierten Organismen konnten *rpf*-ähnliche Gene hingegen nicht aufgefunden werden. Mit der steigenden Zahl vollständig sequenzierter Organismen und der damit verbundenen größeren Menge an öffentlich zugänglichen Proteinsequenzen wurde in den nachfolgenden Jahren deutlich, dass die Ähnlichkeit anderer Proteine zu Rpf aus *M. luteus* vor allem auf einem ca. 80 Aminosäuren umfassenden Bereich basiert, der hoch konserviert ist. Mittlerweile sind über 30 Proteine, die über diesen als Rpf-Motiv bezeichneten konservierten Bereich verfügen und ausschließlich aus Organismen der Ordnung der *Actinomycetales* stammen, bekannt (Mukamolova *et al.*, 2002a).

Transkriptionelle Analysen zeigten, dass das *rpf*-Gen aus *M. luteus* als monocistronisches Transkript abgelesen wird. Im *M. luteus*-Genom liegt es hinter einem Kodierbereich für ein Protein, das hohe Ähnlichkeit mit der Transposase des Insertions-elements IS1557 aus *M. tuberculosis* aufweist. Direkt *downstream* des *rpf*-Gens besitzt das *M. luteus*-Chromosom eine *stem-loop*-Struktur, welche vermutlich den Transkriptionsterminator des *rpf*-Gens darstellt. Gefolgt wird dieser DNA-Bereich von zwei Kodierbereichen auf dem Gegenstrang, deren abgeleitete Proteinsequenzen hohe Ähnlichkeiten zu ArgR und ArgF aus verschiedenen Mycobakterien, Streptomycceten und Corynebakterien aufweisen (Mukamolova *et al.*, 2002a). Durch RT-PCR-Reaktionen mit mRNA-Proben, die während eines vollständigen Wachstumsverlaufs von *M. luteus*-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden, konnte gezeigt werden, dass *rpf*-Transkripte bereits 1 h nach Inokulation in frisches Medium in den Zellen vorhanden waren. Die Transkriptmenge des *rpf*-Gens blieb während der lag-Phase konstant, während sie im Laufe des logarithmischen Wachstums substantiell abnahm. Dauerte die anschließende Stationärphase längere Zeit an, so konnten keine *rpf*-Transkripte mehr nachgewiesen werden (Mukamolova *et al.*, 2002a). Durch Rpf-spezifische ELISA-Tests mit Kulturüberständen von *M. luteus*-Zellen wurde das Rpf-Protein bereits 5 h nach Inokulation, also zu einem Zeitpunkt als erst zwei Zellteilungen vollzogen waren, nachgewiesen. Es akkumulierte während des logarithmischen Wachstums und nahm in seiner Konzentration anschließend ab. Wurden *M. luteus*-Zellen mit einem Rpf-spezifischen und entsprechend markierten Antikörper inkubiert, konnte das Rpf-Protein durch konfokale Mikroskopie auch auf der Oberfläche der *M. luteus*-Zellen nachgewiesen werden. Die Autoren sehen hierin den Grund für die zeitliche Differenz zwischen Auftreten

des *rpf*-Transkripts und dem Vorhandensein des Rpf-Proteins im Kulturüberstand. Sie postulieren, dass das Rpf-Protein zunächst auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, sich erst nachfolgend von ihr ablöst und folglich im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann (Mukamolova et al., 2002a).

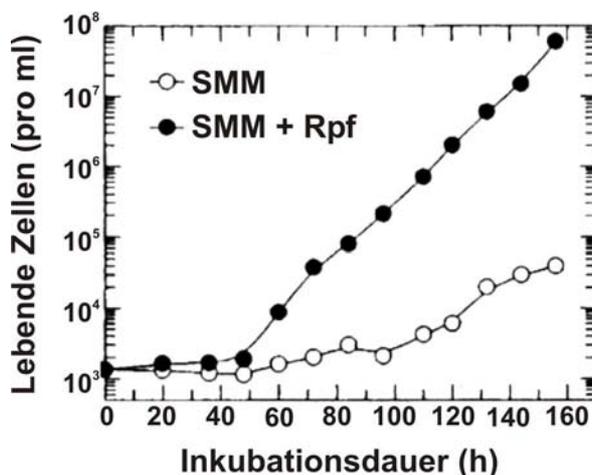


Abb.II.04: Einfluß des Rpf-Proteins aus *M. luteus* auf das Wachstum von *M. luteus*-Zellen in einer Succinatminimalmedium-Kultur (SMM) bei Inkubation im Schüttelkolben. Die Zellen wurden in BrothE-Medium bis zum Ende des logarithmischen Wachstums angezogen, gewaschen und in SMM resuspendiert. Kolben mit 20 ml SMM wurden mit ca. 1000 Zellen pro ml inokuliert. Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der Zahl an lebenden Zellen pro ml in zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der Kultur entnommenen Aliquots verfolgt. Der Versuch wurde in SMM-Medium mit (●) und ohne (○) Zusatz von Rpf (in einer Verdünnung von 1:1000) durchgeführt (nach Mukamolova et al., 1999).

In umfassenden Wachstumsanalysen konnte ein Einfluß des Rpf-Proteins auf das Wachstum von *M. luteus*-Zellen unter einer ganzen Reihe von experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden. So fördert das Rpf-Protein die „Wiederbelebung“ von *M. luteus*-Zellen im *dormant state*, verkürzt die lag-Phase neu inokulierter Kulturen in Succinatminimalmedium (Abb.IV.04) und scheint für das Wachstum intensiv gewaschener *M. luteus*-Zellen bei Überimpfung in flüssiges Lactatminimalmedium unabdingbar zu sein (Mukamolova et al., 1998; 1999). Da das Rpf-Protein bereits in picomolaren Konzentrationen wirksam ist, kann eine Rolle als Nährstoff ausgeschlossen werden (Mukamolova et al., 1998).

In weiteren Versuchen konnte durch Zugabe eines aufgereinigten, spezifischen Rpf-Antikörpers das Wachstum von *M. luteus* vollständig unterbunden werden. Wurde der Kultur bei Inokulation von *M. luteus*-Zellen in Lactat-Minimalmedium aufgereinigter Rpf-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 zugesetzt, konnten die Zellen nur dann Anwachsen, wenn zusätzlich auch Rpf in ausreichender Menge zugesetzt wurde (Mukamolova et al., 2002a). Dieser Befund, der eine generelle Notwendigkeit des Rpf-Proteins für das Wachstum von *M. luteus*-Zellen nahelegt, konnte durch genetische Methoden bestätigt werden. Mukamolova et al. (2002a) konnten in Mutationsstudien zeigen, dass das singuläre *rpf*-Gen im Chromosom von *M. luteus* nur dann inaktiviert werden kann, wenn gleichzeitig eine funktionale plasmid-

kodierte Kopie des Gens in den entsprechenden Stamm eingebracht wird. Es ist somit davon auszugehen, dass *rpf* ein essentielles Gen für *M. luteus* darstellt.

Aufgereinigtes Rpf-Protein von *M. luteus* stimuliert darüber hinaus das Wachstum sowohl schnell wie auch langsam wachsender Mycobakterien (Mukamolova *et al.*, 1998). In Versuchen mit gewaschenen *M. smegmatis*-Zellen verkürzte es die lag-Phase von mehr als 6 Tagen auf 20-24 Stunden und auch für *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. avium* war eine lag-Phasen-verkürzende Wirkung feststellbar.

Die experimentellen Befunde bezüglich des *rpf*-Gens aus *M. luteus* und des von ihm kodierten Rpf-Proteins sind in Abbildung II.05 zusammenfassend dargestellt.

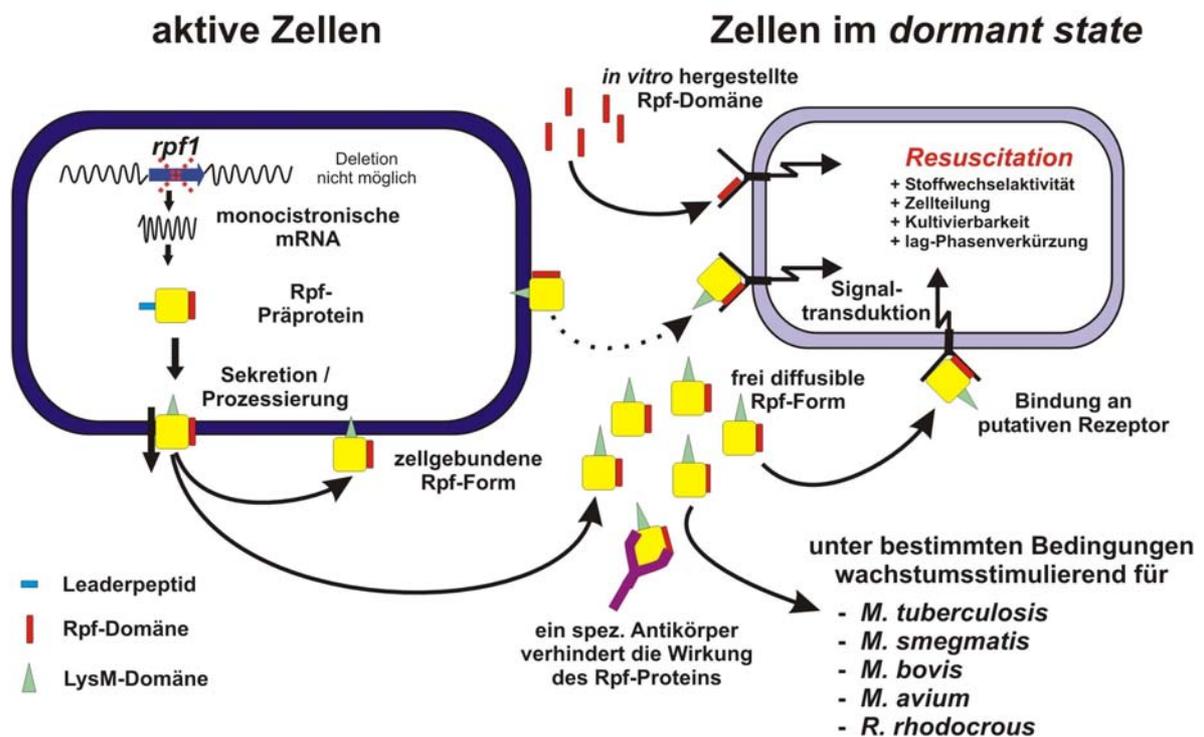


Abb.II.05: Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde für das *rpf*-Gen aus *M. luteus* und das von ihm kodierte Rpf-Protein.

7 *Mycobacterium tuberculosis*-Zellen synthetisieren fünf Proteine mit Rpf-Motiv

In Untersuchungen mit *M. tuberculosis* (Sun *et al.*, 1999) und *R. rhodocrous* (Shleeva *et al.*, 2002), einem langsam bzw. schnellwachsenden Vertreter der *Actinomycetales*, wurden ebenfalls wachstumsfördernde Effekte für Kulturüberstände bestimmter Wachstumsphasen festgestellt, wobei allerdings zunächst keine genauere Charakterisierung der effektauslösenden Substanz(en) möglich war. Im vollständig sequenzierten Genom von *M. bovis* und *M. tuberculosis* wurden aber fünf Gene annotiert (*rpfA* – *rpfE*), die für Proteine mit ähnlichen Charakteristika und Eigenschaften wie das Rpf-Protein aus *M. luteus* kodieren (Mukamolova *et al.*, 2002b). Sie stimulieren ebenfalls bereits in picomolarer Konzentration das Zellwachstum, verfügen alle über das hochkonservierte Rpf-Motiv und weisen ein putatives Leaderpeptid auf, welches nahelegt, dass die Proteine ihre Funktion von einem Ort ausserhalb der Zelle ausüben. Die fünf Rpf-Proteine aus *M. tuberculosis* fördern über die eigene Spezies hinausgehend auch das Wachstum von *M. luteus*-, *M. smegmatis*- und *M. bovis*- Zellen. Werden diese Stämme mit geringer Zelldichte in Minimal-Flüssigmedium inokuliert, reduzieren aufgereinigte Rpf-Proteine aus *M. tuberculosis* die apparente lag-Phase signifikant (Mukamolova *et al.*, 2002b). Interessanterweise reagieren aktiv wachsende *M. bovis* Zellen nicht auf die Zugabe der Rpf-Proteine, während Zellen dieses Organismus, die einer verlängerten Stationärphase ausgesetzt waren, eine deutliche Reaktion zeigen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der fünf Rpf-Proteine aus *M. tuberculosis* untereinander offenbarte, dass sie abgesehen von dem hochkonservierten Rpf-Motiv und einem für exkretierte Proteine aus Gram-positiven Bakterien typischen Leader-Peptid nur wenig Gemeinsamkeiten aufweisen. Zwei von ihnen (RpfA und RpfB) sind vergleichsweise große Proteine. Im Falle von RpfA (Rv0867c, 407 Aminosäuren) ist das Rpf-Motiv N-terminal lokalisiert. Ihm folgt im zentralen Bereich des Proteins eine ausgedehnte Serie prolin- und alaninreicher Wiederholungen der Konsensussequenz APADLAPP. Das RpfB-Protein (Rv1009, 362 Aminosäuren) trägt das Rpf-Motiv dagegen am C-Terminus. Wahrscheinlich ist das RpfB-Protein N-terminal über eine *membrane lipoprotein lipid attachment site* an die äußere Zelloberfläche von *M. tuberculosis* gebunden. Die weiteren Rpf-Proteine (RpfC, Rv1884c, 176 Aminosäuren; RpfD, Rv2389c, 154 Aminosäuren; RpfE, Rv2450c, 172aa) sind deutlich kleiner und tragen mit Ausnahme von RpfE das Rpf-Motiv am N-Terminus ihrer prozessierten Formen (Mukamolova *et al.*, 2002b).

RT-PCR-Experimente mit aus *M. tuberculosis* und *M. bovis* isolierter mRNA zeigten, dass alle fünf *rpf*-Gene dieser Organismen in aktiv wachsenden Zellen transkribiert werden. In sich nicht teilenden Zellen, die z. B. aus einer bereits längere Zeit andauernden Stationärphase stammten, waren hingegen keine *rpf*-Transkripte nachweisbar (Mukamolova *et al.*, 2002b).

Obwohl keines der *rpf*-ähnlichen Gene aus *M. tuberculosis* für sich betrachtet essentiell zu sein scheint und eine Mutation eines dieser Gene keinen Einfluß auf das Wachstum der resultierenden Mutanten besitzt (Sasseti *et al.*, 2003; Tufariello *et al.*, 2004), konnte durch die beschriebenen experimentellen Befunde dennoch gezeigt werden, dass die betreffenden Proteine zum Rpf-Protein aus *M. luteus* sehr ähnliche Eigenschaften besitzen (Mukamolova *et al.*, 2002b). Aufgrund dieser funktionellen Charakterisierung wurden die fünf *M. tuberculosis*-Proteine gemeinsam mit Rpf aus *M. luteus* und anderen Rpf-ähnlichen Proteinen in einer neuen Gruppe bakterieller Wachstumsfaktoren zusammengefasst (Mukamolova *et al.*, 2002b).

Die im Zusammenhang mit den Rpf-Proteinen aus *M. tuberculosis* und der für sie kodierenden *rpf*-Gene erhaltenen experimentellen Befunde sind in Abbildung II.06 zusammenfassend dargestellt.

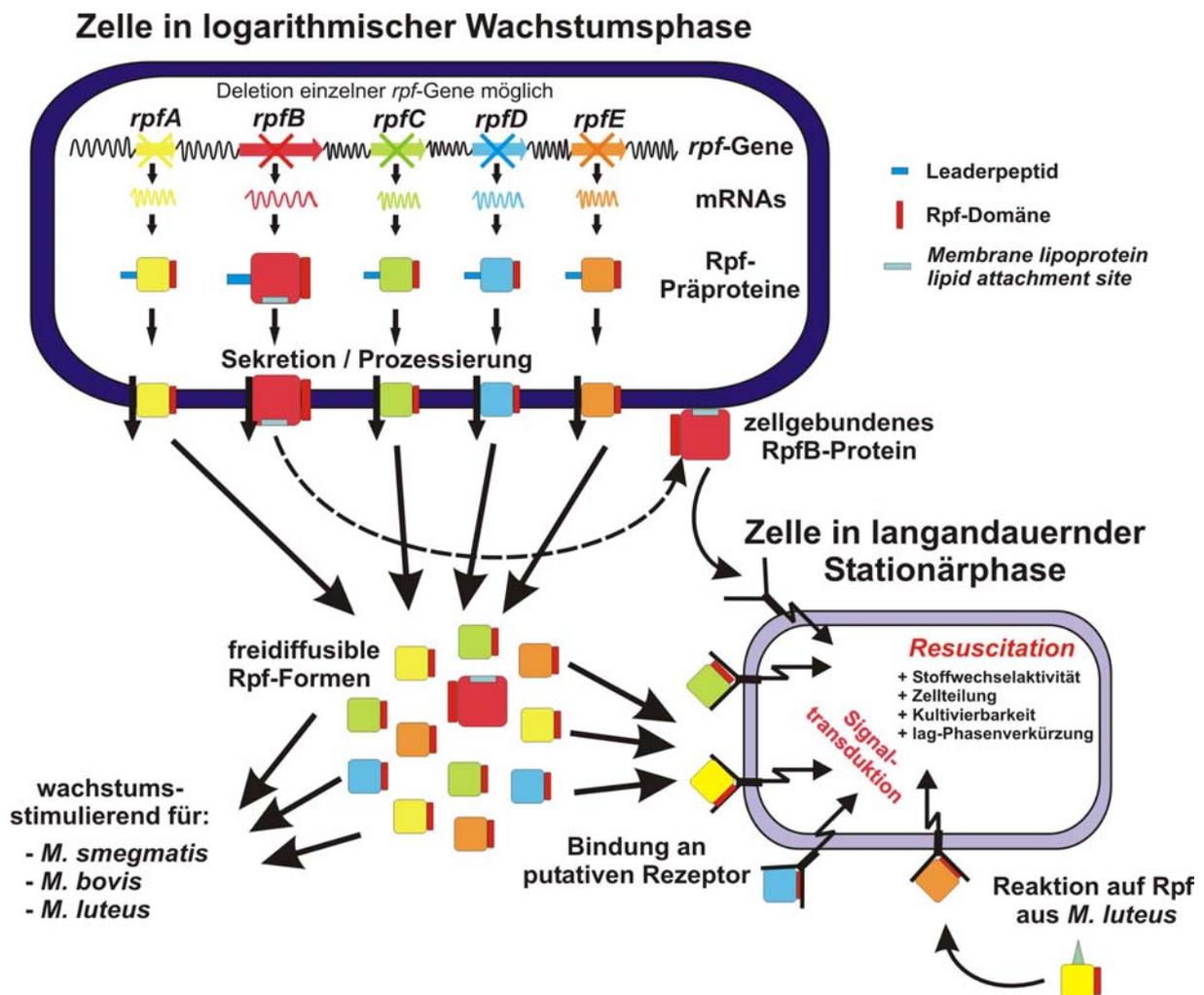


Abb.II.06: Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde für die Rpf-Proteine aus *M. tuberculosis* und der für sie kodierenden Gene.

8 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung für *C. glutamicum* bedeutsamer Wachstumsfaktoren. Ausgehend von der Genomsequenz für *C. glutamicum* ATCC 13032 und den aus *M. luteus*, *M. tuberculosis* und *M. bovis* bekannten Genen für Proteine mit *resuscitation-promoting factor*-Aktivität sollten *C. glutamicum*-Gene identifiziert werden, die potentiell für Wachstumsfaktoren kodieren könnten. Durch Mutation der im Rahmen dieser Fragestellung gefundenen Gene sollte der Einfluß ihrer Proteine auf das Wachstum von *C. glutamicum* untersucht werden. Durch proteinanalytische Methoden sollten darüber hinaus Informationen über Struktur, Funktion und Wirkmechanismen der entsprechenden Proteine erhalten werden.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Primer

1.1 Bakterienstämme

Tab. III.01: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α MCR	F ⁻ <i>supE44 endA thi-1⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> (Δ <i>lacZYA-argF</i>) <i>U196 80lacZ m15 mcrA</i> (<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>)	Grant <i>et al.</i> , 1990
TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> (Δ <i>mrr hsdRMS</i> Δ <i>mcrBC</i>) <i>80lacZ m15 lacX74 deoR</i> <i>recA1 araD139</i> (Δ <i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	ATCC
RES167	Δ (<i>cgIM-cgIR-cgIIIR</i>); restriktionsdefekte Mutante von ATCC 13032	Tauch <i>et al.</i> , 2002
MH22	RES167 mit Plasmid pMH30 zur Überexpression von <i>rpf1</i>	Diese Arbeit
MH23	RES167 mit Plasmid pMH31 zur Überexpression von <i>rpf2</i>	Diese Arbeit
MH24	RES167 mit Plasmid pMH32 zur Überexpression eines His-tag markierten <i>rpf1</i> -Gens	Diese Arbeit
MH25	RES167 mit Plasmid pMH33 zur Überexpression eines His-tag markierten <i>rpf2</i> -Gens	Diese Arbeit
MH26	RES167-Derivat, das eine 579bp-Deletion innerhalb des <i>rpf1</i> - Gens trägt	Diese Arbeit
MH27	RES167-Derivat, das eine 1113bp-Deletion innerhalb des <i>rpf2</i> - Gens trägt	Diese Arbeit
MH28	RES167-Derivat mit definierten Deletionen innerhalb des <i>rpf1</i> - und <i>rpf2</i> -Gens	Diese Arbeit

1.2 Plasmide

Tab.III.02: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. (Plasmidkarten einzelner Konstrukte sind im Anhang enthalten (s. Anhang VII.7)).

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
pK18 <i>mobsacB</i>	mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor, Km ^R , <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α <i>sacB</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pZ8-1	<i>E. coli-C. glutamicum shuttle</i> -Expressionsvektor, Km ^R , Promotor <i>P</i> _{tac} , <i>mcs</i> , <i>ori</i> _{E.c.} von pACYC177, <i>ori</i> _{C.g.} von pHM1519	Dusch <i>et al.</i> , 1999
pCR2.1	T-Überhang-Vektor zur Klonierung von A-Überhang-PCR-Produkten, Ap ^R , Km ^R , <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α	Invitrogen
pCR-Blunt-II	Vektor zur Klonierung von <i>blunt-end</i> -PCR-Produkten, Km ^R , Zeo ^R , <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α , <i>ccdB</i>	Invitrogen
pMH22	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1.40-kb Fragment, das eine deletierte Version des <i>rpf1</i> -Gens trägt	Diese Arbeit
pMH24	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1.46-kb Fragment, das eine deletierte Version des <i>rpf2</i> -Gens trägt	Diese Arbeit
pMH30	pZ8-1 mit <i>rpf1</i> -Gen stromabwärts des <i>P</i> _{tac} -Promoters	Diese Arbeit
pMH31	pZ8-1 mit <i>rpf2</i> -Gen stromabwärts des <i>P</i> _{tac} -Promoters	Diese Arbeit
pMH32	pZ8-1 mit am <i>rpf1</i> -Gen 3'-fusioniertem His-tag stromabwärts des <i>P</i> _{tac} -Promoters	Diese Arbeit
pMH33	pZ8-1 mit am <i>rpf2</i> -Gen 3'-fusioniertem His-tag stromabwärts des <i>P</i> _{tac} -Promoters	Diese Arbeit

1.3 Primer

Tab. III.03: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer.

Name	Sequenz 5'-3' ^a
rpf1del1	TACCGCTGCGGCCAAGTCAA
rpf1del2	TAGCCGACGAAAGCGTTGTATTGTCGCCGTCGAGGTTAGC
rpf1del3	CACGGCCTCCAACACACCAA
rpf2del1	CGAATTGTGTGGCCATTG
rpf2del2	CTATCGGATGCCCAAAACTTCTTCGCTCTCGG
rpf2del3	AGCATCAATGATCGGCCA
rpf1ex1	GATCTAG GAATTC <u>CAAAGGAGGACAACCATGAGAGGAAA</u> ACTTTTCATG
rpf1ex2	GATCTAG GGATCC CTAGCCGACGAAAGCGTTGTA
rpf2ex1	GATCTAG GAATTC <u>CAAAGGAGGACAACCTTGT</u> TAAATCCCCGAGAGC
rpf2ex2	GATCTAG GGATCC CTATCGGATGCCCAAGCTTG
rpf1his	GATCTAG GGATCC CTAGTGATGGTGATGGTGATGGCCGACGAAAGCGTTGTA
rpf2his	GATCTAG GGATCC CTAGTGATGGTGATGGTGATGTCGGATGCCCAAGCTTGC
rpf1LC1	TAACGGCTACCACGGTGGTC
rpf1LC2	GGTTGGAGCGGAGTTCAGTC
rpf2LC1	TTGGCAGCTCAGAACGTACA
rpf2LC2	AGCTGGAGCTTCTGGATCAT
Primerpaare zur Analyse der <i>rpf2</i>-Genregion	
cl1	GGATGGCTGTGGAGGATGTT ; GTGACTCCGCCGATAAGCAA
cl2	TTGGCAGCTCAGAACGTACA ; AGCTGGAGCTTCTGGATCAT
cl3	ACAGACCTGGCTCGCATACG ; CCACCGCAGTTACTGAAGCA
cl4	TGCCGTACAACGTCTCTGTC ; CTTACGCTAGGCACACCAT
cl5	GCCGCTGATATTGATCCAAC ; CCGCTTAACCAACGCATCCA
cl6	GACACATTGCTGGAGGTTGC , AATACCTCAGGCGTGGACAG
cl7	GGCCAGGTGTACGCTGCTTA ; GTCAGCGACGGTGTGTCGTCAT
cl8	AGAAGACCTCACCTGGCGTT ; GGTCTAGGTCATCGAGTTCC
cl9	CGCGCAGTGCAGGAAGAACA ; GCGAGCCATTGGTCCGACAT
cl10	CGATTAATGCTGCGGCGTAG ; GCGAGTGGATCATCATCACC

^a Restriktionsschnittstellen in 5'-Extensionen der Primer sind fett gedruckt. Eingefügte artifizielle *C. glutamicum* Ribosomenbindestellen sind unterstrichen.

2 Medien

Sofern nicht anders angegeben beziehen sich alle Angaben auf ein Endvolumen von einem Liter.

2.1 Nährmedien

LB Vollmedium (Luria Bertani, Sambrook *et al.*, 1989)

–	10	g	Trypton
–	5	g	Hefe-Extrakt
–	5	g	NaCl
–	2	g	Glukose-Monohydrat (bei Bedarf)
			pH 7,2

PA Vollmedium (Penassay Broth)

–	17,5	g	Antibiotic Medium No. 3
---	------	---	-------------------------

SOC Medium

–	20	g	Trypton
–	5	g	Hefe-Extrakt
–	0,60	g	Natriumchlorid (NaCl)
–	0,18	g	Kaliumchlorid (KCl)
–	2,04	g	Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
–	2,46	g	Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
–	4	g	Glukose-Monohydrat

Minimalmedium MM1 (nach Katsumata *et al.*, 1984, jedoch ohne Hefeextrakt)

–	10	g	Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
–	3	g	Harnstoff
–	1	g	Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)
–	0,4	g	Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
–	1	ml	Spurenelementlösung SE-MM1
			in 900 ml H_2O lösen, autoklavieren, anschließend zugeben:
–	2,5	ml	Thiamin (0,2 mg/ml), sterilfiltriert
–	250	μl	Biotin (0,2 mg/ml), sterilfiltriert
			mit C-Quelle und H_2O bidest. auf 1 l auffüllen

Spurenelementlösung SE-MM1

–	0,2	g	Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
–	0,2	g	Magnesiumsulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
–	5	g	Calciumchlorid (CaCl_2)
			in 100 ml H_2O bidest. lösen, autoklavieren

BHIS Medium

–	37	g	Brain Heart Infusion (Merck)
–	91	g	Sorbitol

2.2 Zusätze zu Nährmedien

Agar

– 15 g Agar
zur Herstellung von Festmedien vor dem Autoklavieren zugeben

C-Quellen

sämtliche verwendete C-Quellen für Minimalmedien werden als 10% -
50% Stammlösungen in H₂O bidest. getrennt autoklaviert

Antibiotika

Tab. III.04: Zur Primärselektion verwendete Antibiotikakonzentrationen.

Antibiotikum	Abk.	Lösungs- mittel	Stamm- lösung	Endkonzentration im Medium	
				<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Ampicillin	Ap	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml	—
Chloramphenicol	Cm	Ethanol	50 mg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml
Kanamycin	Km	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
Nalidixin	Nx	0,1N NaOH	50 mg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Zeocin	Zeo	H ₂ O	100 mg/ml	50 µg/ml	—

Aminosäuren und sonstige Zusätze

als sterilfiltrierte Stammlösungen zusetzen

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid)

– 100 mg X-Gal
in 5 ml deionisiertem Dimethylformamid lösen, bei –20°C lagern
2 ml pro 1 l Medium einsetzen

IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid)

– 119 mg IPTG
in 5 ml H₂O bidest lösen (= 0,1 M), zu 1 ml aliquotieren, bei –20°C lagern
Zur Induktion mit einer Konzentration von 0,5 mM einsetzen

3 Puffer und Lösungen

3.1 Lösungen und Puffer für DNA-Isolierung, -Reinigung und -Bearbeitung

SDS-Lösung

– 20 % (w/v) SDS, in H₂O bidest. lösen

RNase A

– 10 mg RNase A
– in 1 ml H₂O bidest lösen, 30 min kochen, bei –20°C lagern

HB1

–	50	mM	Glukose
–	25	mM	Tris
–	10	mM	EDTA
–			pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren

HB2

–	0,2	N	NaOH
–	1 %	(w/v)	SDS
–			jeweils frisch aus doppelt konzentrierten Stammlösungen im Verhältnis 1:2 zusammengeben

HB3

–	3	M	Na-Acetat
–			pH 4,8 mit Eisessig einstellen, autoklavieren

TA-Restriktionspuffer (10-fach)

–	330	mM	Tris
–	660	mM	Kaliumacetat
–	100	mM	Magnesiumacetat
–	5	mM	Dithiothreitol (DTT)
–	1	mg/ml	BSA
			pH 7,5 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

3.2 Lösungen und Puffer für DNA-Gelelektrophoresen**TA-Gelpuffer**

–	40	mM	Tris
–	10	mM	Natriumacetat
–	1	mM	EDTA
			pH 7,8 mit Essigsäure einstellen

Agarose

–	0,8-4	% (w/v)	Agarose
			in TA-Gelpuffer aufkochen, bei 60° C lagern

Bromphenolblau-Ladungspuffer (BPB)

–	50	% (v/v)	Glycerin
–	1	mM	EDTA
–	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
			in H ₂ O bidest. lösen, autoklavieren

Ethidiumbromid-Färbelösung (EtBr)

–	1	µg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
---	---	-------	------------------------------------

TBE-Gelpuffer (10-fach)

–	6,11	g	Tris
–	2,57	g	Borsäure
–	0,19	g	EDTA
			mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen

3.3 Lösungen für DNA-Transfer**Glycerin 10 %**

–	115	ml	Glycerin 87 %
–	885	ml	H ₂ O bidest.
			autoklavieren, bei 4°C lagern

Glycerin 15 %

–	172	ml	Glycerin 87 %
–	828	ml	H ₂ O bidest.
			autoklavieren, bei 4°C lagern

TG-Puffer

–	1	mM	Tris-HCl
–	10 %	(v/v)	Glycerin
			pH 7,5; in H ₂ O bidest., autoklavieren, bei 4°C lagern

3.4 Lösungen und Puffer für PCR-Reaktionen**dNTP-Gemisch**

–	1	µl	dATP (100 mM)
–	1	µl	dCTP (100 mM)
–	1	µl	dGTP (100 mM)
–	1	µl	dTTP (100 mM)
–	36	µl	H ₂ O bidest

PCR-Mastermix (für 4 Reaktionen a 25 µl)

–	10	µl	Polymerase-Puffer
–	4	µl	dNTP-Gemisch
–	2	µl	Polymerase
–	77	µl	H ₂ O bidest

3.5 Lösungen und Puffer zur Darstellung von RNA in denaturierenden Agarosegelen**MOPS (10-fach)**

–	200	mM	MOPS
–	50	mM	Natriumacetat
–	10	mM	EDTA
–			in RNase-freiem H ₂ O bidest. pH-Wert 7,2

MOPS-Elektrophorese-Puffer

–	1	x	MOPS
–	6	% (v/v)	Formaldehyd (gefilitert)
–			in RNase-freiem H ₂ O bidest.

Ladelösung

–	50	% (v/v)	Glycerin
–	0,4	% (w/v)	Bromphenolblau
–	1	mM	EDTA
–	1	x	MOPS

Probenpuffer

–	67	%	Formamid, deionisiert
–	9	%	Formaldehyd
–	1	x	MOPS

Denaturierende Agarose

–	2,7	g	Agarose
–	32,4	ml	Formaldehyd (gefiltert)
–	18	ml	MOPS (10-fach)
–	130	ml	RNAse-freies H ₂ O bidest.

3.6 Puffer zur Aufreinigung Poly-His-getaggtter Proteine mittels magnetischer Ni-NTA Agarosepartikel**Waschpuffer**

–	50	mM	Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)
–	300	mM	Natriumchlorid (NaCl)
–	10	mM	Imidazol
–	0,05	%	Tween 20
–			in H ₂ O bidest. lösen, pH 8,0

Elutionspuffer

–	50	mM	Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)
–	300	mM	Natriumchlorid (NaCl)
–	250	mM	Imidazol
–	0,05	%	Tween 20
–			in H ₂ O bidest. lösen, pH 8,0

3.7 Lösungen und Puffer für SDS-PA-Gelelektrophoresen**Probenpuffer (5-fach)**

–	320	mM	Tris-HCl, pH 6,8
–	20	mM	EDTA
–	40 %	(v/v)	β-Mercaptoethanol
–	20 %	(v/v)	Glycerin
–	10 %	(w/v)	SDS
–	0,05 %	(w/v)	Bromphenolblau

Laufpuffer 1D-SDS-PAGE

–	14,4	g	Tris
–	3,0	g	Glycin
–	1,0	g	SDS
			mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen, pH 8,3 (nicht mit HCl einstellen; ggf. mit Essigsäure)

Rehydration Buffer (RB)

–	9	M	Harnstoff
–	2	% (w/v)	CHAPS
–	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
			nicht über 30°C erwärmen, in 2 ml Aliquots bei –20°C lagern, vor dem Einsatz frisch zugeben
–	0,28	% (w/v)	DTT
–	2	% (v/v)	IPG-Buffer

Equilibration Buffer I (EB1)

–	50	mM	Tris-HCl, pH 8,8
–	6	M	Harnstoff
–	30	% (v/v)	Glycerin
–	2	% (w/v)	SDS
–			nicht über 30°C erwärmen, in 10 ml Aliquots bei –20°C lagern, vor dem Einsatz frisch zugeben:
–	1	% (w/v)	DTT

Equilibration Buffer II (EB2)

–	50	mM	Tris-HCl, pH 8,8
–	6	M	Harnstoff
–	30	% (v/v)	Glycerin
–	2	% (w/v)	SDS
–	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
–			nicht über 30°C erwärmen, in 10 ml Aliquots bei –20°C lagern, vor dem Einsatz frisch zugeben:
–	4,5	% (w/v)	Iodoacetamid

3.8 Lösungen und Puffer für Proteinfärbungen**Coomassie Fixierlösung**

–	600	ml	H ₂ O bidest.
–	300	ml	Ethanol
–	100	ml	Eisessig

Coomassie Brilliant Blue Färbelösung

–	2,0	g	Coomassie Brilliant Blue R 250
–	0,5	g	Coomassie Brilliant Blue G 250
–	425	ml	Ethanol
–	425	ml	H ₂ O bidest.
–	100	ml	Eisessig
–	50	ml	Methanol
			über Nacht rühren

Schnelle Entfärbelösung (SE)

–	450	ml	Ethanol
–	450	ml	H ₂ O bidest.
–	100	ml	Eisessig

Langsame Entfärbelösung (LE)

–	7 %	(v/v)	Eisessig in H ₂ O bidest.
---	-----	-------	--------------------------------------

Kolloidale Färbelösung A:

–	25	%(w/v)	Ammoniumperoxidisulfat
–	3	%(v/v)	Phosphorsäure

Kolloidale Färbelösung B:

–	75	%(w/v)	Ethanol
---	----	--------	---------

Coomassie-Stammlösung:

–	0,1	g	Coomassie-Brilliant-Blue G250 in 1 l H ₂ O lösen
---	-----	---	--

Zur Färbung werden die kolloidalen Färbelösungen A und B im Verhältnis 2:1 gemischt und zu 1l dieser Lösung 4 ml Coomassie-Stammlösung zugesetzt.

3.9 Lösungen und Puffer für tryptischen Proteinverdau und MALDI-TOF MS**TDL1**

–	60	% (v/v)	Acetonitril (CH ₃ CN)
–	0,1	% (v/v)	Trifluoressigsäure (TFA)

TDL2

–	50	% (v/v)	Acetonitril (CH ₃ CN)
---	----	---------	----------------------------------

TDL3

–	50	% (v/v)	Acetonitril (CH ₃ CN)
–	50	mM	Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)

TDL4

–	50	% (v/v)	Acetonitril (CH ₃ CN)
–	10	mM	Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)

TDL5

–	10	mM	Ammoniumhydrogencarbonat (NH ₄ HCO ₃)
---	----	----	--

Trypsinlösung

–	6,6	µg/ml	modifiziertes Trypsin in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat (TDL5), frisch ansetzen
---	-----	-------	--

Matrix-Lösung

–	60	% (v/v)	Acetonitril (CH ₃ CN)
–	0,1	% (v/v)	Trifluoressigsäure (TFA)
–			α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure darin bis zur Sättigung lösen, jeweils frisch ansetzen

3.10 Lösungen und Puffer für Semi-Dry-Blot / Western-Blot**Towbin-Transferpuffer**

–	48	mM	TrisBase
–	39	mM	Glycin
–	20%	(v/v)	Methanol
–	0,04%	(v/v)	SDS
–			in H ₂ O lösen

PBS (10-fach)

–	1,4	M	Natriumchlorid (NaCl)
–	27	mM	Kaliumchlorid (KCl)
–	10	mM	Natriumphosphat (Na ₂ PO ₄)
–	18	mM	Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
–			in H ₂ O lösen; pH 7,3

TBS (10-fach)

–	1,5	M	Natriumchlorid (NaCl)
–	200	mM	Tris-HCl
–			in H ₂ O lösen; pH 7,5

Färbelösung

–	1	Tablette	Di-Amino-Benzidin (DAB)
–			in 20 ml TBS (1-fach) lösen, 10 min im Dunkeln inkubieren
–	30	µl	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)
–	2	mM	Nickelchlorid (NiCl ₂)

Stopplösung:

–	2	mM	Natriumazid
–			in H ₂ O lösen

4 Enzyme, Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

4.1 Enzyme, Antikörper und Längenstandards

Tab. III.05: In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Antikörper und Längenstandards.

Produkt	Hersteller
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG	Molecular Probes
Anti-Rabbit-HRP-IgG	Roche
Deoxyribonuclease I (DNase I)	Serva
DNA molecular weight marker X	Roche
Klenow DNA-Polymerase	Roche
Lysozym	Serva
Maldi-Peptidstandard	Sigma
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Precision Pro Molecular Weight Marker	Bio-Rad
Pronase E	Serva
Proteinmarker XII	Novex
Restriktionsendonukleasen	Roche, Invitrogen, Amersham Pharmacia Biotech, Stratagene
Ribonuclease A (RNase A)	Serva
<i>rpf2</i> -specific peptidic Antibody	Eurogentec
<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche
T4 DNA Ligase	Roche
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Sigma, Eppendorf, Qiagen
Trypsin (modifiziert)	Promega

4.2 Chemikalien

Tab. III.06: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien. Alle weiteren verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Produkt	Hersteller
α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure	Sigma
β -Mercaptoethanol	Roth
2-Propanol	Roth
3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat) (DTNB)	Sigma
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- α -Galaktosid (X-Gal)	Invitrogen
Acetonitril (CH ₃ CN)	Roth
Acetyl-CoA	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth
Agar	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Antibiotic Medium No. 3	Oxoid
Antibiotika	Serva, Sigma
Bacto Trypton	Difco
Bindesilan	Amersham Pharmacia Biotech
Biotin	Sigma
Brain-Heart-Infusion	Merck
Bromphenolblau, Natrium-Salz (BPB)	Serva
Chloroform	Roth
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Diaminobenzidin-Tabletten	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
dNTPs	Roche
Dye-Reagent Concentrate	Bio-Rad
Eisessig	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Serva
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Amersham Pharmacia Biotech
Ficoll 400	Serva

Harnstoff	Roth
Formaldehyd	Roth
Hefeextrakt	Oxoid
Iodoacetamid	Sigma
IPG Buffer	Amersham Pharmacia Biotech
IPG Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech
Magermilchpulver	Glücksklee
Methanol	Roth
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva
MSTFA	Macherey & Nagel
N,N'-Dimethylformamid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumsuccinat	Serva
N-Lauroylsarkosin-Natrium-Salz	Serva
Nukleotide	Roche
Oxalacetat	Sigma
Pharmalyte	Amersham
Phenol	Roth
Ponceau-S-Lösung	Sigma
Protokatechosäure	Sigma
Pyridin	Pierce
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
Salzsäure	Roth
Schwefelsäure	Roth
Sephadex G50	Amersham Pharmacia Biotech
TEMED	Serva
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth
Tris	Sigma
Tween 20	Sigma

4.3 Materialien

Tab. III.07: In dieser Arbeit verwendete Materialien.

Produkt	Hersteller
3MM Papier	Whatman
DNA Primer	ARK, Qiagen
Elektroporations-Küvetten (0,2 mm)	Bio-Rad
Eppendorfreaktionsgefäße (Eppis)	Greiner
Glasperlen (Ø 1 mm)	Retsch
Glaswaren	Schott
Hybond-N Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech
Immobiline Dry Strips (IPG)	Amersham Pharmacia Biotech
Kapillarsäule SPB-50	Supelco
Küvetten	Plastibrandt
Microcon Centrifugal Filter Devices YM 10	Millipore
Mikrotiterplatten	Greiner
Ni-NTA Magnetic Beads	Qiagen
Nitrocellulosefilter	Sartorius
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner
Pufferstreifen Anode/Kathode	Amersham Pharmacia Biotech
RNase Zap	Invitrogen
Reaktionsgefäß mit Deckel 1,5 ml	Diagonal
Reaktionsgefäß verschraubbar 1ml + 7ml	Biozym
RiboLyser Blue Tubes	Hybaid
Sterifilter Millex GS 0,22 µm	Sartorius
Ultrafiltration Membrane YM 10	Millipore
Ultrafree-4-Centrifugal Devices	Millipore
Ultrafree-15-Centrifugal Devices	Millipore

4.4 Kits

Tab. III.08: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Bradford Proteinbestimmung	BioRad
DIG Glycan Detection Kit	Roche Diagnostics
Nucleotrap Gel Extraction Kit	Macherey & Nagel
PCR Purification Kit	Qiagen
Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Spin Prep Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
TOPO Blunt Cloning Kit	Invitrogen

4.5 Geräte

Tab. III.09: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Amicon Stirring Cell 8050	Millipore
Autosampler AS 2000	Thermo Finnigan
Biofuge	Heraeus
Brutschränke	Memmert
Eppischüttler	Eppendorf
Feinwaagen	Sartorius
Gaschromatograph Trace GC	Thermo Finnigan
Gene Pulser, Pulse Controller	Bio-Rad
Hybridisierungsofen	Bachofer
IPGphor	Amersham Pharmacia Biotech
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann
Luftschüttler	New Brunswick, Gerhardt
Massenspektrometer Polaris Q	Thermo Finnigan
MALDI-TOF	Bruker
Mighty Small SE206b Dual Gel Caster	Hoefer
Multiphor II	Amersham
Multitemp III	Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Thermal-Cycler PTC-100	MJ Research
pH-Meter	Knick
Photometer L-3	Perkin Elmer Biosystems
Photometer LKB Biochrom 4060	Amersham Pharmacia Biotech

Pipettman	Gilson
Reacti-Therm Heating/Stirring Module	Thermo Finnigan
RiboLyser	Hybaid
Spannungsgeber	Amersham Pharmacia Biotech
Speedvac	Bachofer
Tischzentrifugen	Hermle, Kontron
Tischkühlzentrifuge	Eppendorf
Trans-Blot-Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
Ultraschallbad	Bandelin Electronic
UV-Transilluminator	UVP
VacuGene XL	Amersham Pharmacia Biotech
Videoprinter P67E	Mitsubishi
Wasserbäder	Kottermann
Wipptisch	Elmi
Zentrifugen	Beckmann, Heraeus, Eppendorf

4.6 Software zur Gerätesteuerung und Datenanalyse

Tab.III.10: In dieser Arbeit verwendete Software

Software	Hersteller / Referenz
BLAST-Local Alignmant Search Tool	Altschul <i>et al.</i> , 1997
Clone Manager Professional Suite 6.0	Scientific & Educational Software
CLUSTALX-Multiple Alignment Tool	Thompson <i>et al.</i> , 1997
DiAlign (Version 2.2 Beta)	Morgenstern, 1999
FastA-Programmpaket	Pearson und Lipmann, 1988
GenDB (Version 1.5)	Meyer <i>et al.</i> , 2003
LightCycler Software 3.5	Roche Diagnostics
Mascot	Perkins <i>et al.</i> , 1999
Massfrontier	Thermo Finnigan
Primer Designer (Version 4.20)	Scientific & Educational Software
Staden Sequence Analysis Package	Staden 1996
Treetool	ftp://rdp.life.uiuc.edu/pub/RDP/programs/TreeTool
XACQ 4.0 (MALDI TOF)	Bruker Daltronic
Xcalibur (GC/MS)	Thermo Finnigan
Xmass (MALDI TOF)	Bruker Daltronics

5 Kultivierung von Bakterien

5.1 Bakterienanzucht auf Festmedien und in Flüssigkultur

Die Kultivierung von Bakterien auf Festmedien erfolgt durch Ausstreichen von Einzelkolonien und anschließender Inkubation im Brutschrank. Dabei beträgt die Inkubationstemperatur für *E. coli* 37°C und für *C. glutamicum* 30°C. Zum Anlegen von Stammplatten werden von Einzelkolonien fraktionierte Ausstriche auf Festmedien gemacht.

Die Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien erfolgt durch Animpfung der Kultur mit einer Einzelkolonie von Festmedium. Kulturen von 5-10 ml werden im Reagenzglas im Roller, größere Mengen im Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei ca. 150-200 rpm angezogen. *E. coli* wird ü/N bei 37°C bis zur Stationärphase inkubiert. Für *C. glutamicum* wird ü/N bei 30°C eine Vorkultur angezogen, die -soweit nicht anders angegeben- 1:100 in frisches Medium überimpft wird.

5.2 Lagerung von Bakterien

Festmediumplatten können nach der Inkubation für einige Wochen bei 4°C gelagert werden. Zum Schutz vor Austrocknung werden die Platten mit Parafilm umwickelt. Eine dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen erfolgt als Glycerinkultur. Dazu werden die Zellen aus ca. 5-10 ml einer ü/N inkubierten Bakterienkultur durch Zentrifugation pelletiert, in 200 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert und mit 800 µl 87 % Glycerin versetzt. Die so erhaltenen Glycerinkulturen können mehrere Jahre bei -20°C gelagert werden. Zur erneuten Anzucht werden die Glycerinkulturen zum Erhalt von Einzelkolonien auf Festmediumplatten ausgestrichen.

5.3 Bestimmung des Bakterientiters

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wird durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm in einem Spektralphotometer verfolgt. Als Referenz dient steriles Nährmedium. Eine OD_{595} von 1 entspricht einem Titer von ca. 1×10^8 Zellen pro ml für *C. glutamicum* und ca. 2×10^8 Zellen pro ml für *E. coli*. Für die Bestimmung von *colony forming units* (cfu) wird eine Verdünnungsreihe angelegt, auf Festmediumplatten ausplattiert und nach der Inkubation ausgezählt.

6 Isolierung von DNA

6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (nach QIaprep Spin Miniprep Kit Protocol, Qiagen)

Zur Isolierung reiner Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen können kommerziell erhältliche Kits wie z. B. das QIaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet werden. Die Vorgehensweise entspricht zunächst einer alkalischen Lyse. Von übrigen Zellbestandteilen befreit, wird die Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Durch Waschschr

Säule und anschließende Elution können so in kurzer Zeit große Mengen hochreiner Plasmid-DNA isoliert werden.

- 5 ml einer selektiv ü/N angezogenen Kultur in ein PE-Röhrchen überführen
- 5 min bei 3.000 abzentrifugieren
- alternativ: den gesamten Bakterienrasen einer frischen ü/N inkubierten Festmediumsplatte mit einer Pipette abkratzen und in ein Eppi überführen
- das Bakterienpellet in 250 µl P1-Puffer aufnehmen
- 250 µl Puffer P2 zugeben und sofort 6 × invertieren
- 350 µl Puffer P3 zugeben und sofort 6 × invertieren
- 10 min Zentrifugation bei 15.000 rpm
- eine QIAprep Säule in ein 2 ml Eppi stellen
- zur Bindung der Plasmid-DNA den Überstand der Zentrifugation auf die Säule geben, 1 min bei 15.000 rpm zentrifugieren, den Durchfluss verwerfen
- 500 µl Puffer PB auf die Säule geben, 1 min Zentrifugation bei 15.000 rpm, den Durchfluss verwerfen
- 750 µl Puffer PE auf Säule geben, 1 min Zentrifugation bei 15.000 rpm, den Durchfluss verwerfen
- 1 min Zentrifugation bei 15.000 rpm, um den Waschpuffer PE vollständig zu entfernen
- die Säule in neues 1,5 ml Eppi stellen
- 50 µl EB-Puffer oder H₂O bidest. auf die Säule geben, 1 min stehen lassen
- Elution der DNA durch 1 min Zentrifugation bei 15.000 rpm

6.2 Plasmid-DNA-Isolierung aus *C. glutamicum*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Corynebakterien entspricht im wesentlichen dem Vorgehen bei *E. coli*-Zellen. Zuvor wird jedoch die Zellwand durch eine Lysozymbehandlung abgebaut.

- 10 ml einer selektiv ü/N angezogene Kultur in ein PE-Röhrchen überführen,
- 5 min bei 3.000 rpm abzentrifugieren
- alternativ: ca. 40 % des Bakterienrasens einer frischen ü/N inkubierten Festmediumsplatte mit einer Pipette abkratzen
- die Zellen in einem 1 ml TES resuspendieren und in ein Eppi überführen
- die Zellen 15 sec bei 15.000 rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen
- das Pellet in 200 µl HB1 mit 20 mg/ml Lysozym (frisch angesetzt) und 10 µg/ml RNase A resuspendieren
- 2 bis 3 h bei 37°C im Roller inkubieren
- 400 µl HB2 zugeben und sofort 6 × invertieren
- das Eppi 3 min auf Eis abkühlen
- 300 µl HB3 zugeben und sofort 6 × invertieren
- 15 min Zentrifugation bei 15.000 rpm
- den Überstand in ein neues Eppi überführen und mit 500 µl Phenol/Chloroform mischen
- 3 min Zentrifugation bei 15.000 rpm

- die obere Phase in ein neues Eppi überführen, 900 µl Isopropanol (–20°C) zusetzen und mehrmals invertieren
- 30 min Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4°C
- den Überstand verwerfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol waschen
- 15 min Zentrifugation bei 15.000 rpm und den Überstand quantitativ entfernen
- das DNA-Pellet 5 min bei 60°C trocknen
- und anschließend in 20 µl H₂O bidest. aufnehmen

6.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Zur Darstellung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wird zunächst deren Zellwand durch Lysozym-Einwirkung abgebaut und die so erzeugten Sphäroplasten anschließend durch Detergenz-Behandlung lysiert. Durch PronaseE-Behandlung und Phenolisierung werden die Proteine extrahiert und die chromosomale DNA durch Ethanol fällung isoliert.

- 10 ml LBG-Medium werden mit einer Einzelkolonie beimpft und ü/N bei 30°C im Roller inkubiert
- die Kultur in ein PE-Röhrchen überführen, 5 min Zentrifugation bei 3.000 rpm
- das Pellet mit 10 ml TES waschen, 5 min Zentrifugation bei 3.000 rpm
- das Pellet in 3 ml HB1 mit 20 mg/ml Lysozym (frisch ansetzen) resuspendieren
- 2 bis 3 h bei 37°C im Roller inkubieren
- 200 µl 20 % SDS zugeben und invertieren bis die Lösung aufklart
- 5 min auf Eis stellen, eine Spatelspitze PronaseE zugeben
- 1 bis 2 h bei 37°C im Roller inkubieren
- 3 ml Phenol/Chloroform zugeben und unter vorsichtigem Invertieren gut vermischen
- 10 min Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4°C im JA17-Rotor
- den Überstand vorsichtig mit einer abgeschnittenen blauen Spitze abnehmen und in ein neues PE-Röhrchen überführen
- die Phenolisierung des Überstandes mindestens ein weiteres Mal mit 3 ml Phenol/Chloroform wiederholen
- den Überstand in ein neues PE-Röhrchen überführen, mit 96 % Ethanol (–20°C) auf 12 ml auffüllen und invertieren bis die DNA ausfällt
- 20 min Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C im JA17-Rotor
- das DNA-Pellet mit 4 ml 70 % Ethanol waschen, 5 min Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4°C im JA17-Rotor
- den Überstand quantitativ verwerfen und das Pellet 5 min bei 60°C trocknen
- das Pellet in 100 bis 300 µl H₂O bidest. bei 60°C lösen, in ein Eppi überführen und bei 4°C lagern

7 Reinigung von DNA

7.1 Sephadex-Gelfiltration (Sambrook *et al.*, 1989)

Durch Sephadex-Säulengelfiltration können Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte getrennt werden. Das Ausschlussvolumen der Poren erlaubt kleineren Molekülen das Eindringen in das Material, während größere Moleküle wie z. B. Plasmid-DNA nicht beeinflusst werden. Verunreinigungen in der DNA-Lösung wie Salze, Nukleotide oder Phenol werden beim Durchfluss durch die Säule zurückgehalten und somit herausgefiltert.

- ca. 5 g Sephadex G50 2 h in 100 ml H₂O bidest. quellen lassen
- überschüssiges H₂O abgießen, zweimal durch frisches H₂O bidest. ersetzen und jeweils zwei weitere Stunden quellen lassen. Anschließend die Sephadexlösung autoklavieren
- zur Silikonisierung von Glaskügelchen (Ø ca. 1 mm) diese in Silikonlösung tränken, die Lösung abgießen und die Kügelchen 1 h bei 180°C in offenem Gefäß backen
- ein silikonisiertes Glaskügelchen in eine blaue Spitze geben und die Spitze danach in ein Weichagar-Röhrchen stellen
- 700 µl sterile Sephadex-Lösung in die Spitze pipettieren
- 10 min Zentrifugation bei 3.000 rpm zum Packen der Säule
- die gepackte Säule in ein neues Weichagar-Röhrchen stellen
- die DNA-Lösung auf das trockene, gepackte Sephadex-Material geben
- 10 min Zentrifugation bei 3.000 rpm
- die durchgelaufene und auf diese Weise gereinigte DNA-Lösung weiterverwenden

7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration (Sambrook *et al.*, 1989)

DNA-Konzentrationen können durch Bestimmung der optischen Dichte bestimmt werden. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht ca. 50 µg doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg einzelsträngiger DNA pro ml. Die Reinheit der DNA wird durch den Vergleich der Extinktionen bei den Wellenlängen 260 und 280 nm kontrolliert. Reine DNA besitzt einen Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,65 bis 1,85.

8 DNA-Analysen

8.1 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ist abhängig vom Molekulargewicht, der DNA-Konformation, der Agarose-Konzentration sowie der angelegten Feldstärke. Die Laufstrecke linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle verhält sich umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht bzw. zu ihrer Länge in Basenpaaren. Zur Größenbestimmung unbekannter DNA-Fragmente wird ein Längenstandard bei der Elektrophorese als Referenz zusätzlich auf das Gel aufgetragen.

Die eingesetzte Agarose-Konzentration bei der Agarose-Gelelektrophorese beträgt je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,8 % und 4 %. Als Elektrophorese-Puffer dient TA-Gelpuffer. Um ein Absinken der DNA-Proben in die Geltaschen zu gewährleisten, wird die DNA mit glycerinhaltigem Bromphenolblau-Ladungspuffer (BPB) versetzt. Während der Elektrophorese bei einer Spannung von 50 bis 120 V und einer maximalen Stromstärke von 400 mA dient das Bromphenolblau als Marker für die Laufstrecke. In die DNA interkalierendes Ethidiumbromid (EtBr) und anschließende UV-Beleuchtung des Gels ermöglichen eine Visualisierung der DNA.

- 0,8 % bis 4 % Agarose solange in TA-Gelpuffer aufkochen bis die Agarose vollständig gelöst ist
- die Agaroselösung auf ca. 60°C abkühlen lassen, in eine Gelkammer einfüllen und sofort einen Gelkamm einsetzen
- das Gel nach dem Auspolymerisieren mit TA-Gelpuffer überschichten und den Kamm entfernen
- die DNA-Proben und einen Längenstandard mit jeweils 3 µl BPB versetzen und in die Geltaschen einfüllen
- die elektrophoretische Trennung bei einer Spannung von 50 bis 120 V und einer Stromstärke von maximal 400 mA durchführen
- nach Beendigung des Elektrophoreselaufs das Gel 5 min in EtBr-Lösung (10 µg/ml) färben und 1 min in H₂O entfärben
- Geldokumentation durch Fotografieren bei UV-Anregung auf einem Transilluminator

8.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel können definierte Fragmente z. B. für anschließende Klonierungen oder PCR-Experimente wieder isoliert werden. Nach schwachem Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid und bei möglichst kurzer UV-Bestrahlung wird das entsprechende Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppi überführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgt anschließend z. B. mit dem Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids (Macherey & Nagel).

- das DNA-Fragment möglichst zügig aus dem Agarosegel bei schwachem UV-Durchlicht, um Mutationen zu vermeiden, ausschneiden und in ein Eppi überführen
- pro 100 mg Agarose 300 µl Puffer NT1 zugeben; 15 µl Nucleotrap Suspension zugeben und vortexen
- 10 min Inkubation im Wasserbad bei 50°C, dabei die Suspension alle 2 bis 3 min durch Vortexen durchmischen
- 30 sec Zentrifugation bei 15.000 rpm, den Überstand verwerfen
- 500 µl Puffer NT2 zugeben, vortexen, 30 sec Zentrifugation bei 15.000 rpm und den Überstand verwerfen
- den Waschschrift mit Puffer NT2 wiederholen, anschließend zweimal mit Puffer NT3 waschen
- den Überstand quantitativ entfernen und das Pellet 10 min bei Raumtemperatur unter einem Abzug trocknen
- das Pellet in 20 bis 50 µl H₂O bidest. resuspendieren

9 Klonierungsexperimente

9.1 DNA-Restriktion (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgt gemäß den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen unter Verwendung der mitgelieferten Puffer oder von TA-Restriktionspuffer. Die Inaktivierung von Restriktionsenzymen kann durch 20 min Hitzebehandlung bei 65°C bzw. 85°C erreicht werden.

9.2 Erzeugung von *blunt ends*

Um nicht-kompatible *sticky end*-DNA-Fragmente ligieren zu können, müssen diese in *blunt ends* umgewandelt werden. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase besitzt 5'→3'-Polymeraseaktivität sowie 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Mit diesem Enzym können daher sowohl 5'-Überhänge durch Auffüllen als auch 3'-Überhänge durch Abbau nicht gepaarter Nukleotide in *blunt ends* überführt werden. Die so erzeugten *blunt ends* sind in beliebiger Kombination ligierbar.

- ca. 20 µl eines Spaltungsansatzes hitzeinaktivieren
- 3 µl TA-Restriktionspuffer und 1 µl Klenow DNA-Polymerase (2 bis 4 U/µl) zusetzen
- je 1 µl der benötigten dNTPs (10 mM) zugeben
- mit H₂O bidest. auf 30 µl auffüllen
- 60 min Inkubation bei 37°C
- Inaktivierung des Enzyms durch 20 min Hitzebehandlung bei 70°C oder Phenolisierung
- Abtrennung freier Nukleotide durch Sephadex-Behandlung

9.3 5'-Dephosphorylierung gespaltener DNA

Um die Religation gespaltener DNA zu verhindern, können DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (*shrimp* Alkalische Phosphatase, SAP) behandelt werden. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen an den Enden der linearisierten DNA verhindert eine erneute Religation. Dephosphorylierte DNA-Fragmente können nur mit phosphorylierter DNA ligiert werden. Die SAP-Behandlung erfolgt unter den vom Hersteller genannten Bedingungen. Die dephosphorylierte DNA muss vor der Weiterverarbeitung aufgereinigt werden.

9.4 Ligation von DNA

Die DNA-Ligation erfolgt ATP-abhängig durch die Aktivität der T4-DNA-Ligase, die 3'-OH-Gruppen mit 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle verknüpft. Kompatible *sticky end* Fragmente können dabei ebenso ligiert werden wie beliebige *blunt end*-Fragmente. Vor der Ligation müssen die Restriktionsendonukleasen aus den DNA-Spaltungsansätzen inaktiviert werden. Die Insert-DNA wird bei der anschließenden Ligationsreaktion in der Regel im Überschuss (ca. 7:1) zur Vektor-DNA zugegeben.

Ligationsansatz aus:

ca. 20 µl gespaltene Insert-DNA (abhängig von ihrer Konzentration)

ca. 3 µl gespaltene Vektor-DNA (abhängig von ihrer Konzentration)

4 µl ATP-haltiger T4-Ligasepuffer

2 µl T4-DNA-Ligase

mit H₂O bidest. auf 40 µl auffüllen

- das Eppi mit dem Ligationsansatz in eine mit ca 20°C warmen Wasser gefüllte Isolierkanne überführen und ü/N auf 4°C im Kühlschrank abkühlen
- der Ligationsansatz muß vor einer Elektroporation durch eine Sephadex-Gelfiltration deionisiert werden

10 DNA-Transfer

10.1 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen (nach Gene Pulser Manual, Bio-Rad)

Zur DNA-Transformation durch Elektroporation werden vorbehandelte *E. coli*-Zellen mit freier DNA vermischt und einer elektrischen Feldstärke von über 10 kV/cm ausgesetzt, wodurch es zur Aufnahme der DNA in die Zellen kommt. DNA und Zellsuspension müssen ionenfrei sein, um einen erhöhten Stromfluss durch die Lösung zu vermeiden. Die Entladezeiten des Kondensators liegen bei optimaler Durchführung über 5 ms. Es wurden der *Gene Pulser* und *Pulse Controller* sowie Elektroporationsküvetten der Firma Bio-Rad (München) verwendet.

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen:

- Eine *E. coli*-Einzelkolonie in 5 ml LBG-Medium überimpfen und ü/N bei 37°C im Roller inkubieren
- 2,5 ml der Vorkultur in 250 ml LBG-Medium überimpfen und bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₅₈₀ von 0,5 bis 0,7 anziehen
- die Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen, alle weiteren müssen Schritte auf Eis ausgeführt werden, die Lösungen und Zentrifugen müssen vorgekühlt werden
- 250 ml der Kultur 15 min bei 6.000 rpm im JA10-Rotor abzentrifugieren
- den Überstand abgießen und den Rücklauf vollständig abziehen
- den Zentrifugenbecher zweimal mit ca. 20 ml H₂O bidest. vorsichtig ausspülen, ohne das Pellet zu lösen
- das Pellet in ca. 5 ml H₂O bidest. lösen und danach mit H₂O bidest. auf 250 ml auffüllen
- die Zellen 15 min bei 5.000 rpm abzentrifugieren
- den Überstand sofort abgießen und das Zellpellet im Rücklauf resuspendieren
- die Suspension in 50 ml 15 % Glycerin aufnehmen und auf zwei JA20- Zentrifugenbecher verteilen
- 15 min Zentrifugation bei 5.000 rpm und den Überstand anschließend vollständig abziehen
- das Pellet in 0,5 bis 1 ml 15 % Glycerin aufnehmen
- die Zellen zu je 60 µl in Eppis aliquotieren, bei -80°C schockgefrieren und lagern

Elektroporation kompetenter *E. coli*-Zellen:

- kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis auftauen, DNA und Küvetten ebenfalls auf Eis stellen
- Pulsbedingungen:
 - Kapazität: 25 μ F
 - Widerstand: 400 Ω
 - Spannung: 2,5 kV (bei 0,2 cm Küvetten)
- 3 bis 20 μ l ionenfreie DNA zu 60 μ l aliquotierter Zellsuspension geben
- 1 min auf Eis inkubieren
- die Suspension ganz nach unten in eine Elektroporationsküvette pipettieren
- die Küvette abtrocknen, in die *Gene Pulser* Apparatur stellen und den Puls auslösen
- sofort 1 ml SOC-Medium in die Küvette geben und kurz mit den Zellen durchmischen
- die Zellen in ein Eppi überführen und 60 min bei 37°C regenerieren
- die Zellen anschließend in verschiedenen Mengen auf Selektionsmedium ausplattieren

10.2 Elektrotransformation von *C. glutamicum* (nach Tauch *et al.*, 2002)**Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen:**

- eine *C. glutamicum*-Einzelkolonie in 50 ml BHIS-Medium überimpfen und ü/N bei 30°C und 175 rpm inkubieren
- 5 ml der Vorkultur als Inokulum für 250 ml auf 30°C vorgewärmtes BHIS-Medium verwenden und die Kultur bei 30°C und 175 rpm bis zu einer OD₅₈₀ von ca. 1,75 anziehen
- die Zellen 10 min auf Eis abkühlen, alle weiteren Schritte müssen auf Eis ausgeführt werden, die Lösungen und Zentrifugen müssen vorgekühlt werden
- zweimal 125 ml der Kultur 15 min bei 4°C und 6.000 rpm abzentrifugieren
- den Überstand abgießen und den Rücklauf vollständig abziehen
- das Pellet in 2 ml TG-Puffer resuspendieren, in zwei sterile JA17-Zentrifugenbecher überführen und mit TG-Puffer auf jeweils 25 ml auffüllen
- 10 min Zentrifugation 6.000 rpm bei 4°C
- den Überstand abgießen und den Rücklauf vollständig abziehen
- den Waschschrift mit 25 ml TG-Puffer wiederholen
- den Waschschrift zweimal mit 25 ml 10 % Glycerin wiederholen
- das Pellet in 1 ml 10 % Glycerin resuspendieren
- und die Zellen in vorgekühlten Eppis zu je 150 μ l aliquotieren, bei –80°C schockgefrieren und lagern

Elektroporation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen:

- ein Reagenzglas mit 4 ml BHIS-Medium 5 min in einem 46 °C Wasserbad vorwärmen
- kompetente *C. glutamicum*-Zellen auf Eis auftauen, DNA und Küvetten ebenfalls auf Eis stellen
- Pulsbedingungen einstellen:
 - Kapazität: 25 μ F
 - Widerstand: 200 Ω
 - Spannung: 2,5 kV
- 3 bis 20 μ l ionenfreie DNA zu 150 μ l aliquotierter Zellsuspension geben

- 1 min auf Eis inkubieren
- die Suspension ganz nach unten in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettieren
- die Suspension vorsichtig mit 0,8 ml 10 % Glycerin überschichten (die Küvette schräg halten, damit sich die Schichten nicht durchmischen)
- die Küvette abtrocknen, in die *Gene Pulser* Apparatur stellen und den Puls auslösen,
- die Zellen sofort in ein Reagenzglas mit 4 ml auf 46°C vorgewärmtes BHIS-Medium geben, und die Küvette anschließend mit 1 ml des BHIS ausspülen
- die Zellen im Reagenzglas 6 min in einem 46°C warmen Wasserbad inkubieren
- anschließend 50 min bei 30°C im Schüttler regenerieren
- die Zellen in ein PE-Röhrchen überführen und 5 min bei 3.000 rpm zentrifugieren und anschließend den Überstand verwerfen
- die Zellen in 600 µl BHIS resuspendieren und in verschiedenen Mengen auf Selektionsmedium ausplattieren

Auf den Hitzeschock bei 46°C kann bei der Elektroporation replikativer Plasmide in restriktionsdefekte *C. glutamicum*-Stämme (wie z. B. RES167) verzichtet werden; die Transformationsfrequenz sinkt in diesem Fall allerdings auf ca. 20 % (Kirchner und Tauch, 2003).

11 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der gezielten enzymatisch katalysierten Amplifikation von DNA-Molekülen *in vitro* (Mullis *et al.*, 1986). Durch automatisierte, sich wiederholende Zyklen aus Denaturierung, Primerbindung und Polymerisation kommt es dabei unter optimalen Bedingungen pro Zyklus zu einer Verdoppelung des zwischen den Primern liegenden DNA-Fragmentes, also einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA. Im ersten Schritt eines PCR-Zyklus wird die Ursprungs-DNA (*template*) durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge aufgeschmolzen. Eine Absenkung der Temperatur führt im nächsten Schritt zur Bindung (*annealing*) der Primer an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen *template*-DNA. Von den Primern ausgehend wird anschließend im dritten Schritt der zwischen ihnen liegende Bereich der *template*-DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen wurden mit einem PCT-100 Thermocycler (MJ Research Inc.) durchgeführt. Neben der *template*-DNA, spezifischen Primern und einer thermostabilen Polymerase (*Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase) werden für die PCR-Reaktion magnesiumhaltiger Polymerase-Puffer und dNTPs benötigt. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase verfügt die *Pfu*-Polymerase über eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, die die Fehlerrate bei der Amplifikation deutlich reduziert (*proof-reading*). Die *Pfu*-Polymerase produziert zudem keine A-Überhänge an den 3'-Enden der Amplifikate, so dass eine direkte *blunt end*-Klonierung der erzeugten DNA-Moleküle möglich ist.

11.1 PCR-Primerdesign

Die Qualität der Primer ist für die Spezifität und Effizienz der PCR-Reaktion von entscheidender Bedeutung (McPherson, 1995). Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, sollten Primer eine Länge von mindestens 17 Nukleotiden (nt) haben; ab einer Länge von 30 nt ist jedoch keine Zunahme der Spezifität mehr zu erwarten. Die Längen der verwendeten Primer sowie deren Schmelztemperaturen sollten möglichst identisch sein, der G+C-Gehalt dabei zwischen 50 und 60 % liegen. Zur einfachen Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) eines Primers kann folgende Formel verwendet werden:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2(\text{A}+\text{T}) + 4(\text{G}+\text{C})$$

Zusätzliche 5'-Extensionen, z. B. eingefügte Restriktionsschnittstellen, werden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Beim Design der Primer muß ferner die Entstehung Primer-Dimeren und die Ausbildung von Haarnadelstrukturen innerhalb der Primer vermieden werden. Für die Berechnung und Analyse von Primersequenzen wurde das Programm Primer Designer, Version 4.20 (Scientific & Educational Software) verwendet.

11.2 PCR-Reaktion

PCR-Reaktionsgemisch:

- 1 μl *template*-DNA
- je 0,5 μl Primer, Konzentration 50 μM
- 23 μl PCR-Mastermix

– das PCR-Reaktionsgefäß verschließen, in den Thermoblock stellen und das Programm starten

PCR-Programm:

- | | | | |
|----------|----------|------|---|
| – Step 1 | 3 min | 94°C | Vorlauf |
| – Step 2 | 30 sec | 94°C | Denaturierung |
| – Step 3 | 30 sec | 60°C | <i>annealing</i> der Primer (T_m der Primer -5°C) |
| – Step 4 | 30 sec | 72°C | Polymerisation (abhängig von der Länge des PCR-Produkts und der Prozessivität der Polymerase) |
| – Step 5 | | | 30 malige Wiederholung von Step 2 bis Step 4 |
| – Step 6 | 6 min | 72°C | Extension |
| – Step 7 | ∞ | 4°C | Lagerung |

11.3 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Qiagen)

Um überschüssige Primer-Moleküle, Polymerasen, Salze und Nukleotide aus PCR-Ansätzen zu entfernen, wurde das PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet.

- eine QIAquick Aufreinigungssäule in ein 2 ml Eppi stellen
- die PCR-Reaktion mit dem 5-fachen Volumen PB-Puffer versetzen und auf die Säule geben, um die DNA an das Säulenmaterial zu binden
- 60 sec Zentrifugation bei 15.000 rpm, den Durchfluss anschließend verwerfen

- 750 µl PE-Puffer auf die Säule geben
- 60 sec Zentrifugation bei 15.000 rpm, den Durchfluss verwerfen,
- erneut 60 sec bei 15.000 rpm zentrifugieren, um den PE-Puffer vollständig zu entfernen
- die Säule in ein neues 1,5 ml Eppi stellen
- 50 µl EB-Puffer oder H₂O bidest. auf Säule pipettieren, 1 min stehen lassen
- Elution der DNA durch 1 min Zentrifugation bei 15.000 rpm

12 Klonierung von PCR-Amplifikaten (TOPO Cloning Kit Manual, Invitrogen)

PCR-Produkte, die unter Verwendung von *proofreading*-Polymerasen (z. B. *Pfu*) amplifiziert wurden und über *blunt ends* verfügen, können nach Aufreinigung direkt in linearisierte Vektoren kloniert werden. Sehr effizient kann dies mit kommerziell erhältlichen linearisierter Vektoren (wie z. B. dem pCR-BluntII, Invitrogen) durchgeführt werden. Zur Katalyse der Ligation besitzen diese Vektoren eine an ihrem 3'-Ende gebundene DNA-Topoisomerase.

Mit *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte besitzen hingegen einen Adenosin-Überhang am 3'-Ende. Die Klonierung dieser Amplifikate wird durch linearisierte Vektoren, die einen T-Überhang und DNA-Topoisomerase am 3'-Ende tragen (z. B. pCR2.1, Invitrogen) vereinfacht. In den jeweiligen Kits enthaltene, chemisch kompetente *E. coli*-Zellen können für die Transformation der Topoisomerase-katalysierten Ligationsansätze verwendet werden.

Ligationsansatz:

- 0,5 bis 4 µl PCR-Produkt
- 1 µl *salt solution* (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl₂)
- 1 µl Vektor (pCR-BluntII-TOPO oder pCR2.1-TOPO)
- den Ansatz mit H₂O bidest. auf 6 µl auffüllen und sofort in einem Eppi vermischen
- 2 bis 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- das Eppi auf Eis stellen und den Ligationsansatz sofort für die Transformation einsetzen

Transformation:

- ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen (TOP10) auf Eis auftauen
- 2 µl des Ligationsansatzes mit dem Aliquot kompetenter Zellen vermischen, nicht vortexen
- 5 min Inkubation auf Eis
- 30 sec Hitzeschock bei 42°C und die Zellen anschließend auf Eis abkühlen
- 250 µl SOC-Medium zugeben und die Zellen 1 h bei 37°C regenerieren
- 50 und 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsmedium mit X-Gal ausplattieren, ü/N bei 37°C inkubieren

13 Gendeletion durch die „Gene-SOEing“-Methodik (Horton, 1995)

Um Deletionen möglichst rasch und gezielt im Genom von *C. glutamicum* zu etablieren, wurde die Methode des *Gene-Splicing by Overlap Extension* (GeneSOEing) angewendet. Bei dieser Technik werden DNA-Fragmente *in vitro* während einer PCR-Reaktion neu kombiniert. Sie basiert auf einer Erweiterung am 5'-Ende des zweiten Primers, die das reverse Komplement eines dritten Primers (c') darstellt, der an einer anderen Stelle des Templates bindet. In einer zweiten PCR-Reaktion fungiert das Amplifikat der ersten PCR-Reaktion als Primer (c), zusammen mit einem vierten Primer (d) entsteht so ein Fusionsprodukt (Abb. III.01). So können Gene oder Genabschnitte fusioniert bzw. gezielt deletiert werden.

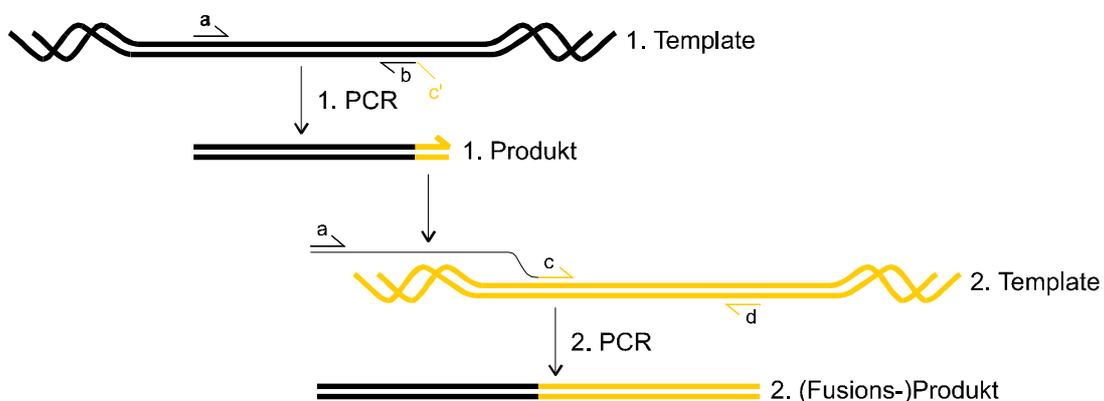


Abb.III.01: Schematische Darstellung des GeneSOEing.

Um eine chromosomale Deletion zu etablieren, werden die Bereiche vor und hinter dem zu deletierenden Bereich fusioniert und das Produkt unter Benutzung des *sacB*-Selektionssystems (Schäfer et al. 1994) gegen den intakten Abschnitt des Chromosoms ausgetauscht. Bei Verwendung des *pK18mobsacB* Vektors wird durch Selektion auf Kanamycin zunächst auf die über homologe Rekombination stattfindende Integration des inserttragenden Vektors selektioniert. Nachfolgend kann auf sucrosehaltigem (10%) Medium auf den Verlust des Vektors, der in *C. glutamicum* nicht replizieren kann, selektioniert werden. Der Vektor kann auf zwei Weisen aus dem Chromosom desintegrieren. Im ersten Fall erfolgt eine homologe Rekombination über dieselbe Flanke wie beim ersten Rekombinationsereignis und der ursprüngliche Genotyp wird wiederhergestellt. Die Mutante revertiert zum Wildtyp. Erfolgt die zweite homologe Rekombination aber innerhalb der anderen Flanke, verbleibt das die Deletion beinhaltende PCR-Produkt im Chromosom, während das Wildtyp-Allel verloren geht.

13.1 PCR-Schnelltest zum Nachweis von Integrationen und Deletionen im *C. glutamicum* Chromosom

Der PCR-Schnelltest dient dazu, Integrationen von Plasmiden zur Gendisruption bzw. Deletionen im Chromosom von *C. glutamicum* mittels PCR nachzuweisen, ohne zuvor eine Gesamt-DNA Isolierung (vgl. Abschnitt III.6.4) durchführen zu müssen (Abb.III.02). Die für die PCR benötigte *template*-DNA wird durch kurzes Aufkochen der *C. glutamicum*-Zellen erhalten. Als Primer dienen drei (Integration) bzw. vier (Deletion) Oligonukleotide, deren Bindestellen wie folgt gewählt werden:

Integrationsnachweis:

- P1 = knapp außerhalb vom 5'-Bereichs des Integrationsfragments
- P2 = Vektorspezifischer *Primer* im 3'-Bereich des Integrationsfragments
- P3 = knapp außerhalb des 3'-Bereichs des Integrationsfragments

Bei erfolgreicher Integration muß die *Primerkombination* P1/P2 ein Fragment der entsprechenden Größe ergeben, bei der Kombination P1/P3 darf hingegen kein Amplifikat auftreten.

Deletionsnachweis:

- Pa = knapp außerhalb vom 5'-Bereichs des deletierten Bereiches
- Pb = knapp außerhalb vom 3'-Bereichs des deletierten Bereiches
- Pc = 5'-Primer eines innerhalb des Deletionsbereiches liegenden Abschnittes
- Pd = 3'-Primer eines innerhalb des Deletionsbereiches liegenden Abschnittes

Bei erfolgter Deletion muß eine PCR-Reaktion mit der *Primerkombination* Pa/Pb ein Amplifikat definierter Größe ergeben. Aus der *Primerkombination* Pc/Pd darf in einem entsprechenden Ansatz hingegen kein Amplifikat resultieren.

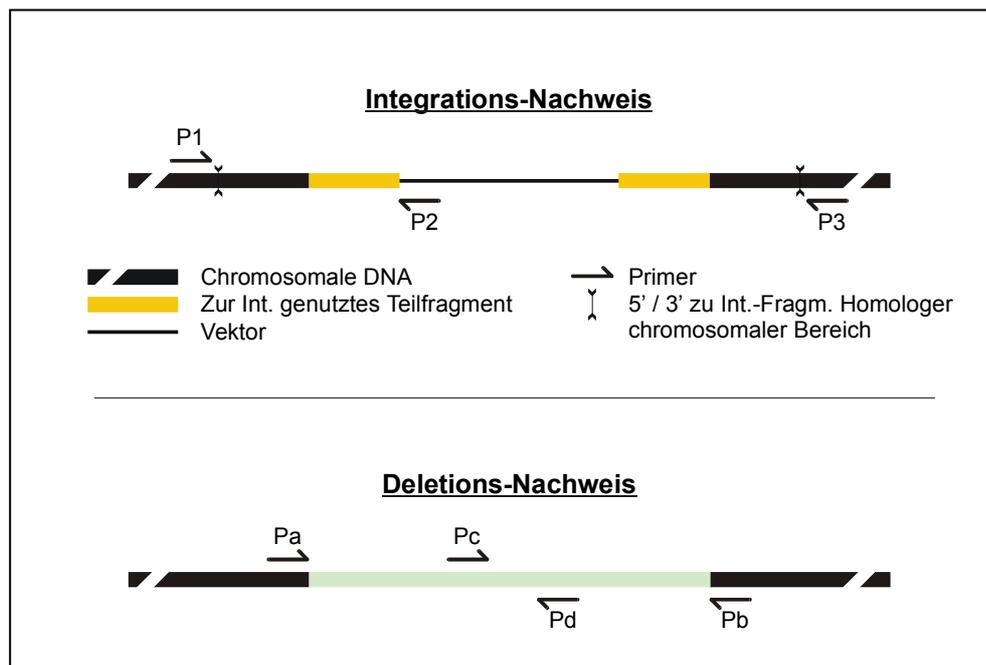


Abb.III.02: Schematische Darstellung des Integrations- bzw. Deletionsnachweises durch PCR

Sollte das vollständige Deletionskonstrukt noch integriert vorliegen, würden beide Primerkombinationen ein PCR-Produkt ergeben.

- mit einem Stocherholz etwa die Hälfte eines *C. glutamicum* Stocherstriches im Eppi in 100 µl H₂O bidest. resuspendieren
- die Zellsuspension 2 × 30 sec in der Mikrowelle bei 800 Watt aufkochen und anschließend auf Eis abkühlen
- einen PCR-Mastermix mit *Taq*-DNA-Polymerase + 1/5 Volumen Enhancer (Eppendorf) verwenden
- 1 µl der Zellsuspension als *template*-DNA in einem 25 µl PCR-Reaktionsansatz einsetzen

14 Auswertung von DNA- und Aminosäuresequenzen

Zur Assemblierung von Sequenzdaten sowie der Analyse von DNA- und abgeleiteten Proteinsequenzen wurde das *Staden sequence analysis package* (Staden, 1996) in der Version 02.0 und das FASTA-Programmpaket (Pearson and Lipman, 1988) verwendet. Homologievergleiche von DNA- und Proteinsequenzen mit in aktuellen Versionen der Datenbanken EMBL, GenBank und SWISSPROT zugänglichen Sequenzdaten erfolgte unter Verwendung des BLAST *search programs* (Altschul *et al.*, 1997). Multiple *alignments* von Proteinsequenzen wurden mit dem Programm DIALIGN (Morgenstern 1999) berechnet und dem Programm CLUSTAL X visualisiert (Thompson *et al.*, 1997). DNA-Sequenzen des *C. glutamicum*-Genomprojekts wurden automatisch mit dem GenDB-Programmpaket (Meyer *et al.* 2003) annotiert.

15 RNA-Isolierung

Bakterienzellen müssen zur Isolierung von RNA schnellstmöglich abgetötet und aufgeschlossen werden, um sicherzustellen, dass das Transkriptom während der Aufarbeitung keinen Veränderungen unterliegt. Aus diesem Grund werden die Zellen zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Aufschluß erfolgt anschließend im Ribolyser. Hierbei werden die Zellen durch sehr stark beschleunigte Glas- oder Quarzsandpartikel zerrieben. Proteine, Zellwandbestandteile und andere Zellkomponenten können nachfolgend durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die wasserlöslichen Nukleinsäuren (DNA und RNA) verbleiben dabei im Überstand. Die Aufreinigung der RNA erfolgt anschließend über spezielle Silikatsäulen, wobei verbliebene DNA enzymatisch durch RNase-freie DNase abgebaut wird. Die Qualität der isolierten RNA kann sowohl photometrisch als auch in denaturierenden Agarosegelen überprüft werden. RNA-Proben werden durch PCR auf eine eventuelle Verunreinigung mit DNA untersucht. Aus 2×10^9 *C. glutamicum* Zellen können in der Regel 50-70 µg Gesamt-RNA isoliert werden.

15.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus *C. glutamicum* Zellen (RNeasy-Mini-Kit Protocol, Qiagen;)

Ernte von *C. glutamicum*-Zellen

- Ca. 1×10^9 Zellen in einem Eppi pelletieren
- den Überstand verwerfen und die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- ggf. bei -80°C lagern

RNA-Isolierung

- ein gefrorenes Pellet in 800 µl RLT Puffer aufnehmen und zügig in ein Ribotube überführen (der RLT-Puffer muß mit β-Mercaptoethanol versetzt werden)
- die Suspension zweimal im Hybrid-Ribolyser bei Speed 6,5 für 30 sec ribolysieren, die Proben dazwischen auf Eis abkühlen
- das Ribolysat für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugieren
- den Überstand in ein Eppi überführen und mit 250 µl Ethanol vermischen
- das Gemisch auf eine RNeasy-Säule geben, für 30 sec zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen
- 700 µl RW1-Puffer zugeben, für 30 sec zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen
- die Säule in neues 2 ml Tube stellen und 500 µl RPE-Puffer zugeben (der RPE-Puffer muß mit Ethanol versetzt werden)
- Zentrifugation für 30 sec und den Durchlauf anschließend verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer zugeben, für 30 sec zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen
- die Säule 1 min trocken zentrifugieren und in neues Eppi (aus Kit) stellen
- 50 µl RNase freies Wasser zugeben, 1 min einwirken lassen und durch Zentrifugation für 1 min eluieren
- das Eluat auf Eis aufbewahren

15.2 RNA-Reinigung und DNase-Behandlung (RNeasy-Mini-Kit Protocol, Qiagen)

- das RNA-Eluat mit 350 µl RLT-Puffer vollständig durchmischen
- 250 µl Ethanol, durchmischen und die Lösung auf eine RNeasy-Säule geben
- Zentrifugation für 30 sec und den Durchlauf verwerfen
- 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer vermischen und auf die Säule geben
- Inkubation für 30 min bei 25°C
- 500 µl RW1-Puffer zugeben
- Zentrifugation für 30 sec und die Säule anschließend in neues Eppi stellen
- 500 µl RPE-Puffer zugeben
- Zentrifugation für 30 sec und den Durchlauf verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer zugeben
- Zentrifugation für 30 sec und den Durchlauf verwerfen
- 1 min trocken zentrifugieren und die Säule in ein neues Eppi stellen
- 50 µl RNase freies H₂O zugeben
- 1 min einwirken lassen und durch Zentrifugation für 1 min eluieren
- Elution wiederholen und das erhaltene Eluat auf Eis aufbewahren

15.3 Bestimmung von RNA-Reinheit und RNA-Konzentration

Im Biophotometer wird die Extinktion der RNA-Proben bei Wellenlängen von $\lambda = 230, 260, 280$ und 320 nm bestimmt und die jeweiligen Quotienten berechnet. Der Quotient E_{260}/E_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der Probe, er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (Farrell, 1993; Lottspeich und Zorbas, 1998). Der Messwert für $\lambda = 320$ nm gibt die Trübung der Probe (z. B. durch Proteinverunreinigungen) an und sollte gleich 0 sein. Die Messungen erfolgen in speziellen Plastikküvetten, die für UV-Strahlung geeignet sind.

15.4 Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA in denaturierenden Agarosegelen

Während der elektrophoretischen Trennung wandert denaturierte RNA entsprechend ihrer molekularen Masse bzw. ihrer Länge. Dabei treten bei Nachweis mit Ethidiumbromid unter UV-Licht die ribosomalen 16S und 23S RNAs als diskrete Banden auf, deren Fluoreszenzintensität ein Verhältnis von 1:2 betragen sollte. Bei einer nicht verunreinigten und nicht degenerierten RNA-Probe sollten diese Banden deutlich zu erkennen und scharf begrenzt sein. Messenger-RNAs-Moleküle sollten aufgrund ihrer unterschiedlichen Längen diffus zwischen den Banden und unterhalb der 16S rRNA-Bande erkennbar sein. (Farrell, 1993)

Präparation eines denaturierenden Agarosegels

- Gelkammer und Kamm mit RNase-Zap besprühen, einwirken lassen und mit RNase-freiem H_2O abspülen
- 2,7 g Agarose in 130 ml RNase-freiem H_2O aufkochen
- unter Rühren auf $80^\circ C$ abkühlen lassen
- 18 ml 10-fach MOPS-Puffer und 32,4 ml filtriertes Formaldehyd zugeben
- das Gel in eine RNase-freie Gelkammer gießen
- nach dem Auspolimerisieren das Gel mit MOPS-Elektrophorese-Puffer überschichten

Probenvorbereitung

- 1-2 μl RNA mit dem zweifachen Volumen Ladepuffer versetzen
- für 10 min bei $65^\circ C$ denaturieren und auf Eis abkühlen
- 2,3 μl EtBr-Ladepuffer (2 μl Ladepuffer + 0,3 μl Ethidiumbromid) zugeben

Elektrophorese

- den Gellauf bei einer Spannung von 80V solange durchführen, bis das Bromphenolblau den unteren Bereich des Gels erreicht hat
- Gel ggf. unter UV-Licht scannen bzw. fotografieren

15.5 PCR-basierter Test auf DNA-Freiheit von RNA-Proben

Um RNA-Eluate auf DNA-Verunreinigungen zu untersuchen, werden 2 µl der RNA-Probe als Template in einer PCR mit einem innerhalb des *C. glutamicum* Genoms bindenden Primerpaar (die erwartete Fragmentlänge sollte 500-1000 bp betragen) eingesetzt (vgl. Abschnitt III.11.2). Als Kontrolle dient dabei isolierte *C. glutamicum* Gesamt-DNA. Verunreinigte RNA-Proben und die Kontrolle führen zu einem Amplifikat, während aus PCR-Reaktionen mit DNA-freien RNA-Proben kein PCR-Produkt resultiert.

16 Transkriptionsmessungen mit dem LightCycler (QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit Protocol, Qiagen)

Die Transkriptionsstärke eines Gens kann per *real time reverse transcription* PCR (real time RT-PCR) mit dem LightCycler unter Verwendung des QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits bestimmt werden. Dazu wird die Template-RNA zunächst durch Verwendung von zwei reversen Transkriptasen (Omniskript und Sensiscript) quantitativ in cDNA umgeschrieben. Durch eine 15 minütige Inkubation bei 95°C werden die reversen Transkriptasen inaktiviert und gleichzeitig eine „HotStart“ Taq-DNA-Polymerase aktiviert. Sie amplifiziert ausgehend von spezifischen Primern und den entstandenen cDNA Template-Molekülen das zu untersuchende Gen. Der im Reaktionsansatz enthaltene Farbstoff SYBR Green I lagert sich dabei in die kleine Furche der entstehenden doppelsträngigen DNA-Moleküle. Die bei Anregung entstehende Fluoreszenz ist proportional zur Menge an entstehendem PCR-Produkt und kann mittels des Lightcyclers kontinuierlich während des gesamten PCR-Programms verfolgt werden. Mit Hilfe der LightCycler Software (Version 3.5) kann aus der Fluoreszenzsteigerung für jeden Reaktionansatz der sog. *crossingpoint* berechnet werden, der ein direktes Mass für die Ausgangsmenge an cDNA-Template bzw. an mRNA-Molekülen des zu untersuchenden Gens darstellt. Durch Vergleich der *crossingpoints* zweier Proben (P_1 und P_2) läßt sich so ein Faktor für die Transkriptionsstärken-Änderung des untersuchten Gens berechnen:

$$X = 2^{(P_1 - P_2)}$$

X: Faktor der Transkriptionsstärken-Änderung

Eine *crossingpoint*-Differenz von 1 entspricht also einer zweifachen Verstärkung oder Abschwächung der Transkription, von 2 dem 4-fachen, von 3 dem 8-fachen etc.

Mit dieser Methode läßt sich allerdings lediglich die Transkriptionsstärke eines einzelnen Gens in 2 verschiedenen Proben (z. B. nach Anzucht auf unterschiedlichen Medien oder zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten) bestimmen. Da nicht gewährleistet ist, dass 2 unterschiedliche Gene mit jeweils spezifischen Primern mit gleicher Effizienz von den cDNA-Template-molekülen amplifiziert werden, können verschiedene Gene nicht direkt miteinander verglichen werden. Die entstehenden PCR-Produkte werden am Ende des RT-PCR-Programms durch eine vom Gerät automatisch durchgeführte Schmelzpunktanalytik überprüft.

Ansatz für eine RT-PCR-Reaktion:

- 10 µl 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR MasterMix
- 1 µl Primer 1 (10 mM)
- 1 µl Primer B (10 mM)
- 0,2 µl QuantiTect RT-Mix
- 300 ng Template RNA
- mit RNase-freiem H₂O auf 20 µl auffüllen

Der Reaktionsansatz wird in die LightCycler-Kapillare pipettiert, mit dem dafür vorgesehenen Deckel verschlossen und kurz bei 3000 rpm anzentrifugiert. Anschließend können die Kapillaren in das Rotorkarussell gesteckt und der Lauf gestartet werden.

LightCycler RT-PCR Programm

Zeit	Temperatur	Temperaturänderung pro Sekunde	
Reverse Transkription			
20 min	50 °C	20 °C	Reverse Transkription
15 min	95 °C	20 °C	RT-Inaktivierung Taq-Aktivierung
PCR			
15 sec	94 °C	20 °C	Denaturierung
20 sec	nach Primer	20 °C	Annealing
20 sec	72 °C	2,0 °C	Polymerisation
55 Zyklen			
Schmelzpunktanalytik			
5 sec	95 °C	20 °C	Denaturierung
15 sec	56 °C	20 °C	
	95 °C	1,0 °C	Abkühlen zur Bildung von Dimeren
	40 °C	20 °C	

17 Extraktion von Proteinen**17.1 Herstellung von cytosolischen Proteinrohextrakten**

Für die Herstellung von Rohextrakten cytosolischer Proteine verschiedener *C. glutamicum*- bzw. *E. coli*-Stämme werden entsprechende Kulturen in Flüssigmedien bis zur gewünschten Wachstumsphase angezogen, gewaschen und in kleinem Volumen resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt in einem RiboLyser (Hybaid). Hierbei werden die Bakterienzelle durch sehr stark beschleunigte Keramik- bzw. Silikatpartikel zerrieben.

- 10-45 ml (abhängig von der Zelldichte) einer Bakterienkultur werden für 10 min bei 6.000 rpm in einem JA17-Rotor abzentrifugiert
- das Pellet zweimal mit 30 ml Aufschlusspuffer waschen
- das Pellet in ca. 750 µl Aufschlusspuffer resuspendieren und in ein RiboLyser-Tube überführen
- 2 ml RNase/Dnase-Lösung zugeben und auf 5 min auf Eis vorkühlen

- die Zellen im RiboLyser zweimal 30 sec bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/sec aufschließen; dazwischen auf Eis abkühlen
- das Ribolysat 5 min auf Eis abkühlen
- die Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 15.000 rpm und 4°C pelletieren
- den Proteinrohextrakt als klaren Überstand in Eppis aliquotieren und bei -20°C lagern

17.2 Isolierung und Konzentrierung von Proteinen aus Überständen bakterieller Kulturen

Zur Untersuchung derjenigen Proteine, die *C. glutamicum* in das umgebende Medium sekretiert, werden, die Zellen zunächst durch Zentrifugation vom Kulturüberstand abgetrennt werden. Für eine elektrophoretische Separation und eine Darstellung in Polyacrylamidgelen müssen die Proteine im Kulturüberstand dann 20 – 80-fach aufkonzentriert werden. Dazu wird eine Amicon Rührzelle verwendet, bei der durch Anlegen eines Überdrucks (5 bar) die proteinhaltige Lösung durch eine Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose gedrückt wird. Partikel, die größer als die Porengröße der Membran (z. B. 10.000 Da) sind, werden zurückgehalten und verbleiben so in einem kleineren Volumen.

- *C. glutamicum* Zellen werden in Minimalmedium MM1 bis zu einer OD₅₉₅ von 12 – 15 im Luftschüttler bei 30 °C und 150 rpm angezogen.
- die Zellen durch Zentrifugation für 40 min bei 8.000 rpm und 4 °C pelletieren
- den Kulturüberstand in einen neuen Zentrifugenbecher überführen und erneut abzentrifugieren
- den nun zellfreien Kulturüberstand in Aliquots (50 ml) in die Rührzelle überführen und durch Anlegen eines Überdrucks aufkonzentrieren
- vor dem Trockenfallen der Membran weiteren Kulturüberstand zugeben bis die gewünschte Konzentrierung erreicht wird

Um höhere Konzentrationen zu erreichen, können im Anschluß an die Rührzelle zusätzlich Ultrafree BioMax Filtereinheiten benutzt werden. Diese besitzen eine senkrecht stehende Ultrafiltrationsmembran, durch die per Zentrifugation die zu konzentrierende Lösung gedrückt wird. Der Vorteil der Zentrifugationsfiltereinheiten im Vergleich zur Rührzelle besteht in einem deutlich geringeren Rest- oder Totvolumen, allerdings können mit ihnen nur deutlich kleinere Volumina (5-15 ml) aufkonzentriert werden.

- den Kulturüberstand (5 – 15 ml) in die entsprechende Filtereinheit pipettieren
- Zentrifugation bei 3.800 rpm und 4 °C bis die Lösung fast vollständig durch die Membran gedrückt worden ist
- den Vorgang ggf. mehrmals wiederholen,
- den Filter dem zurückgebliebenen, konzentrierten Kulturüberstand spülen und in ein zur Aufbewahrung geeignetes Gefäß überführen

17.3 Aufreinigung Poly-His getaggtter Proteine aus komplexen Gemischen

Proteine die mit einem Affinitäts-Tag aus sechs hintereinander folgenden Histidinresten versehen sind, lassen sich schnell und effizient mit magnetischen Ni-NTA Agarosepartikeln aus einem komplexen Proteingemisch aufreinigen. Bei den verwendeten Partikeln handelt es sich um Agarose-Kügelchen in die magnetische Teilchen eingeschlossen und an deren Oberfläche stark Metallionen chelatierende Nitrilotriessigsäure-Gruppen (*nitrilotriacetic acid*, NTA) kovalent gebunden sind. Diese Gruppen sind mit Nickel-Ionen beladen und können direkt für die Bindung von 6 x His getaggtten Proteinen unter nativen und denaturierenden Bedingungen eingesetzt werden

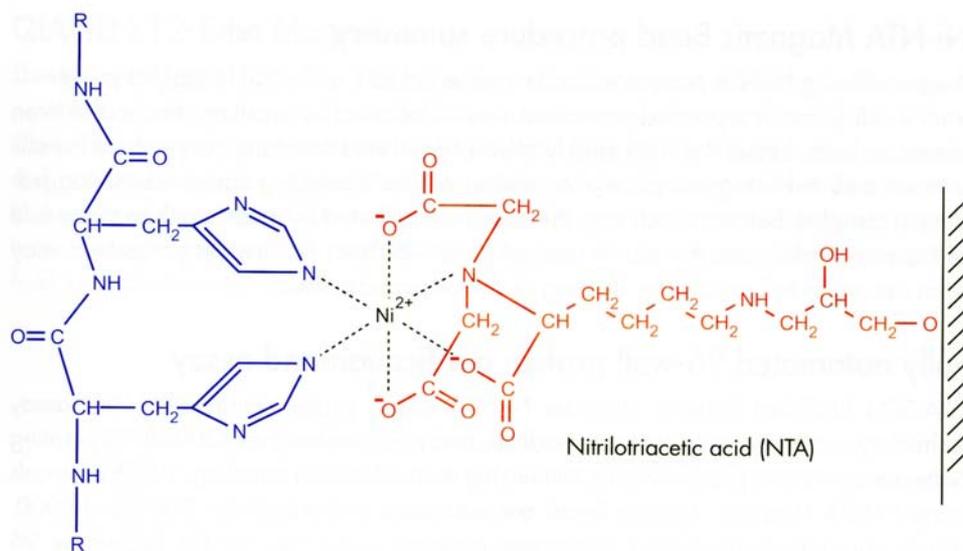


Abb. III.03: Schematische Darstellung der Bindung von zwei Histidinresten an die Ni-NTA-Gruppe eines Agarosepartikels.

Mit Hilfe eines Magneten können die Partikel inklusive des gebundenen Proteins aus der Proteinlösung separiert werden. Nach mehreren Waschschritten kann das getaggte Protein schließlich durch Erniedrigung des pH-Wertes oder durch Verdängung mit Imidazol von den magnetischen Ni-NTA Agarosepartikeln eluiert werden.

- Ni-NTA Magnetic Beads durch vortexen für 2 sec gründlich resuspendieren
- 300 µl der Suspension in einem Eppi mit 1 ml der Proteinlösung (z. B. konzentriertem Kulturüberstand) vermischen
(100 µl der 5% NI-NTA Magnetiv Bead Suspension binden 30 µg des 24 kDa DHFR Proteins)
- die Suspension unter ständiger Bewegung im Roller für 30 min – 1h bei 4°C inkubieren
- das Eppi für 1 min in den Magnet-Separator stellen und den Überstand vorsichtig und möglichst vollständig mit einer Pipette abziehen.
- 500 µl Waschpuffer zugeben, gründlich vermischen, die Beads erneut durch den Magneten abtrennen und den Überstand verwerfen
- diesen Waschschritt 1 – 2 mal wiederholen
- 100 µl Elutionspuffer zugeben, die Suspension gründlich vermischen und die Beads separieren
- das Eluate vorsichtig mit einer Pipette abziehen und in neues Eppi überführen

17.4 Bestimmung des Proteingehaltes (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad)

Die spektrophotometrische Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays basiert auf der Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Diese Methode macht sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 nach Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste von Polypeptiden mit einer molekularen Masse von mehr als ca. 3 kDa zunutze.

- 200 µl Bio-Rad Reagenz, 700 µl H₂O bidest und 100 µl Proteinlösung (Rohextrakt ca. 1:200 verdünnt) in einem Eppi mischen
- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- die Lösung in eine Küvette überführen und die OD₅₉₅ gegen einen Leerwert (100 µl des jeweiligen Puffers statt der Proteinlösung) messen

18 Trennung und Visualisierung von Proteingemischen

Die Trennung von Proteingemischen erfolgt durch den Einsatz von Polyacrylamidgelen. Dabei können Proteine aufgrund charakteristischer Eigenschaften, z. B. ihres Molekulargewichtes oder ihres isoelektrischen Punktes, getrennt werden. Die Visualisierung der Proteine kann durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue erfolgen, die es erlaubt, die Proteine anschließend in weiteren Analysen, z. B. der Massenspektrometrie, zu verwenden.

18.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt werden. Die größenabhängige Wanderung der Proteine im elektrischen Feld wird durch in den Puffern sowie in der Gelmatrix enthaltenes SDS ermöglicht. SDS bindet in einem konstanten Verhältnis an die aufzutrennenden Proteine (ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein), wodurch diese in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse eine gleichmäßige negative Ladung erhalten. Die Eigenladung der Proteine wird durch die Anlagerung großer Mengen SDS vernachlässigbar. Zusätzlich führt SDS als anionische Detergenz zur Auflösung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Zusätzlich im Probenpuffer verwendetes Dithiothreitol (DTT) reduziert intra- und intermolekulare Disulfidbrücken. Die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe wandern im Polyacrylamidgel zur Anode. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgt umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Diskontinuierliche Gelsysteme nach Laemmli (Laemmli *et al.* 1970) bewirken durch Verwendung unterschiedlicher Acrylamid- und Ionenkonzentrationen eine Konzentrierung der Proteinproben am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel, wodurch eine höhere Trennschärfe erreicht sowie eine Aggregation und Präzipitation der Proben während des Eintritts in die Gelmatrix verhindert wird. Die Konzentration des eingesetzten Acrylamids und die durch N-N'-Methylenbisacrylamid erreichte Quervernetzung bestimmt die Porengröße des Trenngels. Um Proteine mit geringem Molekulargewicht auftrennen zu können, werden Gele mit hoher Acrylamid-Konzentration verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes unbekannter Proteine werden zusätzliche Referenz-Proteine mit bekannter Molekülmasse aufgetragen.

Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen:

- die benötigten Lösungen können bei 4°C gelagert werden, Ammoniumpersulfatlösung (APS) muß frisch angesetzt werden
- die Gelkammer mit Hilfe der entsprechenden Klammern zusammenbauen und senkrecht aufstellen
- die Trenngellösung mit der gewünschten Acrylamidkonzentration frisch ansetzen
- die Gellösung mit einer Spritze bis ca. 1 cm unterhalb des oberen Randes in die Gelkammer einfüllen
- das Gel sofort mit ca. 1,5 ml wassergesättigtem 1-Butanol überschichten und mindestens für 1 h auspolymerisieren lassen, anschließend das Butanol abgießen
- die Sammelgellösung frisch ansetzen, auf das Trenngel füllen
- den Kamm einsetzen und das Gel für mindestens 15 min auspolymerisieren lassen

Tab. III.11: Zusammensetzung von Lösungen unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen für Trenngelle bei der 1D-SDS-PAGE.

Acrylamid-Konzentration	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	17,5 %
H ₂ O bidest	2,1 ml	1,6 ml	1,1 ml	0,6 ml	0,1 ml
Tris-HCl, 1,88 M, pH 8,8	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
SDS 0,5 % (w/v)	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	1,5 ml	2,0 ml	2,5 ml	3,0 ml	3,5 ml
TEMED 10 % (v/v)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
APS 10 % (w/v)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Trenngel (nach Minigel G41 Manual, Biometra)

Tab. III.12: Zusammensetzung des Sammelgels für die 1D-SDS-PAGE.

Acrylamid-Konzentration	5 %
H ₂ O bidest	1,74 ml
Tris-HCl, 1,88 M, pH 6,8	0,8 ml
SDS 0,5 % (w/v)	0,8 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0,66 ml
TEMED 10 % (v/v)	4 µl
APS 10 % (w/v)	20 µl

Sammelgel (nach Minigel G41 Manual, Biometra):

Probenvorbereitung und Gellauf:

- die Proben dem Proteingehalt entsprechend verdünnen und in einem Verhältnis von 5:1 mit 5-fach Probenpuffer mischen
- das Gel mit entsprechenden Klammern in die Laufkammer einbauen
- Laufpuffer in den oberen und unteren Pufferbehälter einfüllen
- den Gelkamm ziehen und die Taschen mit Laufpuffer ausspülen

- die Proteinproben mit dem Probenpuffer direkt vor dem Auftragen 2 min aufkochen und anschließend auf Eis abkühlen, kurz abzentrifugieren
- die Proben mit einer 10 µl Pipette in die Geltaschen einfüllen (ca. 10 µl)
- die Elektrophorese erfolgt bei 15 bis 40 mA und ca. 180 V, bis das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hat
- nach dem Lauf das Gel aus den Glasplatten entnehmen und für die Coomassie-Färbung in eine Färbeschale überführen

18.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

(Klose, 1975; O'Farrell, 1975; *2D-Electrophoresis Manual*, Amersham Pharmacia Biotech)

Die Trennung komplexer Proteingemische kann auch durch zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) erfolgen. Dabei werden die Proteine zunächst in der ersten Dimension nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) und in der zweiten Dimension nach anhand ihrer Molekülmasse (MW) aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine erfolgt in einem Polyacrylamidgel mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG-Strip) unter Verwendung hoher Harnstoff-Konzentrationen, des nicht-ionischen Detergenz CHAPS sowie des Reduktionsmittels DTT unter denaturierenden Bedingungen. Die Mobilität der Proteine im pH-Gradienten ist dabei von ihrer Nettoladung abhängig. Vor der isoelektrischen Fokussierung wird der Protein-Rohextrakt mit Aceton gefällt, um restliche Salze zu entfernen und die Probe im entsprechenden IEF-Puffer aufzunehmen.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wird das IPG-Gel mit den darin enthaltenen Proteinen equilibriert. Durch die Alkylierung von Thiolresten unter Verwendung von Iodoacetamid wird dabei eine Oxidation von Cysteinresten verhindert. Die durch die Equilibrierung erzeugten SDS-Protein-Komplexe ermöglichen eine Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension anhand ihrer Molekülmasse in einer SDS-PAGE mit einem 12-14 % Acrylamid-Gradientengel.

Acetonfällung:

- 400 µl Proteinextrakt mit 1,6 ml gekühltem (-20°C) Aceton in einem 2 ml Eppi vermischen
- die Proteine mindestens 4 h oder ü/N bei -20°C fällen
- 30 min Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4°C, den Überstand anschließend verwerfen
- das Pellet mit 1 ml gekühltem (-20°C) Aceton waschen, 5 min Zentrifugation bei 15.000 rpm
- den Überstand vollständig abziehen und das Proteinpellet an der Luft trocknen
- das Proteinpellet für 1 h bei Raumtemperatur in 400 µl Rehydrations Buffer (RB) rehydrieren
- anschließend muß der Proteingehalt im Rehydrationsbuffer bestimmt werden

Isoelektrische Fokussierung (IEF):

- die IPG-Strip-Holder mit Detergenz und H₂O bidest. reinigen und anschließend trocknen
- die gewünschte Proteinmenge (300 bis 500 µg Protin pro Gel) aus der Acetonfällung in 500 µl Rehydrations Buffer (RB) resuspendieren
- 450 µl der Proteinlösung mit 2,5 µl IPG-Puffer und 5µl DTT-Lösung versetzen
- die Lösung gleichmäßig in einem IPG-Strip-Holder verteilen
- den Schutzfilm vom IPG-Strip entfernen
- den Strip mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei in korrekter Orientierung auf die Lösung im Strip-Holder legen, das Gel muss vollständig mit der Lösung in Kontakt sein
- den IPG-Strip vollständig mit ca. 1-2 ml IPG Cover Fluid bedecken

- den Strip-Holder verschließen und in korrekter Orientierung auf die IPGphor (Amersham Pharmacia) legen, das IEF-Programm mit maximal 50 μ A pro aufgelegtem IPG-Strip starten:

Rehydration:	2h	0V
	12h	30V
	2h	60V
Fokussierung:	1h	500V
	1h	1.000V
	7-25h	8.000V

Fokussieren bis insgesamt 65.000 Vh erreicht sind.

Equilibrierung:

- die fokussierten IPG-Strips sofort nach Beendigung der IEF mit der Gelseite nach oben in eine Equilibrierkammer legen
- mit 5 bis 10 ml Equilibration Buffer 1 (EB1) überschichten, 15 min auf einem Wipptisch inkubieren
- EB1 durch 5 bis 10 ml Equilibration Buffer 2 (EB2) ersetzen, 15 min auf einem Wipptisch inkubieren
- EB2 abgießen
- die equilibrierten IPG-Strips 10 min hochkant auf ein mit H₂O bidest. getränktes Whatman Papier stellen, um den überschüssigen Puffer komplett zu entfernen

Auftrennung in der zweiten Dimension:

- den IPG-Strip mit der Gelseite nach oben und mit der Kathodenseite nach links auf die überstehende Kante der vorbereiteten Glasplatte legen
- den Strip bis auf ca. 2mm an das Polyacrylamidgel heranschieben
- mit Sealing-Solution den Spalt zwischen Gel und Strip luftblasenfrei ausfüllen
- das fertige Gel in die Ettan-Dalt einsetzen

Startphase: 3 W pro Gel 30 min

Trennphase: 20 W pro Gel ca. 4,5 h

Der Laufpuffer wird auf 25°C temperiert.

- Nach dem Gellauf die Platten aus der Ettan-Dalt entnehmen und reinigen

18.3 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue ist weniger sensitiv als eine Silberfärbung, erlaubt aber eine spätere Identifizierung der Proteine z. B. mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Durch die eingesetzten Farbstoffe Coomassie Brilliant Blue R250 und Coomassie Brilliant Blue G250 wird neben den Proteinen auch die Gelmatrix angefärbt, so dass nachfolgend eine Entfärbung des Gels notwendig ist. Färbung und Entfärbung werden auf einem Wipptisch durchgeführt, um eine gleichmaessige Verteilung der Lösungen über dem Gel zu erreichen.

- das Gel für 45 min in Coomassie-Fixierlösung fixieren
- 2 × 5 min mit H₂O bidest. waschen
- 60 min oder ü/N in Färbelösung legen; die Färbelösung kann mehrmals verwendet werden
- 2 × 15 min in Schnellentfärber (SE) entfärben
- das Gel ü/N in Langsam-Entfärber (LE) inkubieren, bis der Hintergrund farblos ist

18.4 Colloidale Proteinfärbung mit Coomassie G-250 (für 2D-Gele)

- das 2D-Gel nach dem Lauf aus der Gelkassette entnehmen, in eine Färbewanne legen und 2 × 15 min in Schnellentfärber (SE) entfärben
- das Gel mit ca. 300ml der Colloidal-Färbelösung überschichten und mindestens über Nacht, besser für 48h auf dem Schüttler inkubieren
- das Gel mit H₂O (muß mehrfach gewechselt werden) entfärben, bis kein Hintergrund mehr erkennbar ist und ggf. einscannen

19 Nachweis von Proteinen: Immunoblotting (Western-Blot)

(Khyse-Anderson, 1984)

Durch Immunoblotting (Western-Blot) können bestimmte Proteine aus größeren bis komplexen Proteingemischen äußerst effizient nachgewiesen werden. Dazu werden die Proteingemische zunächst durch analytische SDS-PAGE oder 2D-PAGE aufgetrennt und dann in einem nachfolgenden Arbeitsschritt mit einer Semi-Dry-Blotting-Methode auf eine Membran transferiert. Die immobilisierten Proteine sind anschließend einer Antigen-Antikörper-Reaktion zugänglich und können so spezifisch nachgewiesen werden. Zum Nachweis des Rpf2-Proteins aus *C. glutamicum* wurde von der Fa. Eurogentec ein für die Aminosäuren 224 – 237 des Rpf2-Proteins spezifischer peptidischer Antikörper bezogen.

19.1 Semi-Dry-Proteinblot

Beim Semi-Dry-Elektroblot wird das SDS-Gel und die PVDF- oder Nitrocellulose-Membran zwischen Transferpuffer getränkte Filterbögen gelegt. Dieses „Blotsandwich“ wird zwischen die horizontal angeordneten Graphitplatten einer Blotapparatur gelegt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (konstanter Stromfluß von 0,8 – 2 mA/cm²) werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

- Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE bzw. 2D-PAGE
- das Gel nicht färben oder fixieren
- das Sammelgel abtrennen und die Orientierung/Laufrichtung des Trenngels markieren
- das Gel 15 min in Towbin-Transferpuffer waschen
- 6 Blatt Whatman-Papier und die PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran (8 x 8 cm für eine Proteinminigel) in Towbin-Transferpuffer tränken
- auf der unteren Graphitplatte (Anode) der Blottingapparatur folgendes „Sandwich“ aufbauen:
 - 3 Blatt Whatman-Papier (getränkt)
 - PVDF- bzw. Nitrocellulose-Membran

- Proteingel
- 3 Blatt Whatman-Papier (getränkt)
- evt. Luftblasen sorgfältig aus dem „Sandwich“ entfernen (mit Greiner-Röhrchen „herausrollern“)
- die obere Graphitplatte (Kathode) auflegen und den Deckel schließen
- die Proteine 1h bei 15V transferieren (ca. 0,8 mA / cm²)
- der Transfer kann mittels Ponceau-Färbung kontrolliert werden

19.2 Ponceau-Färbung

- 30 ml PBS (1-fach) in eine Schale gießen
- 2 ml Ponceau S zugeben
- die Membran in der Lösung färben bis Banden erkennbar sind und ggf. einscannen
- die Membran durch Waschen mit PBS wieder entfärben

19.3 Immunologische Detektion geblotteter Proteine

Spezifische Proteine können nach Transfer auf eine Membran durch ein indirektes immunologisches Verfahren nachgewiesen werden. Zunächst bindet dazu ein unmarkierter Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird in einer zweiten Reaktion durch einen Sekundärantikörper detektiert, der den Primärantikörper der verwendeten Spezies erkennt (z. B. Kaninchen IgG). Der Sekundärantikörper ist mit einem Meerrettich-Peroxidase-Komplex gekoppelt, welcher Diaminobenzidin umsetzt und so in einer Farbreaktion das gesuchte Protein visualisiert.

- die proteintragende Membran für 1h in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS inkubieren (zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran)
- die Membran mit PBS waschen und 2 h mit dem Primärantikörper (in geeigneter Verdünnung in PBS mit 0,25 % (w/v) Magermilchpulver) bei RT inkubieren
- die Membran für 2 x 15 min mit PBS waschen und anschließend 2 h mit dem Sekundärantikörper (1:1000 in TBS) bei RT inkubieren
- 3 x 15 min mit TBS waschen
- die Membran in eine geeignete Menge der Färbelösung (bei Minigel 20 ml) legen, bis Banden der vom Antikörper erkannten Proteine deutlich erkennbar sind
- die Reaktion durch Überführen der Membran in die Stopplösung beenden
- die Membran zwischen Filterpapier trocknen und ggf. einscannen

20 Lokalisierung von Proteinen durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Um ein bestimmtes Protein z. B. auf der Oberfläche von Bakterienzellen zu lokalisieren, kann ebenfalls ein für das zu untersuchende Protein spezifischer, unmarkierter Primärantikörper verwendet werden. Dieser wird mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert und bindet auf diese Weise an das Zielprotein. In einer zweiten Reaktion wird dieser Antigen-Antikörper-Komplex durch einen Sekundärantikörper detektiert, der den Primärantikörper der verwendeten Spezies erkennt und an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (z. B. Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes).

Nach Entfernung überschüssiger Antikörpermoleküle kann der Antikörper-Protein-Komplex schließlich lichtmikroskopisch durch Anregung mit einer für den Fluoreszenzfarbstoff geeigneten Wellenlänge sichtbar gemacht werden.

- *C. glutamicum* Zellen in MM1 bis zu einer OD₅₉₅ von ca. 1.5 anziehen
- die Zellen durch Zentrifugation pelletieren und 3 × mit TBS waschen
- die Zellen 2,5 h bei 25°C mit dem Primärantikörper (in geeigneter Verdünnung in TBS mit 0,2% BSA) inkubieren
- überschüssige Primärantikörpermoleküle durch 3-maliges Waschen mit TBS entfernen
- Inkubation für 2 h bei 25°C mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper
- die Zellen erneut mit TBS waschen und bei Anregung mit einer geeigneten Wellenlänge mikroskopisch untersuchen

21 Proteinidentifizierung durch *peptide mass fingerprints*

Die Identifizierung von Proteinen wird durch die Kenntnis der *C. glutamicum* Gesamtgenomsequenz ermöglicht. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine können diese mit einer Endopeptidase, z. B. Trypsin, verdaut werden. Für jedes Protein wird dadurch ein spezifisches Peptidmuster erzeugt. Die Massen der so erhaltenen Peptide werden hochauflösend durch massenspektrometrische Analysen (MALDI-TOF) ermittelt (*peptide mass fingerprint*). Anhand der Peptidmassen kann durch Vergleich mit Datenbankeinträgen dasjenige Gen identifiziert werden, welches für das entsprechende Protein kodiert (Henzel *et al.*, 1993).

21.1 Tryptischer Verdau

Nach Auftrennung des Proteingemisches durch ein- bzw. zweidimensionale Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung können einzelne Proteinbanden bzw. -spots aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten werden. Nach mehreren Waschschritten erfolgt durch die Zugabe von Trypsin der proteolytische Verdau des Proteins im Gel. Trypsin spaltet Polypeptidketten spezifisch nur hinter Lysin- und Argininresten, wodurch für das jeweilige Protein charakteristische Peptide unterschiedlicher Masse entstehen. Das eingesetzte Trypsin ist modifiziert, um einen Selbstverdau des Enzyms weitestgehend zu unterbinden.

- Eppis mit 500 µl TDL1 waschen, die Lösung vollständig entfernen
- eine Coomassie-gefärbte Proteinbande aus einem Gel ausschneiden, in ein gewaschenes Eppi überführen und das Gelstück evtl. in kleinere Fragmente zerteilen
- Zugabe von 250 µl TDL2
- 5 min bei Raumtemperatur im Eppi-Schüttler waschen
- TDL2 entfernen, durch 250 µl TDL3 ersetzen
- 30 min bei Raumtemperatur im Eppi-Schüttler waschen
- TDL3 entfernen, durch 250 µl TDL4 ersetzen
- 30 min bei Raumtemperatur im Eppi-Schüttler waschen
- TDL4 komplett entfernen
- die Gelstückchen bei Raumtemperatur in einer *Speedvac* vollständig trocknen

- Zugabe von 15 µl Trypsinlösung, 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Zugabe von 20 µl TDL5
- 24 h Inkubation bei 37°C
- 15 min Ultraschallbad, um die Peptide aus der Gelmatrix herauszulösen
- den tryptischen Verdau sofort für MALDI-TOF-Analysen einsetzen oder bei 4°C lagern

21.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Massen der Peptidfragmente des tryptischen Proteinverdau werden mit Hilfe der *matrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) mit einem BiflexIII Massenspektrometer (Bruker Daltonics) analysiert. Für die Identifizierung werden die Analytmoleküle (Peptide bzw. Proteine) dabei zunächst in eine Matrix aus kleinen organischen Molekülen eingebettet (Karas und Hillenkamp, 1988), die in 10^3 - bis 10^5 -fachem molaren Überschuss vorliegen sollte. Im Hochvakuum werden mit einem gepulsten N_2 -Laser bei 337 nm die Peptide aus dem Matrixmaterial gelöst (*desorption*) und dadurch ionisiert. Die ionisierten Analytmoleküle werden in Abhängigkeit ihrer Masse m und ihrer Ladung z in einem elektrischen Feld mit hoher Spannung (mehrere kV) beschleunigt. Nach Durchquerung des feldfreien Flugrohres gelangen die Analytionen auf den Detektor, die Flugzeit dient zur Bestimmung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z). Eine Kalibrierung der Massenskala erfolgt durch die Messung von Peptiden mit bekannter Masse. Die Gesamtheit der analysierten Massen der tryptischen Fragmente eines Proteins ergeben den *peptide mass fingerprint*, mit dem das Protein in geeigneten Datenbanken identifiziert werden kann.

Probenvorbereitung:

- die Matrixlösung (gesättigte α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure-Lösung in 60 % CH_3CN / 0,1 % TFA, in H_2O) frisch ansetzen
- in einer Mikrotiterplatte 3 µl Matrixlösung mit 3 µl Analytlösung aus dem tryptischen Verdau mischen
- 1 µl des Gemisches auf eine freie Position des Probentellers auftragen, sofort mit Fön trocknen
- nochmals 1- bis 2-mal je 1 µl auf die gleiche Position auftragen, trocknen

Erstellung des Peptidmassenspektrums:

- den Probenteller in Vakuum-Ionisationskammer des Gerätes einbringen
- Einstellung der MALDI-TOF Parameter mittels des Analyseprogramm XACQ:

Tab. III.13: Im XACQ-Programm eingestellte Parameter für MALDI-TOF-Analysen von Peptiden mit einem BiflexIII-Spektrometer (Bruker Daltonics).

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
POLARI	POS	REPHZ	3,00 [Hz]
AQOP m	Reflector	ATTEN	ca. 35 – 60
TD	60.000	ML1	726803,238
No Shots	ca. 100 (5 × 20)	ML2	357,804
SMONUM	0	ML3	0
SMOPTS1	0	HITURBO	no
SMOPTS2	0	GDEON	yes
SMOPTS3	0	GDEDLY	medium
DW	1,00 [ns]	DEFLON	yes
Delay	20.000 [ns]	RLNSBND	no
Uis1	19,00 [kV]	LLNSBND	no
Uis2	14,40 [kV]	UIS2BND	no
Urefl	20,00 [kV]	DPCAL1	342,75
Ulens	7,00 [kV]	DPMASS	50,00 [Da]
Uhimass	10,00 [kV]	RBNDVAL	0,33
RefFull	20,00 [kV]	LBNDVAL	0,28
UdetL	1,45 [kV]	IS2BNDV	0,91
UdetR	1,70 [kV]	CMT1	
Udefl	2,00 [kV]	CMT2	

- Kalibrierung der Massenskala, nach ca. 10 Messungen wiederholen
- Beginn der Probenmessung mit Laser-Blendeneinstellung (ATTEN) von ca. 60 (niedrige Laserenergie)
- Reduktion der Blendeneinstellung (höhere Laserenergie), falls dies zur Ermittlung verwendbarer Spektren notwendig ist
- Summierung der Spektren von ca. 100 einzelnen Laser-Pulsen
- Analyse der aufsummierten Spektren und Erstellung der für MASCOT notwendigen *peak*-Liste mittels XMASS

21.3 Auswertung von *peptide mass fingerprints* mittels MASCOT

Die Auswertung der durch MALDI-TOF erhaltenen Massenspektren erfolgt computergestützt mit dem Programm MASCOT (Perkins *et al.*, 1999). Die in den *peak*-Listen aus XMASS enthaltenen Massen der tryptischen Peptidfragmente werden mit den *in silico* errechneten *peptide mass fingerprints* von Proteinen aus verschiedenen Datenbanken verglichen. Aus dem Grad der Übereinstimmung zwischen den theoretischen und den tatsächlich gemessenen Fragmentmassen wird die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der das Analytprotein mit einem Proteinen aus den Datenbanken identisch ist. Abhängig von der Anzahl der tatsächlich übereinstimmenden Peptidmassen, der nicht identischen Massen, der gewählten Datenbank sowie den gewählten MASCOT-Parametern (Massentoleranz, Anzahl an

missed cleavages, evtl. Modifizierungen etc.) liegt bei einem erhaltenen *score* zwischen 48 und 51 eine Wahrscheinlichkeit p von kleiner als 0,05 für eine zufällige Übereinstimmung der gemessenen Werte zu einem Datenbankeintrag vor. Je höher der ermittelte *score* ausfällt, um so eindeutiger ist die Proteinidentifizierung. Auf der Basis des *C. glutamicum*-Genomprojektes wurde am Lehrstuhl eine Proteindatenbank implementiert, die für die Proteinidentifizierung mittels MASCOT genutzt werden kann.

gewählte Standardparameter für MASCOT-Analysen:

- type of digest: Trypsin
- missed cleavages: 0
- variable modifications: Oxidation (M)
- peptide tolerance: 0,04 %
(entspricht max. 1 Da Abweichung bei einem 2,5 kDa-Peptid)

22 Detektion von Glykoproteinen (nach Dig Glycan Detection Kit Manual, Roche)

Die Detektion von Glykoproteinen mit dem Dig Glycan Detection Kit beruht auf der Oxidation benachbarter Hydroxylgruppen von Zuckern in Glykokonjugaten zu Aldehyden durch milde Behandlung mit Periodat. An die auf diese Weise entstehenden Aldehydgruppen wird anschließend das Steroidhaptan Digoxigenin (DIG) kovalent über eine Hydrazidgruppe gebunden. Die Digoxigenin markierten Glykoproteine können dann in einem Enzym-Immunoassay durch einen mit alkalischer Phosphatase konjugierten digoxigenin-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Methode eignet sich somit für den Nachweis einzelner Glykoproteine in einem komplexen Proteingemisch, das in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert wurde.

- das Proteingemisch durch SDS-PAGE auftrennen und mittels Semi-Dry-Blot auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisieren
- die Membran in 20 ml PBS (1-fach) waschen; kein TBS verwenden, da Tris mit der DIG-Markierung interagiert
- Oxidation der Glykoproteine mit 10 mM Natriummetaperiodat in Natriumacetat-Puffer, die Membran für 20 min bei RT in 10 ml dieser Lösung inkubieren
- 3x für 10 min in PBS waschen
- die Membran für 1 h bei 15–25°C in 1 µl DIG-Reagenz gelöst in 5 ml Natriumacetat-Puffer inkubieren
- 3x für 10 min in PBS waschen
- Inkubation der Membran in der Blocking-Lösung für mindestens 30 min
- 3x mit PBS waschen
- 10 µl anti-DIG-Konjugat in 10 ml PBS lösen und die Membran darin für 1 h bei RT inkubieren
- 3x mit PBS waschen
- Färbelösung frisch ansetzen: 10 ml Phosphat-Puffer mit 200 µl NBT/X-Phosphat Lösung versetzen
- die Membran in der Färbelösung inkubieren bis Banden erkennbar sind
- die Membran mehrere Male mit H₂O bidest. spülen und ggf. scannen bzw. fotografieren.

23 Bestimmung der Kohlenhydratzusammensetzung von Glykoproteinen durch GC/MS

Die mit Massenspektrometrie gekoppelte Gaschromatography (GC/MS) ist eine leistungsfähige und schnelle Methode um den Kohlenhydratanteil in kleinen Mengen eines Glykoproteins zu analysieren. Nach Aufreinigung und Trocknung wird das Glykoprotein zunächst mittels methanolischer Hydrolyse in seinen Kohlenhydrat- und Proteinanteil gespalten. Dabei werden sämtliche Zucker des Kohlenhydratanteils einzeln freigesetzt, während das Protein vollständig erhalten bleibt. Um die Zucker im folgenden einer gaschromatographischen Trennung zugänglich zu machen, werden sie in Trimethylsilylmethylglykosid-Derivate überführt. Anhand unterschiedlicher Retentionszeiten während der Gaschromatographie und für jede eluierte Substanz aufgenommene Massenspektren können die Zucker dann durch Vergleich mit analysierten Referenzsubstanzen identifiziert werden.

Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden auf einem TraceGC/PolarisQ GC/MS- System der Firma Thermo Finnigan durchgeführt, das mit einem AS 2000 Autosampler zur Injektion der Proben ausgestattet war. Vor jeder Untersuchung wurde das System wie vom Hersteller empfohlen automatisch kalibriert (*autotune*). Alle Messungen wurden dann unter den *standard-autotun*-Bedingungen durchgeführt.

23.1 Hydrolyse und Derivatisierung von Glykoproteinen

Um den Kohlenhydrat- vom Proteinanteil eines Glykoproteins zu trennen, wird das Glykoprotein mit methanolischer Salzsäure hydrolysiert. Anschließend können die freigesetzten Zucker durch Zugabe von N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)trifluoro-acetamid (MSTFA) zu Trimethylsilyl-Methylglykosid-Derivaten umgesetzt werden.

- 10 µg des aufgereinigten und vollständig gereinigten Glykoproteins werden in einem verschraubbaren 1 ml Reacti-Vial mit 500 µl 2M wasserfreier methanolischer HCl versetzt
- das Reaktionsgefäß sofort fest verschließen und 6h bei 80°C in einem Reacti-Therm Heating/Stirring Module unter Rühren inkubieren
- Die Probe unter einem Stickstoff-Strom vollständig trocknen
- Zugabe von 50 µl MSTFA und 50µl Pyridin
- Inkubation unter Rühren für 30 min bei 37°C
- Durch Zentrifugation nicht vollständig gelöste Probenanteile abtrennen, den Überstand in ein neues Gefäß überführen.

Folgenden Karbohydrate wurden als Referenzen verwendet:

- | | |
|----------------------|-------------------------|
| – Fucose | – Galaktose |
| – Galaktosamin | – Glukose |
| – Glukose-6-Phosphat | – Mannose |
| – N-Acetylglukosamin | – N-Acetylneuraminsäure |
| – Polygalaktonsäure | – Rhamnose |
| – Ribose | – Xylose |

Jeweils 100 mM der reinen Referenzen wurden in exakt gleicher Weise wie die zu analysierenden Glykoproteinproben behandelt. Die für sie aufgenommen Retentionsprofile und Massenspektren dienten anschließend zur Identifizierung von Zuckerkomponenten in Glykoproteinen.

23.2 Gaschromatographie

Bei allen Chromatographieläufen wurde 1 µl Probe 1:10 gesplittet in den 200°C heißen Liner injiziert. Der Heliumgasfluss wurde konstant bei 1 ml/min gehalten und die Transferlinetemperatur auf 250°C eingestellt. Nach und vor jeder Injektion wurde die Autosamplerspritze fünfmal mit Chloroform gereinigt. Die verwendete 30m lange Equity5 Kapillare weist eine Filmdicke von 0,5 µm auf.

Temperaturprogramm des GC-Ofens

- 3 min isothermal bei 80°C
- mit 3°C/min auf 300°C heizen
- mit 50°C/min auf 80°C abkühlen
- 5 min bei 80°C heizen

23.3 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Detektion wurde 5 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Die Spektren wurden in einem Scanbereich von 50–650 m/z und mit einer maximalen Scanzeit von 25 ms aufgenommen.

23.4 Auswertung der Chromatogramme

Eine qualitative Auswertung der Chromatogramme wurde mit dem Qualbrowser der Xcalibur-Software sowie dem Programm Massfrontier vorgenommen. Diese ermöglichen neben dem Vergleich von Retentionsprofilen auch die Analyse der Massenspektren eines Substanzpeaks. Sie können sowohl mit in der NIST `98 Datenbank (Ausloos *et al.* 1999) abgelegten Spektren als auch mit Massenspektren anderer Proben (z. B. Referenzsubstanzen) verglichen werden.

IV Ergebnisse

1 Das Genom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 enthält zwei Gene, *rpf1* und *rpf2*, die für Proteine mit *Resuscitation-promoting factor*-Motiven kodieren

Durch bioinformatische Untersuchung der vollständigen Genomsequenz von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden zwei offene Leseraster identifiziert, deren abgeleitete Produkte schwache globale Homologien (37,2 % bzw. 17,2 % identische Aminosäuren) zum *resuscitation-promoting factor* (Rpf) aus *Micrococcus luteus* aufweisen. Dementsprechend wurden die beiden Gene als *rpf1* und *rpf2* bezeichnet.

Die *rpf*-Gene liegen an zwei unterschiedlichen Orten im *C. glutamicum*-Genom, getrennt durch fast 96 kb. Das *rpf1*-Gen von *C. glutamicum* (*cg0936*; Abb.IV.01) besteht aus 582 bp und kodiert für ein 20,4 kDa großes Protein, das eine putative Leadersequenz von 35 Aminosäuren trägt. Das Vorhandensein einer typischen Leadersequenz deutet auf einen durch den allgemeinen Sekretionsapparat (Sec-System) vermittelten Export des Rpf1-Proteins über die Cytoplasmamembran hin.

```

1  MGRHSTKTSSAFTKLAASTIAFGAAATIMAPSASAAPDSDWDRLAQCESGGNWAINTGNG
61  YHGGLQFSASTWAAYGGQEFATYAYQATREQQIAVAERTLAGQGAWPACSASLGLNSA
121 PTQRDLSATSTSTPEPAAAAPAVAEYNAPAANIAVGSTDLNTIKSTYGAVTGTLAQYGITV
181 PAEVESYNAFVG

```

Abb.IV.01: Abgeleitete Aminosäuresequenz des *rpf1*-Gens aus *C. glutamicum*. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Rpf1-Proteins im Ein-Buchstaben-Code. Das durch Computeranalysen (SignalP) identifizierte putative Leaderpeptid ist doppelt unterstrichen, das konservierte Rpf-Motiv ist in rot dargestellt.

Das *rpf2*-Gen (*cg1037*; Abb.IV.02) umfasst 1125 bp und ist damit fast doppelt so lang wie das zu ihm homologe *rpf1*-Gen. Auch das abgeleitete 39,0 kDa große Rpf2-Protein besitzt eine putative Leadersequenz (39 Aminosäuren), die ebenfalls eine Sekretion des Proteins aus der Zelle nahelegt.

BLAST-Abfragen mit den Aminosäuresequenzen beider Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* gegen öffentliche Proteindatenbanken führten zu mehr als 30 signifikanten Ergebnissen (s. Anhang VII.2.2). Die überwiegende Zahl von Bakterien, die *rpf*-ähnliche Gene besitzen, weist mehrere Kopien auf. Die Genome von *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* und *Streptomyces coelicolor* beinhalten z. B. jeweils fünf zu *rpf* homologe Gene. Die Genome von *M. leprae* und *Corynebacterium diphtheriae* besitzen drei und das Genom von *C. efficiens* enthält, genauso wie dasjenige von *C. glutamicum*, nur zwei derartige

Kodierbereiche (vgl. Anhang VII.6.3). Eine Ausnahme stellt in diesem Kontext das Genom von *M. luteus* dar, welches nur ein singuläres *rpf*-Gen enthält (Mukamolova *et al.*, 2002a).

```

1  MAPHOKSRINRINSTRSVPLRLATGGVLATLLIGGVTAAATKKDIIVDVNGEQMSLVTMS
61  GTVEGVLAQAGVELGDQDIVSPSLDSSISDEDTVTVRTAKQVALVVEGQIQNVTTTAVSV
121  EDLLQEVGGITGADAVDADLSETIPESGLKVSVTKPKIISINDGGKVTVVSLAAQNVQEA
181  LELRDIELGAQDRINVPLDQQLKNNAAIQIDRVDNTEITETVTSFDAEPTYVDDPEAPAGD
241  ETVVEEGAPGTKEVTRTVTTVNGQEESSTVINEVEITA AKPATISRGTKTVAANSVWDQL
301  AQCESGGNWAINTGNGFSGGLQFHPQTWLAYGGGAFSGDASGASREQQISIAEKVQAAQG
361  WGAWPACTASLGIR

```

Abb.IV.02: Abgeleitete Aminosäuresequenz des *rpf2*-Gens aus *C. glutamicum*. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Rpf2-Proteins im Ein-Buchstaben-Code. Das durch Computeranalysen identifizierte putative Leaderpeptid ist doppelt unterstrichen, das konservierte Rpf-Motiv ist in rot dargestellt.

Multiple Alignments der Aminosäuresequenzen von Rpf1, Rpf2, dem Rpf-Protein aus *M. luteus* und von zu ihm ähnlichen Proteinen anderer *Actinomycetales* zeigen, dass alle Proteine über einen hochkonservierten Bereich von ungefähr 80 Aminosäuren Länge verfügen (Abb.IV.03). Dieser als *resuscitation-promoting factor*-Motiv (Kell und Young, 2000) bezeichnete Bereich ist im N-terminalen Teil des prozessierten Rpf1-Proteins (Abb. IV.01) und im C-terminalen Bereich von Rpf2 (Abb.IV.02) lokalisiert.

Ein multiples Alignment der vollständigen Aminosäuresequenzen der Rpf-Proteine zeigt, dass die Proteine abgesehen vom hochkonservierten Rpf-Motiv in Länge und Aminosäuresequenz z.T. sehr stark variieren (vgl. Anhang VII.6.4). Ein phylogenetischer Baum, der auf einem derartigen Alignment basiert, gibt dementsprechend im wesentlichen die taxonische Nähe zwischen den verschiedenen Coryne- und Mycobakterien wieder (s. Anhang VII.6.5).

Wird hingegen ein multiples Alignment anhand der Rpf-Aminosäuresequenzen ohne Berücksichtigung des Rpf-Motivs erstellt und auf dieser Basis ein phylogenetischer Baum berechnet, so zeigt sich, dass die Rpf-Proteine größerer Länge, darunter Rpf2 aus *C. glutamicum* und RpfB aus *M. tuberculosis*, eng miteinander verwandt sind (Abb.IV.04, rosa unterlegt). Das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* weist über seine gesamte Länge deutliche Ähnlichkeiten zu jeweils einem Protein aus *C. diphtheriae* (48% identische Aminosäuren; NP_939238), *C. efficiens* (65%; NP_737581), *M. leprae* (32%; NP_301299), *M. tuberculosis* (33%; RpfB, NP_215525), und *S. coelicolor* (26%; NP_733594) auf (vgl. Anhang VII.6.6).

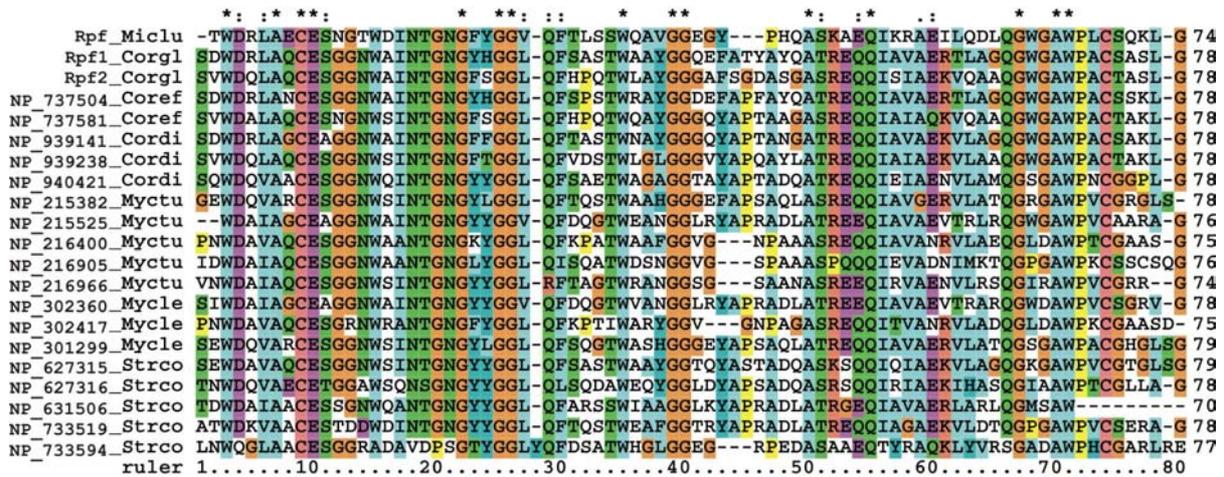


Abb.IV.03: Konservierte Aminosäuresequenz des *resuscitation-promoting factor* (Rpf)-Motivs. Hochkonservierte Bereiche innerhalb des Rpf Proteins aus *M. luteus* (Rpf_Miclu), des Rpf1- (Rpf1_Corgl) und des Rpf2- (Rpf2_Corgl) Proteins aus *C. glutamicum* sowie der Rpf-ähnlichen Proteine aus *C. efficiens* (_Coref), *C. diphtheriae* (_Cordi), *M. tuberculosis* (_Myctu), *M. leprae* (_Mytle) und *S. coelicolor* (_Strco) sind als multiples Alignment, das mit dem DiAlign-Programm (Morgenstern et al., 1999) berechnet und dem CLUSTALX-Programm (Thompson et al., 1997) visualisiert wurde, gezeigt. Identische (★) und konserviert ausgetauschte (:) Aminosäuren sind markiert. Die Anzahl der innerhalb des konservierten Rpf-Motivs vorkommenden Aminosäuren sind jeweils am Ende der Zeilen angegeben.

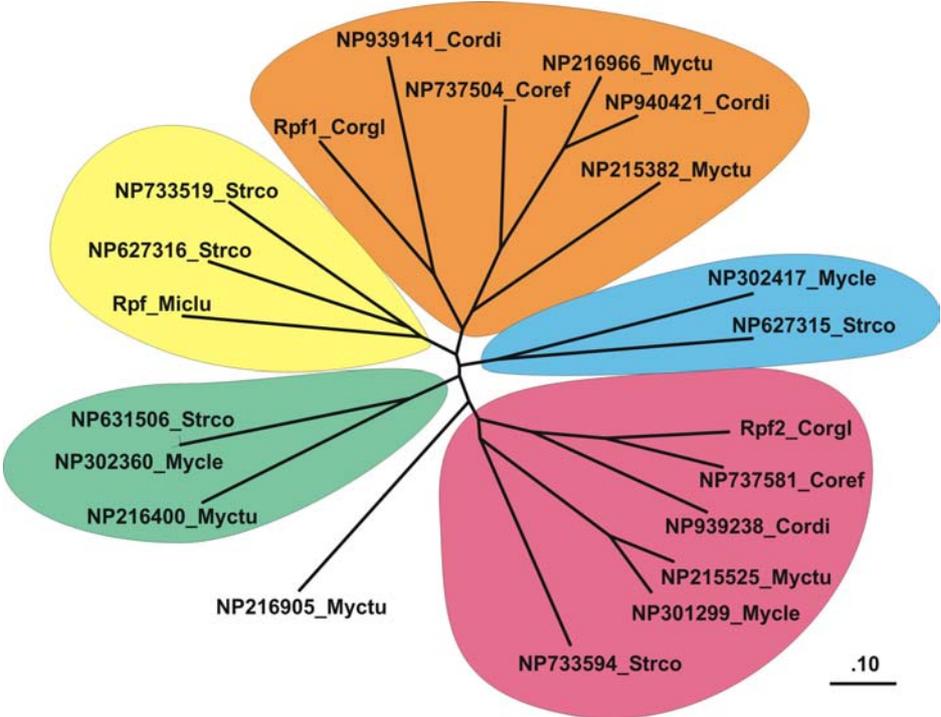


Abb.IV.04: Phylogenetische Einordnung der Rpf-Proteine ohne Berücksichtigung des jeweiligen Rpf-Motivs. Die Einordnung basiert auf einem mit dem Programm DiAlign (Morgenstern et al., 1999) erzeugten multiplen Alignment der Aminosäuresequenzen der aufgeführten Rpf-Proteine aus *M. luteus* (_Miclu), *C. glutamicum* (_Corgl), *C. efficiens* (_Coref), *C. diphtheriae* (_Cordi), *M. tuberculosis* (_Myctu), *M. leprae* (_Mytle) und *S. coelicolor* (_Scoe) ohne Berücksichtigung der jeweiligen Sequenzen des Rpf-Motivs. Ausgehend von diesem Alignment wurde der phylogenetische Baum mit dem im CLUSTALX-Programm (Thompson et al. 1997) implementiertem *neighbour joining*-Algorithmus berechnet und mit dem Programm Treetool visualisiert.

Interessanterweise teilt das *rpf2*-Gen aus *C. glutamicum* auch seine Lage im Genom mit den für diese Proteine kodierenden Genen aus den anderen Organismen (Abb.IV.05). Sämtliche *rpf2*-Homologe liegen stromabwärts eines für eine TatD-verwandte DNase kodierenden Gens (vgl. Abb.IV.05, grün dargestellt) und direkt stromaufwärts des *ksgA*-Gens (vgl. Abb.IV.05, blau), das vermutlich für eine Dimethyladenosin-Transferase kodiert. Gefolgt wird diese Genanordnung von einem Gen für eine putative Isopentenylmonophosphat-Kinase (vgl. Abb.IV.05, orange). In *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens* und *S. coelicolor* liegt in Transkriptionsrichtung dann ein Gen für eine putative ATP-Bindeeinheit eines ABC-Transporters (vgl. Abb.IV.05, grau), während in Mycobakterien ein putatives Acyl-CoA-Synthase-Gen (vgl. Abb.IV.05, gelb) folgt. Darüberhinaus weisen die mykobakteriellen *rpf2*-Homologen *Rv1009* (*M. tuberculosis*) und *MI0240* (*M. leprae*) eine 25 bp große Überlappung mit dem nachfolgenden *ksgA*-Gen auf, die eine bicistronische Transkription der beiden Gene nahelegt.

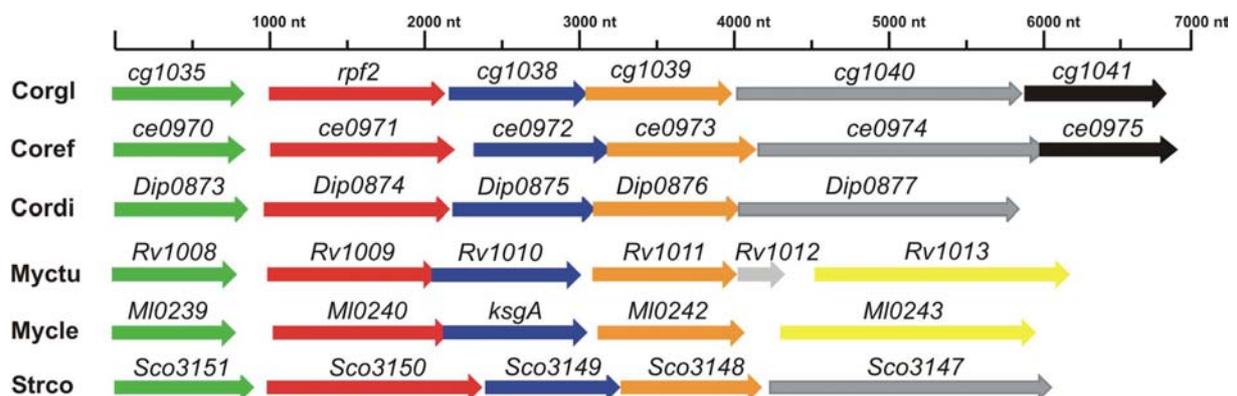


Abb.IV.05: Konservierte Genanordnung innerhalb der *rpf2*-Genregion von *C. glutamicum* (Corgl), *C. efficiens* (Coref), *C. diphtheriae* (Cordi), *S. coelicolor* (Strco), *M. tuberculosis* (Myctu) und *M. leprae* (Mycle). Gene großer Ähnlichkeit sind in gleicher Farbe dargestellt.

Aufgrund von phylogenetischen Untersuchungen und Proteinähnlichkeiten allein lässt sich, im Gegensatz zu der Gruppe der *rpf2*-ähnlichen Gene, nicht eindeutig bestimmen, welches der *rpf*-Gene aus den anderen Organismen dem *rpf1*-Gen aus *C. glutamicum* genau entspricht (vgl. Abb.IV.04). Allerdings ist in *C. efficiens* (*ce0894*) und *C. diphtheriae* (*Dip0775*) sowie in den Mycobakterien *M. tuberculosis* (*rpfA*) und *M. leprae* (*MI2151*) jeweils eine *rpf*-Kopie in einem mit dem *rpf1*-Gen aus *C. glutamicum* vergleichbaren chromosomalen Kontext angeordnet (Abb.IV.06). Mit Ausnahme von *M. leprae*, sind alle *rpf1*-Homologen auf dem Gegenstrang kodiert und liegen zwischen Genen für eine ATP-abhängige DNA-Helikase (vgl. Abb.IV.06, gelb), für ein putatives DNA-Bindeprotein (vgl. Abb.IV.06, grün) sowie für ein hypothetisches Protein ohne Funktionszuweisung (Abb.IV.06, schwarz) auf der einen Seite und dem für das *Cold-Shock* Protein B (CspB) kodierenden Gen auf der anderen Seite (Abb.IV.06, blau). In beiden analysierten Mycobakterien wird diese Anordnung allerdings durch jeweils drei direkt vor und hinter dem *rpf*-Gen inserierte zusätzliche offene Leseraster

unterbrochen (vgl. Abb.IV.06). Den von ihnen abgeleiteten Proteinen werden aufgrund von Sequenzvergleichen mögliche Funktionen in der Molybdän-Cofaktor Synthese bzw. bei der Umsetzung von Molybdopterin zugewiesen. *M. leprae* weist darüberhinaus eine weitere Besonderheit auf, da hier der gesamte Genbereich im Vergleich zu den anderen Spezies in gegenläufiger Ausrichtung im Genom angeordnet ist. Aufgrund z. T. deutlicher Sequenzähnlichkeiten (zwischen 17% und 69% identische Aminosäuren) zwischen dem Rpf1-Protein aus *C. glutamicum* und den genannten Proteinen der anderen *Actinomycetales* sowie der konservierten Lage im Genom, kann somit eine Gruppe *rpf1*-ähnlicher Gene definiert werden.

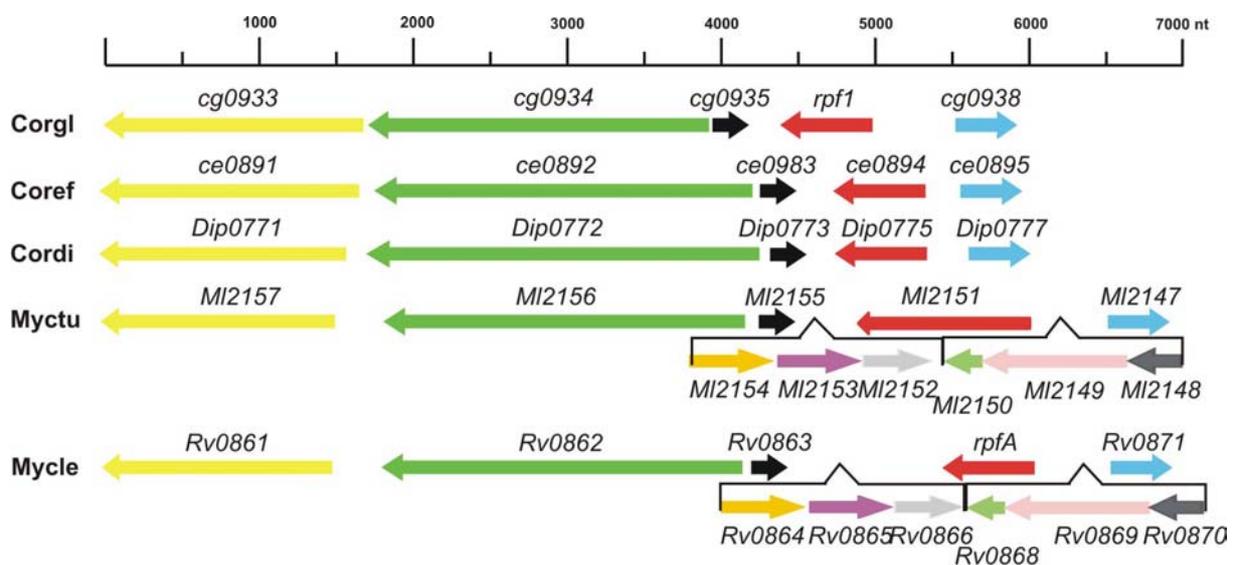


Abb.IV.06: Konservierte Genanordnung innerhalb der *rpf1*-Genregion aus *C. glutamicum* (Corgl) und entsprechender Bereiche aus *C. efficiens* (Coref), *C. diphtheriae* (Cordi), *S. coelicolor* (Strco), *M. tuberculosis* (Myctu) und *M. leprae* (Mycle). Gene großer Ähnlichkeit sind in gleicher Farbe dargestellt. Um eine möglichst große Übereinstimmung zu erreichen, wurde die Genregion aus *M. leprae* invertiert.

Da die *rpf*-Gene im *C. glutamicum*-Genom in völlig unterschiedlichen chromosomalen Kontexten lokalisiert sind (Kalinowski *et al.*, 2003), scheint es keinen gemeinsamen Funktionszusammenhang der *rpf*-Gene und ihrer genomischen Nachbarn zu geben. Ähnliche Ergebnisse sind für *M. tuberculosis* beschrieben worden. Hier sind die fünf *rpf*-ähnlichen Gene über das ganze Genom verteilt und liegen ebenfalls in der Nachbarschaft von Genen unterschiedlichster Funktionen. Deshalb wird auch für diesen Organismus davon ausgegangen, dass keine funktionelle Kopplung der *rpf*-Gene und ihrer benachbarten Kodierregionen existiert (Mukamolova *et al.*, 2002b).

2 *In vivo* Expression des *rpf1*- und des *rpf2*-Gens in *C. glutamicum*

Um die Transkription der *rpf*-Gene in *C. glutamicum* über den gesamten Wachstumsverlauf einer Kultivierung im Schüttelkolben verfolgen zu können, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*-Zellen einer mit einem großen Inokulum (Startzellendichte: $1,5 \times 10^6$ Zellen \times ml⁻¹) angeimpften Minimalmedium-Kultur isoliert (Abb.IV.07). RT-PCR Analysen mit *rpf1*- und *rpf2*-spezifischen Primern sollten anschließend zeigen, ob sich die Transkriptionsstärke der *rpf*-Gene im Verlauf der Kultivierung ändert.

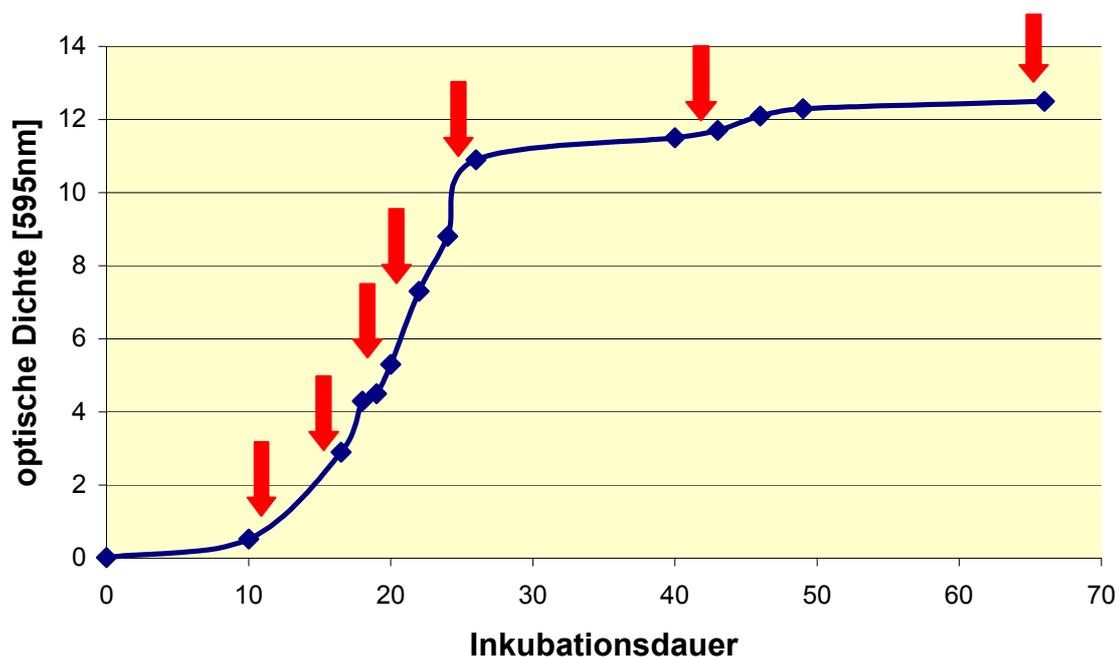


Abb.IV.07: Typischer Wachstumsverlauf einer *C. glutamicum* RES167-Kultur im Schüttelkolben in Minimalmedium MM1 mit 2% Glukose. Zeitpunkte der Probenentnahme zur Gesamt-RNA-Isolierung sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Transkripte beider *rpf*-Gene konnten mit dem LightCycler vom Beginn des logarithmischen Wachstums bis zur Stationärphase nachgewiesen werden. Die Transkription des *rpf1*-Gens war über den gesamten Wachstumsverlauf annähernd konstant, wohingegen das *rpf2*-Gen während des späten logarithmischen Wachstums und beim Übergang in die Stationärphase um den Faktor 3 verstärkt transkribiert wurde. Bei Fortsetzung der Kultivierung nimmt die Transkriptionsstärke beider *rpf*-Gene schließlich deutlich ab (Abb.IV.08).

Eine Expression der *rpf*-Gene aus *C. glutamicum* konnte darüberhinaus auch mittels DNA-Mikroarray-Experimenten nachgewiesen werden (Hüser *et al.*, 2003; A. Hüser, persönliche Mitteilung).

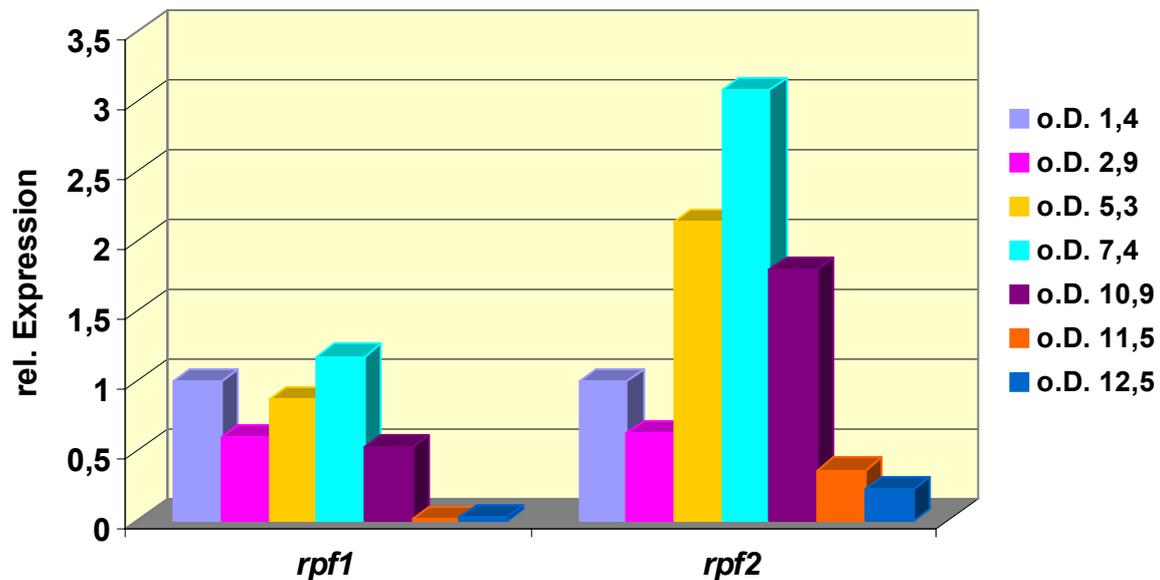


Abb.IV.08. Transkriptionsanalyse der *rpf*-Gene aus *C. glutamicum* über den Wachstumsverlauf einer Minimalmedium-Kultur im Schüttelkolben. Zu verschiedenen Zeitpunkten (vgl. Abb.IV.06) wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und im LightCycler analysiert. Die Transkriptionsstärke bei einer o.D₅₉₅ von 1,4 wurde als 1 gesetzt. Alle anderen Werte wurden auf diese Transkriptionsstärke bezogen.

In weiteren Analysen wurde die Transkription der *rpf2*-Genregion (*cg1035* – *cg1041*) durch RT-PCR-Reaktionen mit verschiedenen in und zwischen den jeweiligen Kodierbereichen bindenden Primern genauer untersucht (Abb.IV.09A). Der Nachweis eines RT-PCR-Produktes für die Primerkombination cl3 zeigt (Abb.IV.09B), dass das *rpf2*-Gen in *C. glutamicum* mindestens mit dem direkt folgenden *ksgA*-Gen eine bicistronische Transkriptionseinheit bildet. Da mit dem Primerpaar cl1 kein RT-PCR generiert werden konnte (Abb.IV.09B), wird *rpf2* definitiv unabhängig von dem vor ihm liegenden *tatD*-ähnlichen Gen transkribiert. In gleicher Weise wie für *rpf2* und *ksgA* konnten gemeinsame Transkripte auch für *ksgA* und das offene Leseraster *cg1039*, für *cg1039* und *cg1040* sowie für *cg1040* und *cg1041* nachgewiesen werden (Abb.IV.09B). Da zudem bei Inspektion der DNA-Sequenz dieses Bereiches keine Indizien für die Ausbildung rho-unabhängiger Terminatoren gefunden werden konnten, ist davon auszugehen, dass in *C. glutamicum* das *rpf2*-Gen zusammen mit den vier in Leserichtung direkt folgenden Genen eine große, polycistronische Transkriptionseinheit bildet.

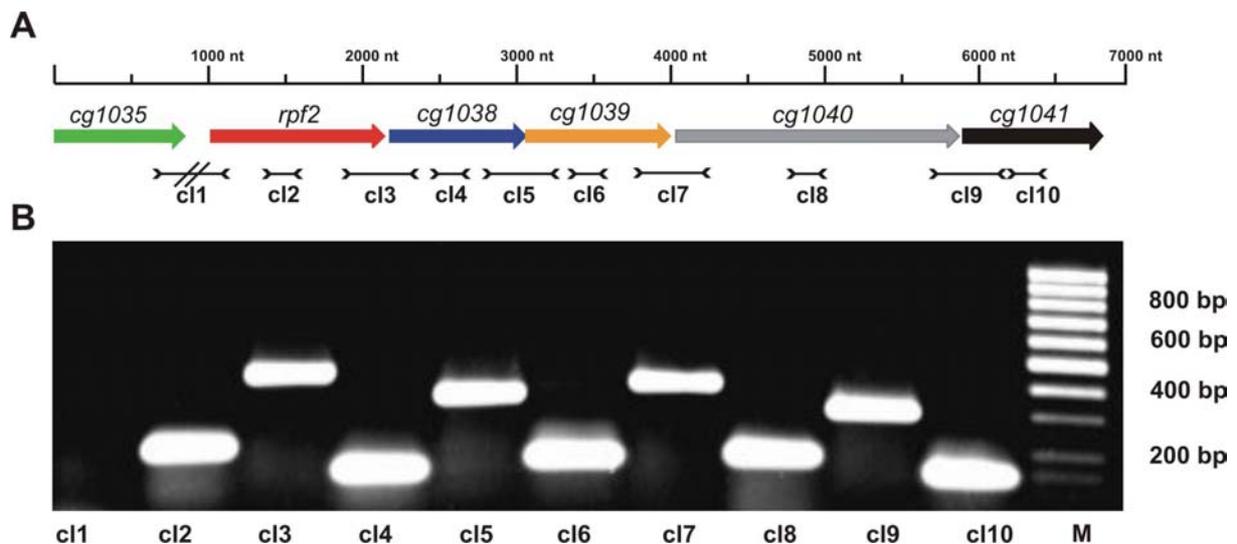


Abb.IV.09: Nachweis polycistronischer Transkripte für Gene innerhalb der *rpf2*-Genregion in *C. glutamicum*. Der experimentale Nachweis von Transkriptionseinheiten wurde durch RT-PCR Analysen mit Gesamt-RNA des Stammes *C. glutamicum* RES167 erreicht. (A) Schematische Darstellung der *rpf2*-Genregion aus *C. glutamicum*. Die für die Primerpaare *cl1* – *cl10* erwarteten Amplifikate sind ebenfalls graphisch dargestellt. (B): Agarosegel zur Darstellung der in den RT-PCR Reaktionen erhaltenen Amplifikate. Die Primerkombination *cl1* führte zu keinem RT-PCR-Produkt. In einem PCR-Kontrollexperiment mit Gesamt-DNA als Template wurde hingegen ein Amplifikat erwarteter Länge erhalten (Daten nicht gezeigt).

3 Konstruktion von *C. glutamicum*-Mutanten, die Deletionen innerhalb der *rpf*-Gene tragen bzw. eines dieser Gene verstärkt exprimieren

Für eine weitere Analyse der *rpf*-Gene wurden definierte Deletionen in die Kodierbereiche des *rpf1*- (*C. glutamicum* MH26) und des *rpf2*-Gens (*C. glutamicum* MH27) unter Benutzung der GeneSOEing-Methode (Horton, 1995) und des auf den Plasmiden pMH22 und pMH24 (Tab.III.02) vorhandenen *sacB*-Selektionssystems eingeführt (s. Anhang VII.5.3 und VII.5.4 sowie VII.7.1 und VII.7.2). Eine *rpf*-Doppelmutante von *C. glutamicum* (*C. glutamicum* MH28), welche definierte Deletionen in beiden *rpf*-Genen trägt, wurde durch Transformation der bereits bestehenden *rpf1*-Deletionsmutante *C. glutamicum* MH26 mit Plasmid pMH24 und anschließender Selektion unter Benutzung des *sacB*-Systems konstruiert (Schäfer *et al.*, 1994).

Die erfolgreiche Konstruktion von *C. glutamicum*-Stämmen, die Deletionen in einem bzw. beiden *rpf*-Genen tragen, zeigt, dass diese Gene weder allein noch in Kombination für *C. glutamicum* essentiell sind. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass dieser Befund im Gegensatz zu den Ergebnissen für *M. luteus* steht. Das singuläre *rpf*-Gen in *M. luteus* wird als essentiell beschrieben, da es im Chromosom nicht deletiert werden konnte, ohne eine

zweite funktionale, plasmidkodierte Kopie in die entsprechenden Zellen einzubringen (Mukamolova *et al.*, 2002a).

Um die Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* genauer charakterisieren zu können, wurden Vektoren für eine verstärkte Expression beider *rpf*-Gene im homologen System konstruiert. Die Kodierregionen beider *rpf*-Gene wurden separat, ohne ihre jeweiligen Promotorbereiche, mit den Primerpaaren *rpf1ex1* und *rpf1ex2* bzw. *rpf2ex1* und *rpf2ex2* (Tab.III.03) amplifiziert und über mit den Primern eingeführte Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pZ8-1 kloniert (s. Anhang VII.7.1 und VII.7.3). Die resultierenden Plasmide wurden pMH30 (*rpf1*) bzw. pMH31 (*rpf2*) genannt (Tab.III.02). Im *multicopy*-Expressionsvektor pZ8-1 stehen die *rpf*-Gene unter der Kontrolle des konstitutiv stark exprimierenden P_{tac} -Promotors, so dass eine deutlich verstärkte Transkription der Gene gewährleistet ist.

Um eine spätere Aufreinigung der Rpf-Proteine von *C. glutamicum* zu ermöglichen, wurden in ähnlicher Weise Konstrukte zur verstärkten Expression C-terminaler His-tag-Fusionen beider Rpf-Proteine (pMH32 für *rpf1* und pMH33 für *rpf2*) kloniert. Die Kodierbereiche wurden erneut mit den Primern *rpf1ex1* bzw. *rpf2ex1* amplifiziert, nun allerdings in Kombination mit den Reverse-Primern *rpf1his* bzw. *rpf2his* (Tab. III.03), über deren 5'-Extensionen sechs aufeinanderfolgende Codons für die Aminosäure Histidin eingeführt wurden. Die erhaltenen PCR-Produkte konnten anschließend über ebenfalls durch die Primer eingeführte Restriktionsschnittstellen (Tab.III.03) in den Expressionsvektor pZ8-1 kloniert werden.

4 Überstände von *C. glutamicum*-Kulturen enthalten verschiedene Formen des Rpf2-Proteins

In ersten Untersuchungen wurde die cytosolische Proteinzusammensetzung der *C. glutamicum*-Stämme MH22 und MH23, die die Plasmide (pMH30 bzw. pMH31) für eine verstärkte Expression der *rpf*-Gene im homologen System tragen, sowie diejenige der *rpf*-Deletionsmutanten *C. glutamicum* MH26, MH27 und MH28 untersucht (Tab.III.01). Nach elektrophoretischer Auftrennung der cytosolischen Gesamtproteinextrakte per SDS-PAGE waren im Vergleich zum Kontrollstamm RES167 allerdings keine Unterschiede feststellbar (Abb.IV.10).

Ausgehend von den für beide Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* postulierten Leadersequenzen, wurden weiterführend die Kulturüberstände der betreffenden Stämme aufkonzentriert und die in ihnen enthaltenen Proteine per SDS-PAGE separiert. Eine verstärkte Expression des *rpf1*-Gens führte zu keinen mit Coomassie anfärbbaren Mengen an Rpf1-Protein im Kulturüberstand von Stamm MH22 (Abb.IV.11), es konnte aber erfolgreich über einen

C-terminal fusionierten His-tag mit Ni-NTA Agarosepartikeln aus aufkonzentriertem Kulturüberstand aufgereinigt werden (Abb.IV.12A).

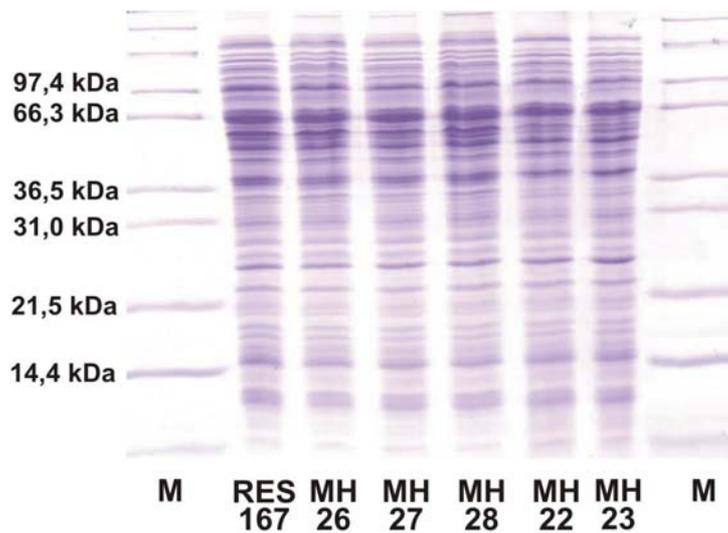


Abb.IV.10: Intrazelluläre Proteine verschiedener *C. glutamicum*-Stämme. Die cytosolischen Proteine der *C. glutamicum*-Stämme RES167, MH26 (mit einer definierten Deletion im *rpf1*-Gen), MH27 (mit einer definierten Deletion im *rpf2*-Gen), MH28 (mit definierten Deletionen im *rpf1*- und *rpf2*-Gen), MH22 (mit verstärkt exprimiertem *rpf1*-Gen) und MH23 (mit verstärkt exprimiertem *rpf2*-Gen) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung visualisiert. In den mit M bezeichneten Spuren ist ein Proteinmarker als Größenstandard aufgetragen.

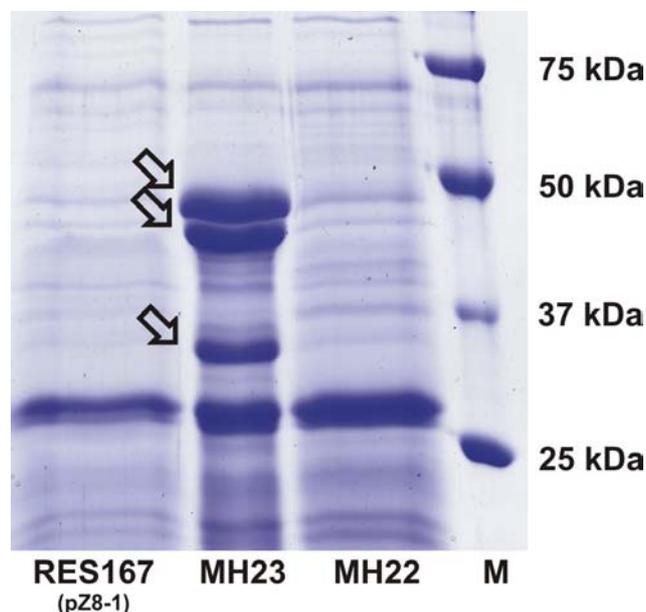


Abb.IV.11: Proteine im Kulturüberstand verschiedener *C. glutamicum*-Stämme. Konzentrierte Kulturüberstände der *C. glutamicum*-Stämme RES167, MH22 und MH23 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Verstärkt im Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH23 auftretende Proteine mit apparenten molekularen Massen von ca. 35, 42 und 47 kDa sind durch Pfeile markiert. (RES167: Konzentrierter Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* RES167 mit dem Leervektor pZ8-1; MH23: Konzentrierter Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH23, der das *rpf2*-Gen verstärkt exprimiert; MH22: Konzentrierter Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH22, der das *rpf1*-Gen verstärkt exprimiert; M: Proteinmarker).

Im Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH23, der das *rpf2*-Gen verstärkt exprimiert, konnten hingegen drei in großer Menge vorhandene und bei 35, 42 und 47 kDa bandierende Proteine detektiert werden (Abb.IV.11). Dieser Befund zeigt, dass *C. glutamicum* offensichtlich in der Lage ist, das Rpf2-Protein in großen Mengen zu synthetisieren und es sehr effizient aus der Zelle in das umgebende Medium zu transportieren. Da die verstärkte Expression des *rpf2*-Gens statt zu einem, zu drei zusätzlichen Proteinen führt, scheint das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* in verschiedenen Formen aufzutreten, die möglicherweise aus unterschiedlichen Proteinmodifizierungen resultieren.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde auch das Rpf2-Protein mit magnetischen Ni-NTA-Agarosepartikeln über einen C-terminal fusionierten His-tag aus aufkonzentriertem Kulturüberstand des *C. glutamicum*-Stammes MH25 (Tab.III.02) aufgereinigt. Eine anschließende Auftrennung der von den Agarosepartikeln eluierten Probe durch SDS-PAGE resultierte in mehreren Proteinbanden, darunter die bereits zuvor identifizierten Proteine von 35, 42 und 47 kDa Größe sowie weitere Proteine, die im Gel unterhalb von 35 kDa, der für das prozessierte Rpf2-Protein errechneten Masse, bandierten (Abb.IV.12B).

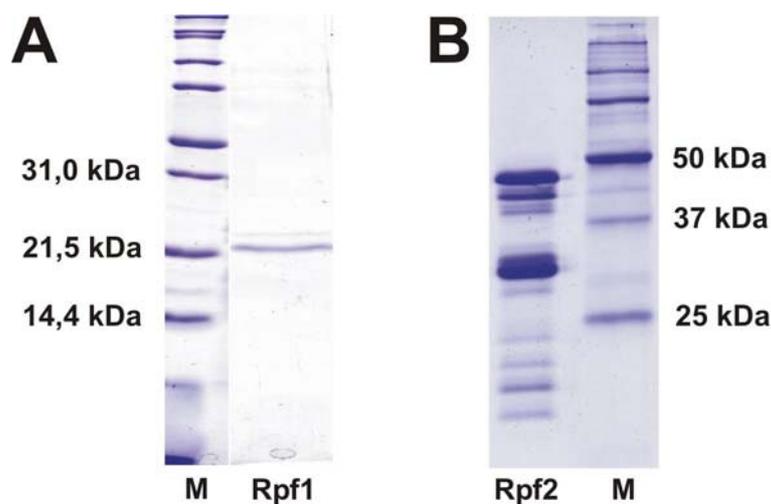


Abb.IV.12: Aufreinigung der Rpf-Proteine aus *C. glutamicum*. Kulturüberstände der Stämme *C. glutamicum* MH24 und MH25 wurden aufkonzentriert und aus ihnen das Rpf1- (A) bzw. Rpf2-Protein (B) über einen C-terminal fusionierten His-tag und unter Benutzung von magnetischen Ni-NTA-Agarosepartikeln aufgereinigt. (Rpf1: aufgereinigtes Rpf1-Protein aus dem Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH24; Rpf2: aufgereinigtes Rpf2-Protein aus dem Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH25; M: Proteinmarker).

Western-Blot-Analysen der auf diese Weise erhaltenen Proteine mit einem Rpf2-spezifischen Antikörper zeigten eindeutig, dass alle aus dem Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH25 aufgereinigten Proteine dasjenige Peptid enthalten, das ursprünglich für die Produktion des Antikörpers ausgewählt und verwendet wurde. Auch in Kulturüberständen der Stämme RES167 und MH23, der das *rpf2*-Gen überexprimiert, waren durch den Rpf2-spezifischen Antikörper jeweils drei Rpf2-Formen mit molekularen Massen von 35, 42

und 47 kDa nachweisbar. Kulturüberstand des *C. glutamicum*-Stammes MH28, der Deletionen im *rpf1*- und *rpf2*-Gen trägt, enthielt den Erwartungen entsprechend, hingegen kein Rpf2-Protein (Abb.IV.13).

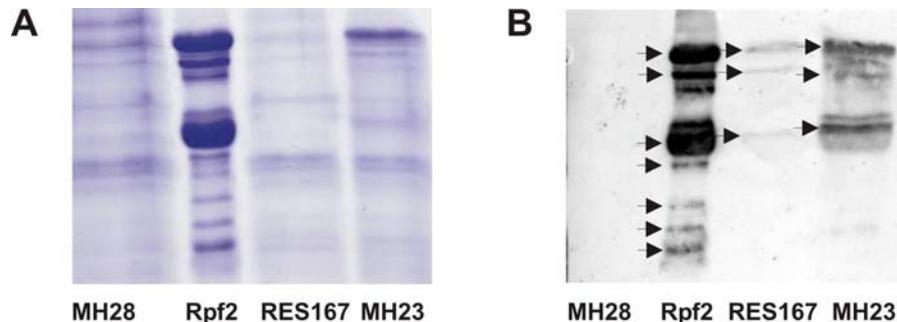


Abb.IV.13: Identifizierung verschiedener Formen des Rpf2-Proteins in Überständen von *C. glutamicum*-Kulturen. Gezeigt sind SDS-PAGEs verschiedener Proteinproben (A) und die Detektion von Rpf2-Formen durch einen Rpf2-spezifischen Antikörper im korrespondierenden Western-Blot. Durch den Antikörper eindeutig nachgewiesene Rpf2-Formen sind mit Pfeilen markiert. (MH28: Aufkonzentrierter Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH28, der Deletionen in beiden *rpf*-Genen trägt; Rpf2: Eluat der Rpf2-Aufreinigung aus Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH25; RES167: Aufkonzentrierter Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* RES167; MH23: Aufkonzentrierter Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH23, der das *rpf2*-Gen überexprimiert).

Nachfolgend durchgeführte *peptide mass fingerprint*-Analysen bestätigten diesen Befund. Für dieses Vorgehen wurden die aufgereinigten Proteine aus einem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, mit Trypsin proteolytisch verdaut und die entstehenden Peptide anschließend mit einem hochsensitiven MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert. Mit diesen Analysen konnten identische Peptidmassen für alle bei der Rpf2-Aufreinigung erhaltenen Proteine ermittelt werden (Abb.IV.14). Ein Vergleich mit einem *in silico* durchgeführten tryptischen Verdau des prozessierten Rpf2-Proteins führte zu einer Abdeckung von 45,97%. Damit repräsentieren alle aufgereinigten Proteine zweifelsfrei verschiedene Formen des Rpf2-Proteins aus *C. glutamicum*. Die, verglichen mit der für das prozessierte Protein berechneten molekularen Masse, reduzierte Mobilität von zwei Rpf2-Formen in der SDS-PAGE könnte aus verschiedenen Proteinmodifikationen resultieren, während die kleineren Formen vermutlich verschiedene durch Proteolyse verkürzte Rpf2-Proteine darstellen. Höchstwahrscheinlich resultieren diese Formen aus proteolytischen Spaltungen innerhalb des N-terminalen Teils des Rpf2-Proteins, da die Peptide des C-terminalen Bereichs in allen *peptide mass fingerprints*, auch denjenigen der kleineren Rpf2-Formen, identifiziert wurden. Dieser Teil des Rpf2-Proteins beinhaltet auch den in Western-Blot-Analysen genutzten antigenen Bereich sowie das hochkonservierte Rpf-Motiv (vgl. Abb.IV.14).

1 **MAPHQSRIN** **RINSTRSVPL** **RLATGGVLAT** **LLIGGVTA** TKKDIIVDVN
 51 GEQMSLVTMS GTVEGVLAQA GVELGDQDIV SPSLDSSISD EDTVTVRTAK
 101 QVALVVEGQI Q^{.....}NVT^{.....}TTAVSV EDLLQEVGGI TGADAVDADL SETIPESGLK
 151 VSVTKPK**IIS** **INDGGKVTVV** **SLAAQNVQEA** **LELRDIELGA** **QDRINVPLDQ**
 201 **QLKNNAIQI** **DRVNTEITE** **TVS** **FDAEPTY** **VDDPEAP** **AGD** **ETVVEEGAPG**
 251 **TKEVTR** **TVTT** **VNGQESSTV** **INEVEITAAK** **PATISR** **GTKT** VAANSVWDQL
 301 AQCESGGNWA INTGNGFSGG LQFHPQTWLA YGGGAFSGDA SGASRE**QQIS**
 351 IAEKVQAAQG WGAWPACTAS **LGIR**

Abb.IV.14: Identifikation des Rpf2-Proteins aus *C. glutamicum* durch *peptide mass fingerprints*. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des Rpf2-Proteins im Ein-Buchstaben-Code. Das putative Leaderpeptid ist blau, Peptide, deren Massen im *peptide mass fingerprint* identifiziert wurden, sind rot dargestellt. Schnittstellen des Trypsins sind durch Pfeile (▼) gekennzeichnet, der antigene Bereich (Aminosäuren 215 – 228) zur Herstellung eines peptidischen Antikörpers ist mit einem durchgängigen Rahmen markiert, eine putative N-Glykosylierungsstelle ist mit einer gestrichelten Linie umrahmt. Das Rpf-Motiv ist unterstrichen. Die dargestellten identifizierten Peptide kamen in allen Formen des aufgereinigten Rpf2-Proteins vor.

In einer systematischen Analyse sämtlicher im Kulturüberstand des *C. glutamicum*-Stammes ATCC 13032 enthaltenen Proteine durch 2D-SDS-Gelelektrophorese und anschließender Identifizierung mittels *peptide mass fingerprints* konnten ebenfalls drei verschiedene Formen des Rpf2-Proteins sowie das Rpf1-Protein identifiziert werden (Abb.IV.15). Eine zweidimensionale Auftrennung der Proteine ermöglicht im Vergleich zur traditionellen eindimensionalen SDS-PAGE unter Verwendung größerer Proteinmengen eine höhere Auflösung. So können nach einer entsprechenden Aufkonzentrierung des Kulturüberstands auch in kleineren Mengen synthetisierte und exkretierte Proteine ebenfalls eindeutig identifiziert werden. Die drei nachweisbaren Rpf2-Formen entsprechen den bei Überexpression des *rpf2*-Gens in sehr großen Mengen auftretenden Formen mit molekularen Massen von 35, 42 und 47 kDa. Wie bereits der Western-Blot mit dem Rpf2-spezifischen Antikörper zeigt, stellen diese Rpf2-Formen somit keine nur bei der Überexpression auftretenden Artefakte dar, sondern werden definitiv auch von *C. glutamicum*-Wildtypzellen gebildet.

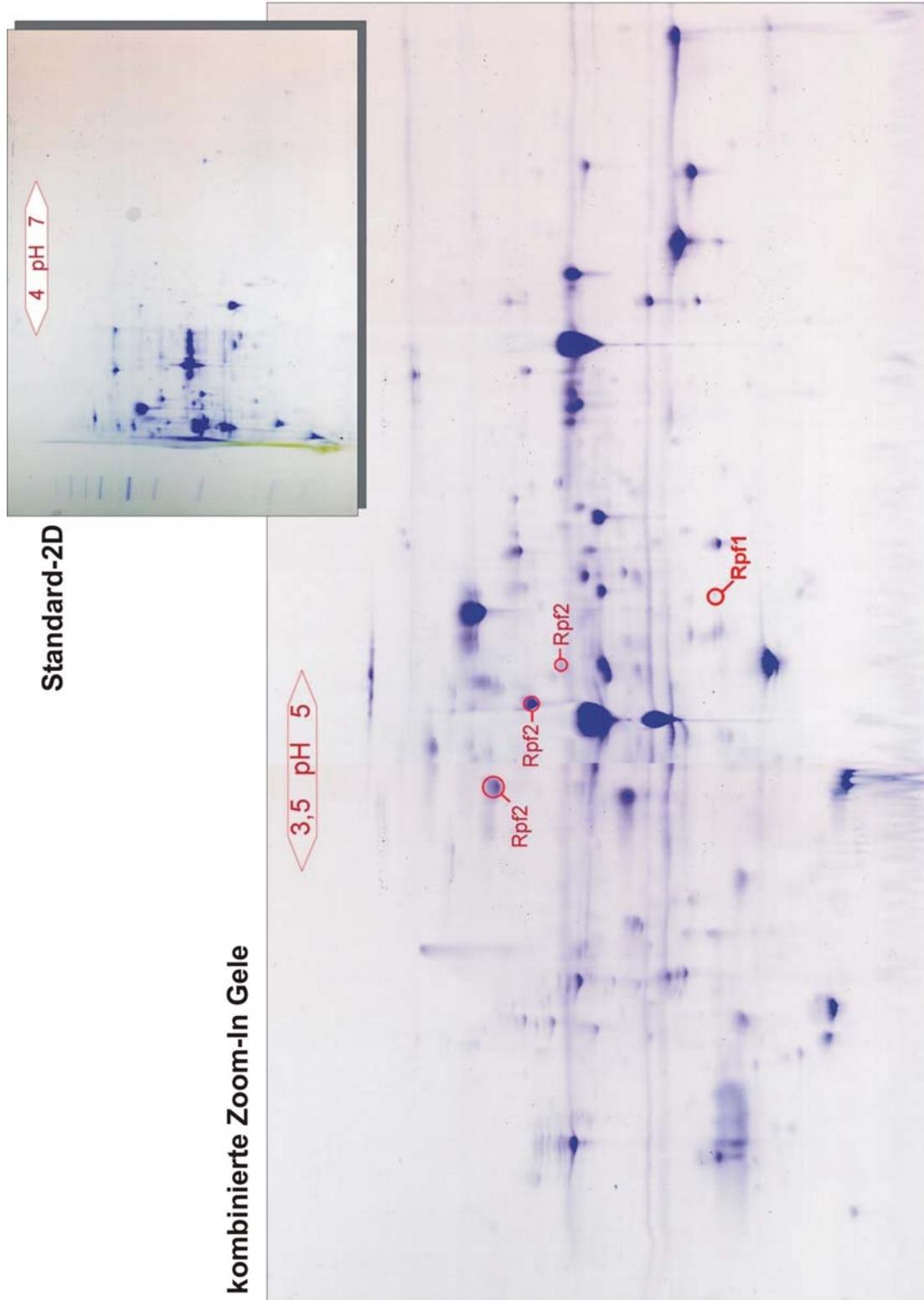


Abb. IV.15: Zweidimensionale SDS-PAGE von im Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* RES167 enthaltenen Proteinen. Gezeigt ist eine Auftrennung über den pH-Bereich 4 - 7 (klein), sowie zwei kombinierte Zoom-In Gele (pH-Bereiche 3,5 - 4,2 bzw. 4,0 - 5,0). Durch peptide mass fingerprint -Analysen identifizierte Rpf1- und Rpf2-Formen sind rot markiert.

5 Das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* wird durch Glykosylierung modifiziert

Um zu untersuchen, ob die reduzierte Mobilität von zwei der verschiedenen Rpf2-Formen während SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen aus posttranslationalen Proteinmodifikationen resultiert, wurde das Rpf2-Protein im Hinblick auf eine mögliche Glykosylierung analysiert. Dazu wurden Proteinproben aus aufkonzentrierten Kulturüberständen bzw. aufgereinigtes Rpf2-Protein unter Benutzung eines kommerziellen Kits zunächst mit Periodat mild oxidiert. An die bei einer vorhandenen Glykosylierung entstehenden Aldehyde wurde im nachfolgenden Schritt das mit einem Spacer verbundene Steroidhapten Digoxigenin (DIG) über Hydrazidgruppen kovalent gebunden. Glykoproteine konnten dann nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran mit einem DIG-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb.IV.16)

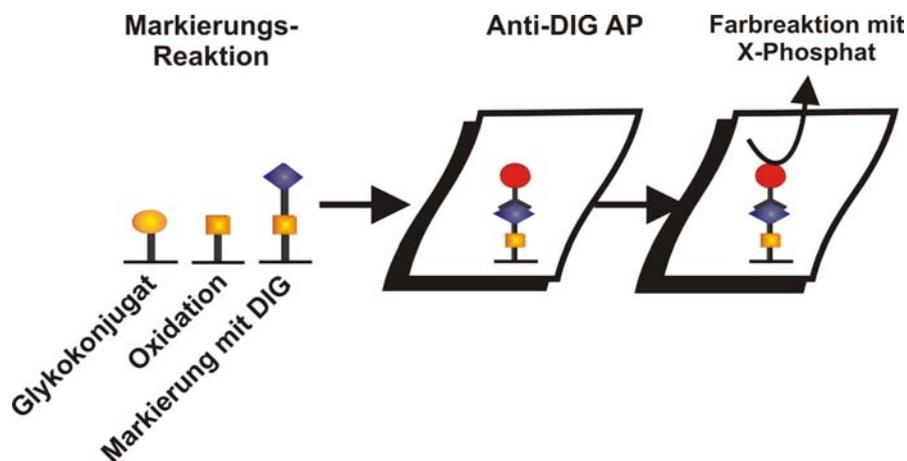


Abb.IV.16: Schematische Darstellung des Nachweises von Glykokonjugaten mit dem Dig Glycan Detection Kit (Roche). Die Glykokonjugate werden auf einer Membran immobilisiert und anschließend mit Periodat oxidiert. An die entstehenden Aldehyde wird das Steroidhapten Digoxigenin (DIG) gebunden. Dieser Komplex kann schließlich in einer Farbreaktion mit NBTX-Phosphat (X-Phosphat) durch die an den Antikörper (anti-DIG) gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen werden.

Positive Reaktionen, die eine Glykosylierung nachweisen, sind für die drei Rpf-Formen höherer molekularer Masse (35, 42 und 47 kDa) der Rpf2-Aufreinigung und für mindestens eine Rpf2-Form im Kulturüberstand des *C. glutamicum*-Stammes MH23, der das *rpf2*-Gen verstärkt exprimiert, zu erkennen (Abb.IV.17). Im Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH28, der Deletionen in beiden *rpf*-Genen trägt, sind hingegen keine glykosylierten Proteine detektierbar (Abb.IV.17). Dieser Western-Blot-basierte Test zum Nachweis von Glykokonjugaten belegt somit, dass das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* durch Glykosylierung posttranslational modifiziert wird.

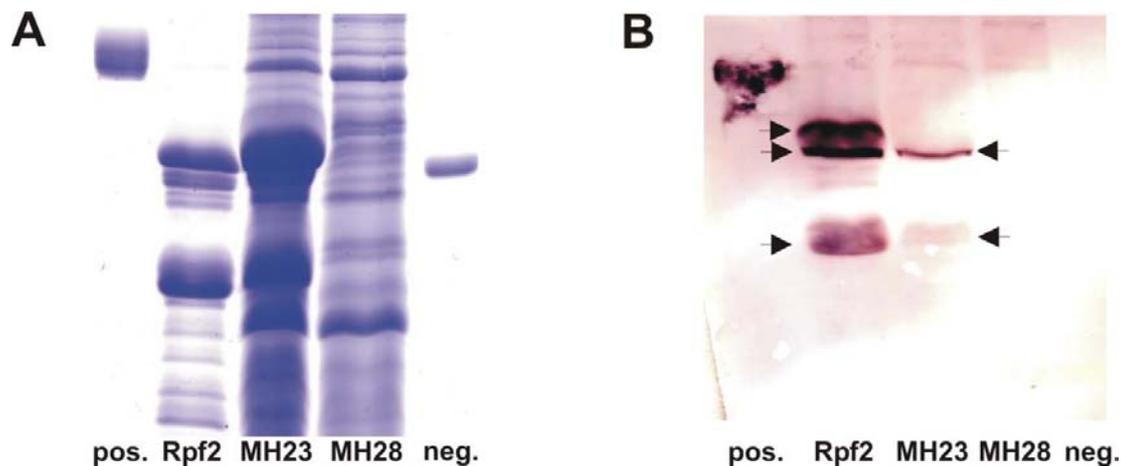


Abb.IV.17: Glykosylierung des Rpf2-Proteins aus *C. glutamicum*. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung von aufgereinigtem Rpf2-Protein und Proteinen aus aufkonzentrierten Kulturüberständen der Stämme *C. glutamicum* MH23 und MH28. (B) Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran durchgeführter Enzym-Immunoassay zum Nachweis der in Glykokonjugaten enthaltenen Zucker. (pos: als technische Positivkontrolle verwendetes Transferrin-Glykoprotein (Roche Diagnostics); Rpf2: Aus Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH25 aufgereinigtes Rpf2-Protein; MH23: Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH23, der das *rpf2*-Gen verstärkt exprimiert; MH28: Kulturüberstand des Stammes *C. glutamicum* MH28, der Deletionen in beiden *rpf*-Genen trägt; neg: als technische Negativkontrolle verwendetes Creatinase-Protein)

6 Mannose und Galaktose sind zwei Hauptbestandteile des Kohlenhydratanteils des Rpf2-Glykoproteins aus *C. glutamicum*

In weiterführenden Untersuchungen wurde versucht, Bestandteile des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung durch GC/MS (an Gaschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie) zu identifizieren. Die Glykoproteine wurden dazu mit wasserfreier methanolischer Salzsäure hydrolysiert und die Kohlenhydratanteile anschließend zu (Trimethyl)silylmethylglykosiden derivatisiert. Durch Vergleich der für die Proben erhaltenen Elutionsprofile und Massenspektren mit Daten für gleichbehandelte Referenzsubstanzen konnten so Kohlenhydratbestandteile des Rpf2-Glykoproteins eindeutig bestimmt werden.

Abbildung IV.18A zeigt ein entsprechendes Retentionsprofil für eine Rpf2-Probe. Identische Retentionswerte für Substanzen in der Probe und für die Mannose- (Abb. IV.18B) bzw. Galaktose-Referenz (Abb. IV.18C) führten zur Identifizierung dieser Zucker als Hauptbestandteile des Rpf2-Oligosaccharidanteils. Diese Ergebnisse wurden durch vollständige Übereinstimmung der korrespondierenden Massenspektren der Probe und der Referenzen bestätigt (vgl. Anhang VII.8.1 und VII.8.2). Zusätzliche Peaks im Retentionsprofil der Rpf2-Probe (Abb.18A) legen nahe, dass mit großer Wahrscheinlichkeit weitere Zucker im Kohlenhydratanteil der Rpf2-Glykosylierung enthalten sind. Allerdings konnten diese durch

Vergleich mit weiteren Referenzen (siehe Abschnitt III.22.1) nicht identifiziert werden. Infolgedessen ermöglichten die GC/MS-Analysen bisher lediglich die eindeutige Identifizierung der Hexosen Mannose und Galaktose als zwei im Rpf2-Glykoprotein enthaltene Zucker.

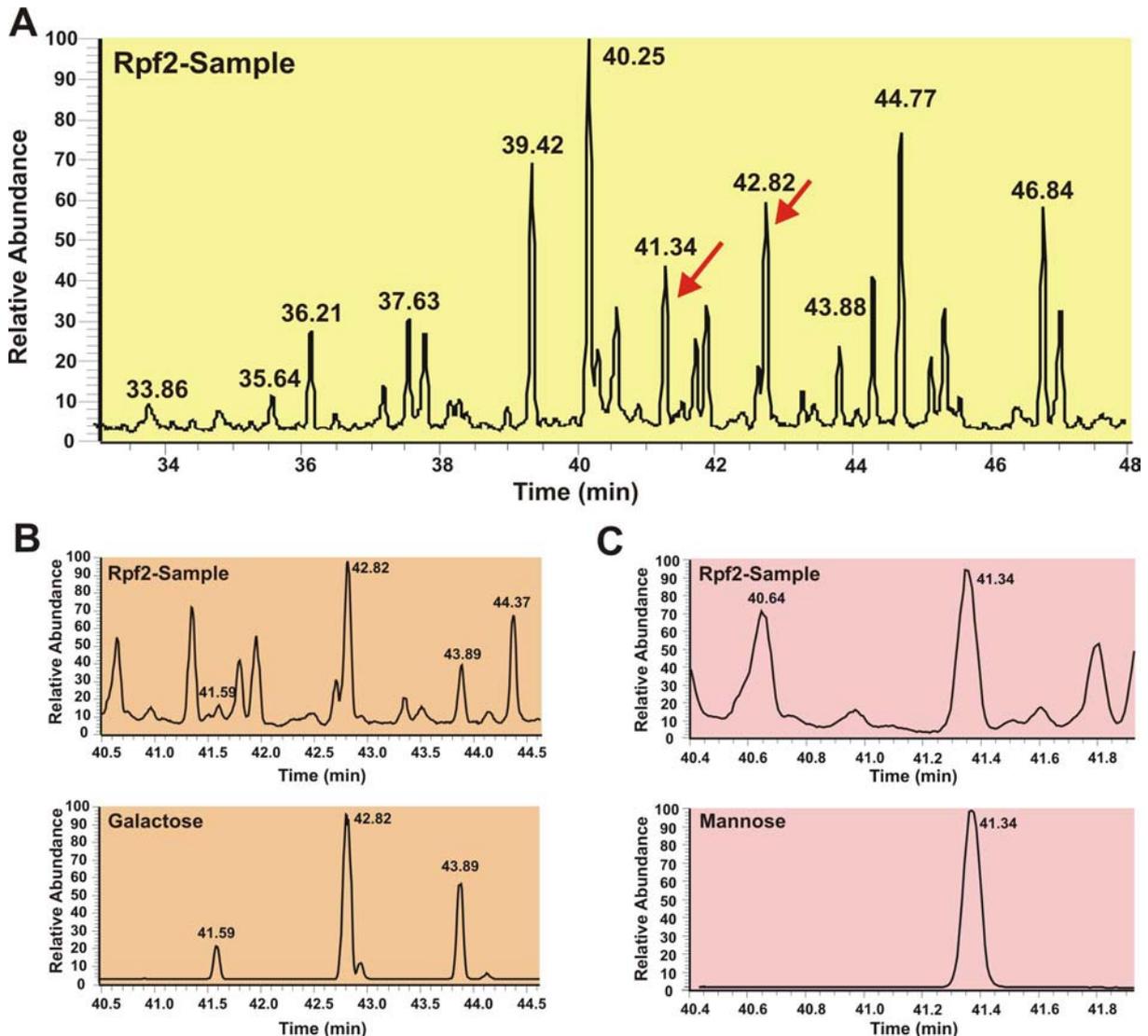


Abb.IV.18: Identifizierung von Galaktose und Mannose als Bestandteile des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung durch GC/MS. (A) Retentionsprofil (Minute 33 – 48) einer Rpf2-Probe. Peaks, die zur Identifizierung von Galaktose bzw. Mannose führten, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) und (C) zeigen entsprechende Bereiche des Retentionsprofils der Rpf2-Probe (oben) und der jeweiligen Referenzsubstanzen (unten).

7 Das Rpf2-Protein ist auf der Zelloberfläche von *C. glutamicum* Zellen lokalisiert

Der Rpf2-spezifische Antikörper wurde ausserdem in Immunoassays für eine Lokalisierung des Rpf2-Proteins eingesetzt. *C. glutamicum* RES167-Zellen wurden zu diesem Zweck aus einer spätlogarithmischen Flüssigkultur geerntet, intensiv gewaschen und mit dem peptidischen Rpf2-Antikörper inkubiert. Nach Zugabe eines zweiten, Fluoreszenzmarkierten Immunglobulins ist eine starke Fluoreszenz der Zellen feststellbar (Abb.IV.19A). Wurden *C. glutamicum* RES167-Zellen nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert bzw. wurden unter Verwendung beider Antikörpern Zellen des *C. glutamicum*-Stammes MH28 eingesetzt, der Deletionen in beiden *rpf*-Genen trägt, war hingegen keine Fluoreszenz beobachtbar (Abb.IV.19B).

Das bereits im Kulturüberstand von *C. glutamicum* nachgewiesene Rpf2-Protein ist demnach also auch auf der Oberfläche der Bakterienzellen präsent.

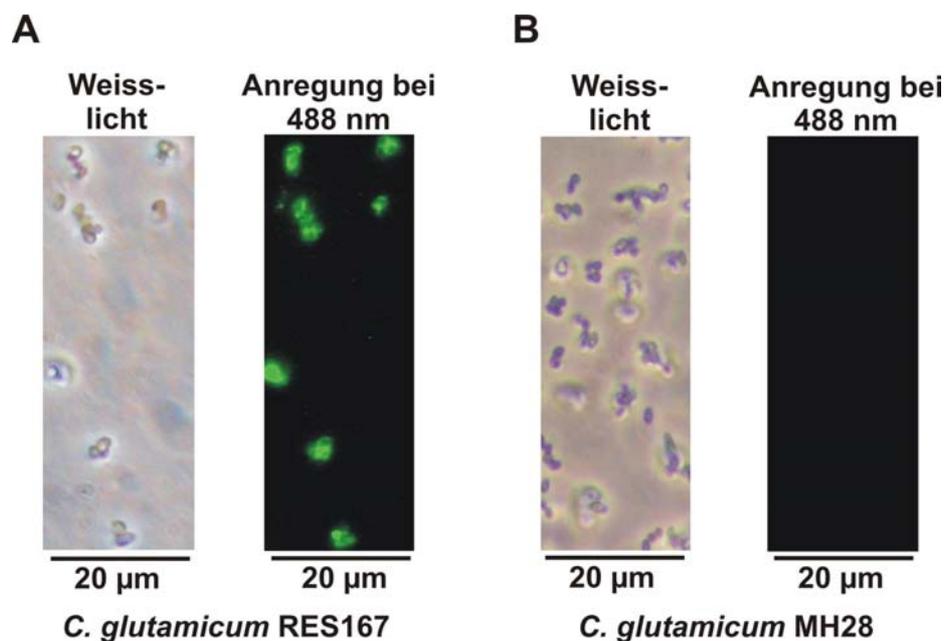


Abb.IV.19: Lokalisierung des Rpf2-Proteins auf der Oberfläche von *C. glutamicum* RES167-Zellen. Mikroskopische Aufnahmen von *C. glutamicum*-Zellen spätlogarithmischer Kulturen bei Weisslicht und bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm. Das Rpf2-Protein wurde durch Inkubation mit einem Rpf2-spezifischen Primärantikörper und einem Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Molecular Probes) nachgewiesen. Ein Längensstandard ist unter den Aufnahmen angegeben. (A) Mikroskopische Aufnahmen von *C. glutamicum* RES167-Zellen. (B) Als negative Kontrolle verwendete *C. glutamicum* MH28-Zellen.

8 Eine gleichzeitige Deletion beider *rpf*-Gene führt nach Transfer eines kleinen Inokulums zu beeinträchtigtem Wachstum von *C. glutamicum*-Zellen

Aufgrund der Annahme, dass die *rpf*-Gene aus *C. glutamicum* für Proteine mit einer Funktion als Wachstumsfaktoren kodieren könnten, wurde das Wachstum der *rpf*-Mutanten unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Generell zeigten Stämme, die Deletionen in einem (*C. glutamicum* MH26 und MH27) bzw. beiden (*C. glutamicum* MH28) *rpf*-Genen tragen, sowohl in Komplex- als auch in Minimalmedium im Vergleich zum Kontrollstamm RES167 keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Wachstumskinetik bzw. der am Ende der Kultivierung erreichten optischen Dichten. Ein eindeutiger Phänotyp war ausschließlich für die Doppelmutante MH28 beobachtbar, wenn dieser Stamm mit kleinen Zellzahlen (Startzelldichte $< 5 \times 10^4$ Zellen \times ml $^{-1}$) aus einer Vorkultur in frisches LBG-Komplexmedium ($2 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Glukose) überimpft wurde (Abb.IV.20).

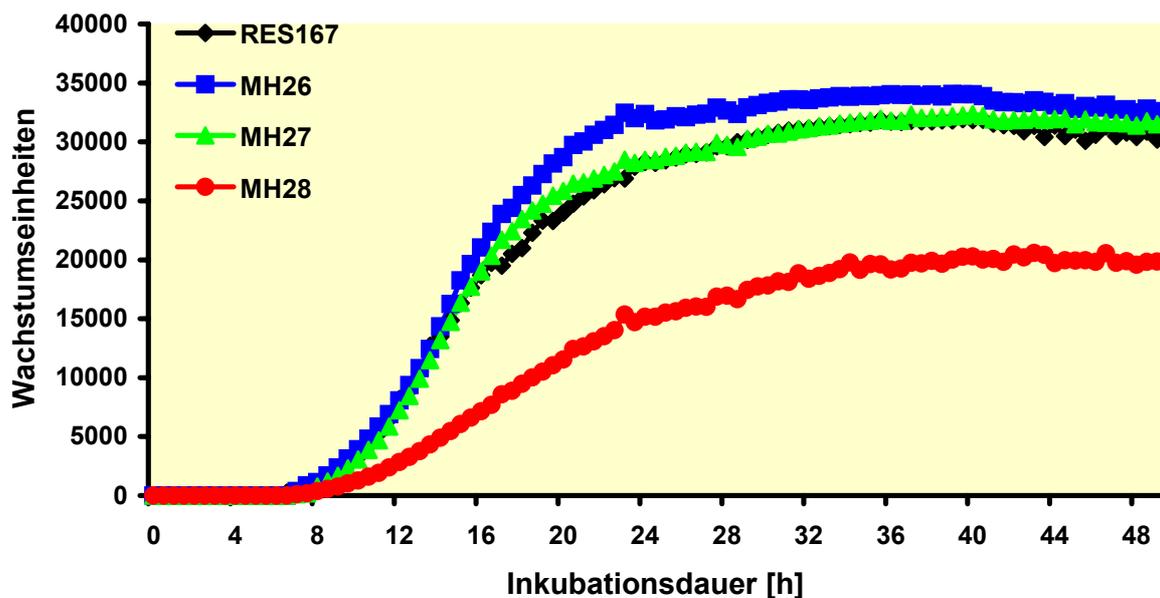


Abb.IV.20: Wachstum verschiedener *C. glutamicum*-Stämme nach Transfer kleiner Inokula in frisches LBG-Medium. Die Zelldichten der Stämme *C. glutamicum* MH28 (●), mit Deletionen in beiden *rpf*-Genen, sowie der *rpf*-Einzelmutanten *C. glutamicum* MH26 (■) und MH27 (▲) wurden mit einem Nephelostar (BMG Labtechnologies, Jena) Wachstumsanalyser über den gesamten Wachstumsverlauf bestimmt. Die Messwerte wurden automatisiert alle 7 Minuten aufgenommen. Der Stamm *C. glutamicum* RES167 diente als Kontrolle (♦). Für die Wachstumsanalysen wurden Kulturvolumina von 200 μ l mit 1×10^4 Zellen aus über Nacht gewachsenen LBG-Kulturen beimpft. Die gezeigten Daten sind Durchschnittswerte aus jeweils acht pro Stamm parallel gemessenen Ansätzen. Die aufgetretenen Standardabweichungen waren hierbei geringer als die Höhe der verwendeten Symbole der Graphen.

Unter diesen Bedingungen benötigten die *C. glutamicum*-Stämme RES167, MH26 und MH27 ungefähr 7 Stunden, um eine messbare Trübung der Kultur hervorzurufen (apparente lag-Phase). Nach dieser Zeitspanne zeigten die drei Stämme einen nahezu identischen Wachstumsverlauf und erreichten nach ungefähr 26 Stunden bei vergleichbaren Zelldichten die Stationärphase. Im Vergleich dazu war das Wachstum der *rpf*-Doppeldelentionsmutante *C. glutamicum* MH28 deutlich beeinträchtigt. Zellen dieses Stammes zeigten während des logarithmischen Wachstums eine 2,75-fach erhöhte Generationszeit. Außerdem erreichte diese Kultur bei Eintritt in die Stationärphase verglichen mit den anderen Stämmen nur ca. 65% der Zelldichte (Abb.IV.20).

9 Die gleichzeitige Deletion beider *rpf*-Gene führt nach Inokulation aus einer langandauernden Stationärphase zu beeinträchtigtem Wachstum

Eine ausgeprägte phänotypische Abnormität des Stammes *C. glutamicum* MH28, der Deletionen in beiden *rpf*-Genen trägt, trat zudem auf, wenn Kulturen mit Zellen angeimpft wurden, die zuvor einer langandauernden Stationärphase ausgesetzt waren. Für diese Experimente wurden die verschiedenen *rpf*-Mutanten (*C. glutamicum* MH26, MH27 und MH28) sowie der Kontrollstamm RES167 zunächst für zwei Tage bei 30°C auf LBG-Agar-Platten angezogen und anschließend im Kühlschrank bei 4°C für weitere 25 Tage gelagert, wobei die Platten mit Parafilm gegen Austrocknung geschützt wurden. Die Zellen wurden für die Wachstumsanalysen in Minimalmedium MM1 resuspendiert und der Anteil an *colony forming units* (*cfu*) auf LBG-Agarplatten bestimmt. Nach Transfer von $1,5 \times 10^6$ *cfu* pro ml Kulturvolumen benötigte der Kontrollstamm RES167 sowie die Einzelmantanten *C. glutamicum* MH26 und MH27 jeweils 23-27 Stunden um ein durch die optische Dichte bestimmbares Zellwachstum zu initiieren (apparente lag-Phase, Abb.IV.21). Im Gegensatz dazu benötigte die Doppelmantante MH28 ca. 47 Stunden um eine messbare Trübung der Kultur hervorzurufen. Nach dieser verlängerten lag-Phase wuchs der Stamm zwar zu einer im Vergleich mit den anderen Stämmen nur geringfügig geringeren Endzelldichte an, seine Generationszeit war allerdings um den Faktor 4 verlängert (Abb.IV.21).

Das beeinträchtigte Wachstum der Doppelmantante MH28 konnte durch die Plasmide pMH30 bzw. pMH31, also den Expressionskonstrukten für das *rpf1*- bzw. *rpf2*-Gen, genetisch komplementiert werden. Wurde eines der beiden Plasmide in die Doppelmantante MH28 transformiert und der resultierende Stamm unter den genannten Bedingungen angezogen, zeigte er ein zu den Einzelmantanten (MH26 und MH27) bzw. dem Kontrollstamm RES167 identisches Wachstum (Daten nicht gezeigt). Der ausschließlich bei der *rpf*-

Doppelmutante auftretende Phänotyp legt folglich nahe, dass beide *rpf*-Gene in *C. glutamicum* für sehr ähnliche, evtl. sogar identische Funktionen kodieren.

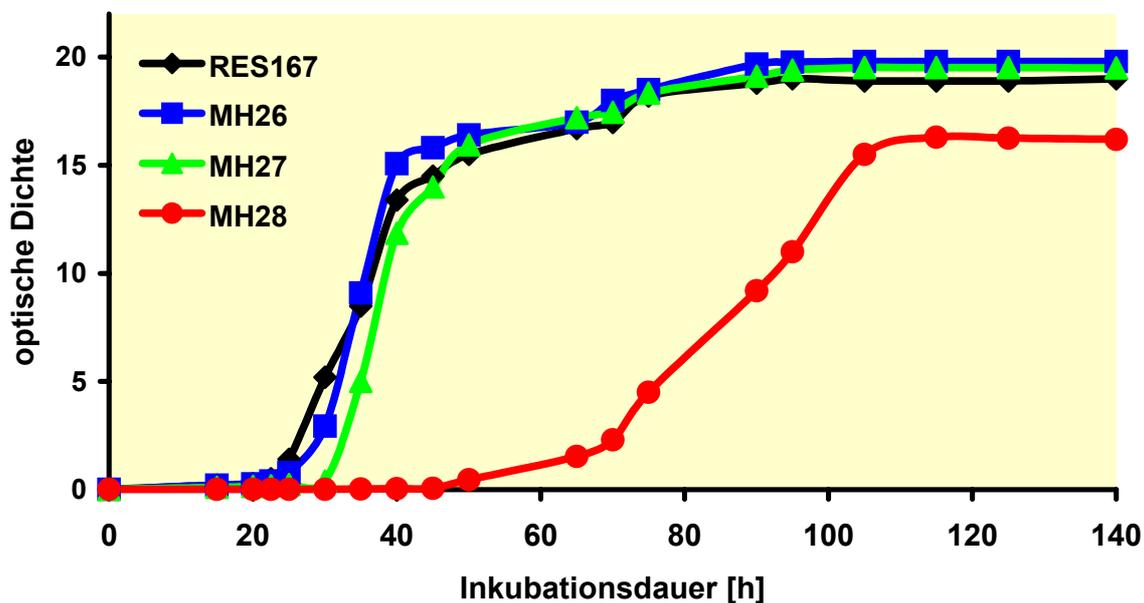


Abb.IV.21: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme MH26 (■), MH27 (▲) und MH28 (●) nach Inokulation aus einer langandauernden Stationärphase. Die entsprechenden Stämme, die definierte Deletionen innerhalb der *rpf*-Gene tragen (Tabelle III.01), wurden für diese Analysen zunächst zwei Tage auf LBG-Agarplatten bei 30°C angezogen und anschließend für 25 Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert, wobei die Platten mit Parafilm gegen Austrocknung geschützt wurden. Die Zellen wurden von den Platten in Minimalmedium MM1 resuspendiert und in MM1-Kulturen mit einer anfänglichen Zelldichte von $1,5 \times 10^6 \text{ cfu} \times \text{ml}^{-1}$ überimpft. Der Stamm *C. glutamicum* RES167 (◆) wurde als Kontrolle verwendet. Die Graphik zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Analyse wurde mit jeweils neun unabhängig angezogenen und gelagerten *C. glutamicum*-Kulturen wiederholt und zeigte für alle Stämme generell qualitativ identische Ergebnisse.

10 Der Kulturüberstand logarithmisch wachsender *C. glutamicum*-Zellen besitzt wachstumsfördernde Eigenschaften

Um eventuelle wachstumsfördernde Effekte von außen zugegebener Rpf-Proteine zu untersuchen, wurden Wachstumsexperimente unter Zusatz sterilfiltrierter Überstände logarithmischer *C. glutamicum*-Kulturen durchgeführt. Für diese Analysen wurden erneut *C. glutamicum*-Zellen, die einer langandauernden Stationärphase ausgesetzt waren, in frisches Minimalmedium MM1 überimpft und Überstand aus logarithmisch wachsenden RES167- und MH28-Kulturen in einer Verdünnung von 1:500 zugesetzt. Tatsächlich war eine Verkürzung der lag-Phasen bei Zugabe des RES167-Kulturüberstands für den Kontrollstamm RES167 und die *rpf*-Einzelmutanten MH26 und MH27 beobachtbar (Tab.IV.01). Die Zugabe des Kulturüberstands hatte aber keine Auswirkung auf die lag-Phase der *rpf*-Doppelmutante

MH28, die im Vergleich zum Kontrollansatz, also einer Kultur ohne Zusatz von RES167-Kulturüberstand, konstant blieb. Der bereits bei vorhergehenden Experimenten unter diesen Bedingungen gezeigte Wachstumsdefekt der *rpf*-Doppelmutante konnte folglich nicht durch im Kulturüberstand enthaltene Rpf-Proteine oder andere Komponenten aufgehoben werden.

Tab.IV.01: Die Zugabe von sterilem Kulturüberstand logarithmisch wachsender *C. glutamicum*-Zellen beeinflusst die apparente lag-Phase von *C. glutamicum*-Stämmen mit unterschiedlichen *rpf*-Genotypen.

Stamm	Genotyp	apparente lag-Phase [h] ^a		
		Kontrolle	+ Kulturüberstand von RES167	+ Kulturüberstand von MH28
RES167	wildtype	23 ± 4	12 ± 3	13 ± 3
MH26	<i>rpf1</i> ⁻	23 ± 3	13 ± 3	13 ± 4
MH27	<i>rpf2</i> ⁻	27 ± 4	16 ± 2	16 ± 2
MH28	<i>rpf1</i> ⁻ <i>rpf2</i> ⁻	47 ± 5	45 ± 5	45 ± 4

^a Die apparent lag-Phase entspricht der Zeit bis zu einer messbaren Trübung einer Kultur (Kaprelyants und Kell, 1996). Die angegebenen Werte entsprechen dem Durchschnitt aus fünf unabhängigen Experimenten.

Erstaunlicherweise führte die Zugabe von Überstand einer *C. glutamicum* MH28-Kultur, der nachweislich keine Rpf-Proteine enthält, zu identischen Ergebnissen. Auch Kulturüberstand dieses Stammes sorgt für eine signifikante Verkürzung der lag-Phasen der *rpf*-Einzelmutanten MH26 und MH27, während er auf das Anwachsen der aus einer langandauernden Stationärphase frisch überimpften *rpf*-Doppelmutante MH28 keinen Einfluß ausübt (Tab.IV.01). Da auch der Kulturüberstand der *rpf*-Doppelmutante, der keine Rpf-Proteine enthält, somit offensichtlich in der Lage ist, unter bestimmten Bedingungen die lag-Phase von *C. glutamicum*-Zellen substantiell zu verkürzen, muß neben den Rpf-Proteinen mindestens ein weiteres in *C. glutamicum*-Kulturüberständen enthaltenes Molekül postuliert werden, das wachstumfördernde Eigenschaften besitzt. Ferner ist festzustellen, dass dieses Molekül nur bei Vorhandensein des Rpf1- oder des Rpf2-Proteins aktiv sein kann. Andernfalls hätte auch für die *rpf*-Doppelmutante *C. glutamicum* MH28 bei Zugabe von Überstand einer logarithmischen Kultur desselben Stammes eine Verkürzung der apparenten lag-Phase feststellbar sein müssen.

V Diskussion

1 *C. glutamicum*-Zellen synthetisieren zwei Proteine mit Rpf-Motiv

Die *C. glutamicum*-Genomsequenz ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung zweier Gene, *rpf1* und *rpf2*, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zum *resuscitation-promoting factor* aus *Micrococcus luteus* aufweisen (Mukamolova *et al.*, 1998). Ein ca. 80 Aminosäuren umfassender Bereich, das sogenannte Rpf-Motiv (Kell und Young, 2000), ist dabei besonders stark konserviert. Es ist darüber hinaus in einer ganzen Reihe weiterer Proteine unbekannter Funktion vorhanden, die anhand von Genomsequenzen für viele Mitglieder der *Actinomycetales* postuliert werden. Gene, die für Rpf-ähnliche Proteine kodieren, sind somit augenscheinlich in Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt der DNA weit verbreitet, kommen aber in keinem anderen vollständig sequenzierten Organismus vor (Kell und Young, 2000). Sie scheinen also eine Besonderheit der phylogenetischen Ordnung der *Actinomycetales* zu sein. Die meisten der betreffenden bakteriellen Spezies besitzen mehrere *rpf*-ähnliche Gene, mit der Ausnahme von *M. luteus*, in dem nur ein einzelnes *rpf*-Gen identifiziert werden konnte (Mukamolova *et al.*, 2002a). Die Tatsache, dass viele Bakterien mehrere *rpf*-Genkopien tragen, könnte auf mögliche Unterschiede in der Funktionsweise jedes einzelnen Rpf-Proteins hindeuten.

Generell wird allen bisher analysierten Rpf-Proteinen eine extracytoplasmatische Wirkweise zugeschrieben, die mit dem Vorhandensein charakteristischer Signalsequenzen im Einklang steht (Kell und Young, 2000; Mukamolova *et al.*, 2002a; 2002b). Auch für die Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* konnten entsprechende Leaderpeptide durch bioinformatische Methoden vorausgesagt werden. Zudem wurden sowohl das Rpf1- als auch das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* im Kulturüberstand des *C. glutamicum*-Stammes RES167 nachgewiesen und aus aufkonzentrierten Kulturüberständen derjenigen Stämmen, die die entsprechenden Gene verstärkt exprimieren, aufgereinigt. Ferner gibt es Hinweise, dass einige Rpf-Proteine in der Cytoplasmamembran verankert sein könnten. Das RpfB-Protein aus *M. tuberculosis* trägt zum Beispiel eine Membran-Lipoprotein-Lipid-Bindestelle und das Rpf-Protein aus *M. luteus* besitzt an seinem C-terminalen Ende ein sog. LysM-Modul (Mukamolova *et al.*, 2002a; 2002b), das als Peptidoglykan-bindende Einheit fungieren könnte (Bateman und Bycroft, 2000). Mit verschiedenen bioinformatischen Methoden durchgeführte Analysen der Aminosäuresequenzen beider Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* konnten allerdings keine Ähnlichkeiten zu derartigen Protein-Domänen nachweisen. Dennoch zeigten immunologische Experimente unter Benutzung eines Rpf2-spezifischen

Antikörpers deutlich, dass das Rpf2-Protein an der Zelloberfläche von *C. glutamicum* lokalisiert ist. Die Kopplung von Rpf2 an die Zelloberfläche muß folglich durch einen alternativen Mechanismus realisiert sein. Ein Grund hierfür mag der spezielle strukturelle Aufbau der Zellhülle von Corynebakterien sein, die sich aus der generell vorkommenden Cytoplasmamembran, einem Peptidoglycan-Arabinogalactan-Polymer, der sogenannten Mycomembran und einer äußeren Lipidschicht, die als *outer layer* bezeichnet wird, zusammensetzt (Bayan *et al.*, 2003). Es ist ausserdem bemerkenswert, dass das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* sowie das Rpf-Protein aus *M. luteus* nicht nur auf der Oberfläche aktiv wachsender Zellen nachgewiesen werden konnten, sondern auch in entsprechenden Kulturüberständen vorhanden sind. Möglicherweise liegen diese Proteine also zunächst mit der Zelloberfläche verbunden vor und werden erst anschließend in das umgebende Medium abgegeben (Mukamolova *et al.*, 2002a). Ob Rpf-Proteine ihre Funktion ausschließlich in direkter Nähe zur Zelloberfläche oder auch frei diffusibel im umgebenden Medium erfüllen können (Mukamolova *et al.*, 2002a; 2002b), lässt sich aus den Befunden für die Rpf-Proteine aus *C. glutamicum*, die sowohl auf der Zelloberfläche (Rpf2) als auch im Medium (Rpf1 und Rpf2) nachgewiesen wurden, nicht ableiten.

Die experimentellen Befunde hinsichtlich der Synthese und der Sekretion der Rpf-Proteine in *C. glutamicum* sind in Abbildung V.01 zusammenfassend dargestellt.

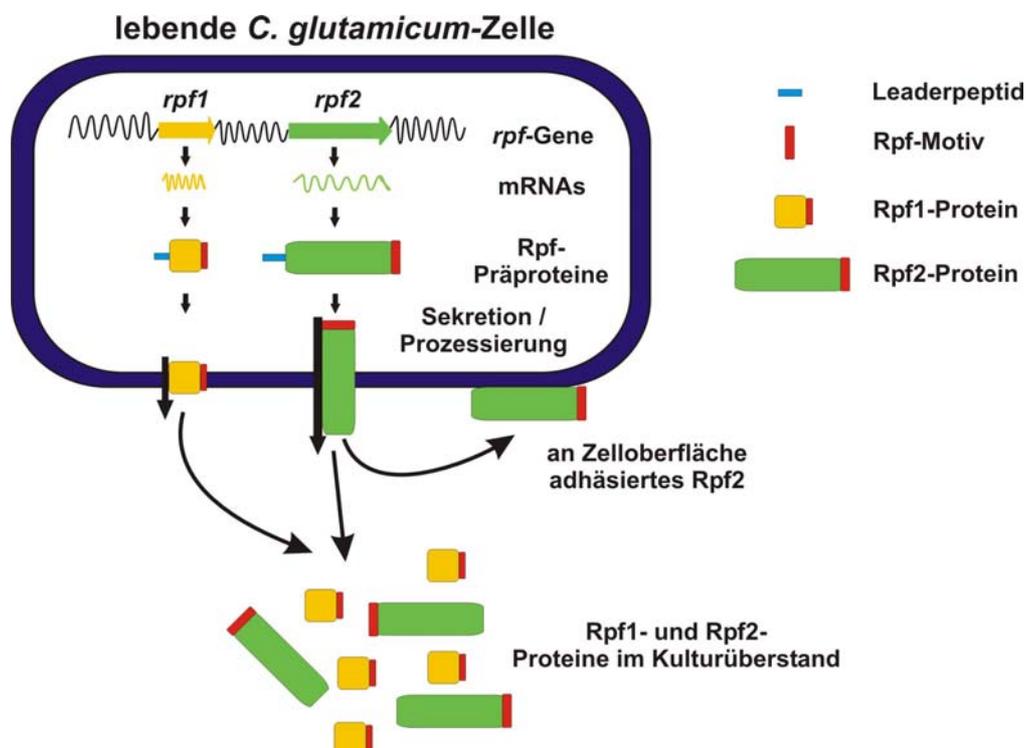


Abb.V.01: Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde bezüglich der Synthese und Sekretion von Rpf-Proteinen durch *C. glutamicum*-Zellen. Die Rpf-Proteine werden zunächst als Präproteine synthetisiert und anschließend prozessiert und sekretiert. Das Rpf2-Protein konnte durch immunologische Tests im Kulturüberstand und auf der Zelloberfläche von *C. glutamicum*-Zellen nachgewiesen werden.

2 Das Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* kommt in verschiedenen Formen vor

Bei einer verstärkten Expression des *rpf2*-Gens aus *C. glutamicum* wurden im Kulturüberstand des entsprechenden Stammes mehrere verstärkt vorkommende Proteine als Rpf2-Formen identifiziert. Zwei von ihnen weisen in SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen verglichen mit der erwarteten molekularen Masse des prozessierten Rpf2-Proteins reduzierte Mobilitäten auf, die aus posttranslationalen Modifizierungen resultieren. Andere Rpf2-Formen bandieren signifikant unterhalb der erwarteten Größe, stellen also vermutlich verkürzte Formen des Rpf2-Proteins dar. Höchstwahrscheinlich finden die zu den Verkürzungen führenden proteolytischen Spaltungen im N-terminalen Teil des Rpf2-Moleküls statt, da die den C-Terminus repräsentierenden Peptide, die auch das hochkonservierte Rpf-Motiv beinhalten, durch MALDI-TOF Massenspektrometrie in sämtlichen, also auch den verkürzten Rpf2-Formen, identifiziert werden konnten. Die verkürzten Rpf2-Formen könnten weiterhin funktional sein, da Analysen mit einem *in vitro* synthetisierten Rpf-Peptid, das nur das hochkonservierte Rpf-Motiv von *M. luteus* umfasste, zeigten, dass das Wachstum von *M. luteus*-Zellen auch von diesem Peptid positiv beeinflusst wird (Mukamolova *et al.*, 2002a). Folglich ist der N-Terminus des Rpf-Proteins aus *M. luteus* offensichtlich in Bezug auf die wachstumsfördernde Wirkung des Proteins nicht funktionsrelevant. Es wird angenommen, dass die Aktivität der funktionalen Rpf-Domäne aus einer Interaktion mit einem bisher noch nicht identifizierten Rezeptormolekül, das auf der Zelloberfläche von *M. luteus* lokalisiert ist, resultiert (Mukamolova *et al.*, 2002a).

Durch proteinanalytische Methoden gelang der Nachweis, dass die Rpf2-Formen mit größeren als der für das prozessierte Protein berechneten molekularen Masse glykosyliert sind. In vielen Fällen besitzen glykosylierte Proteine tatsächlich ein anomales Laufverhalten bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (Benz und Schmidt, 2002). Die reduzierte Mobilität der beiden Rpf2-Formen könnte somit aus verschiedenen Glykosylierungszuständen resultieren.

Mit GC/MS-Analysen wurden die Hexosen Mannose und Galaktose als zwei Bestandteile des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung identifiziert. Beide Zucker stellen typische Bestandteile von Glykosylierungen prokaryontischer Proteine dar. Mannose kommt in einer Vielzahl von Bakterien als sog. Verbindungseinheit (*linking unit*) zwischen Protein und Zucker vor. In *Streptomyces lividans* (Sandercock *et al.*, 1994; Ong *et al.*, 1994) und in *M. tuberculosis* (Dobos *et al.*, 1996) ist Mannose als erster Zucker der Oligosaccharidkette an einen Threoninrest des jeweiligen Glykoproteins gebunden. Galaktose kommt in ähnlicher Funktion z. B. in Cellulasen aus *Streptomyces lividans* (Ong *et al.*, 1994) und *Cellulomonas fimi* (Gilkes *et al.*, 1988; Sandercock *et al.*, 1994; Ong *et al.*, 1994) vor.

Die experimentellen Befunde hinsichtlich der verschiedenen im Kulturüberstand vorkommenden Rpf2-Formen sind zusammenfassend in Abbildung V.02 dargestellt.

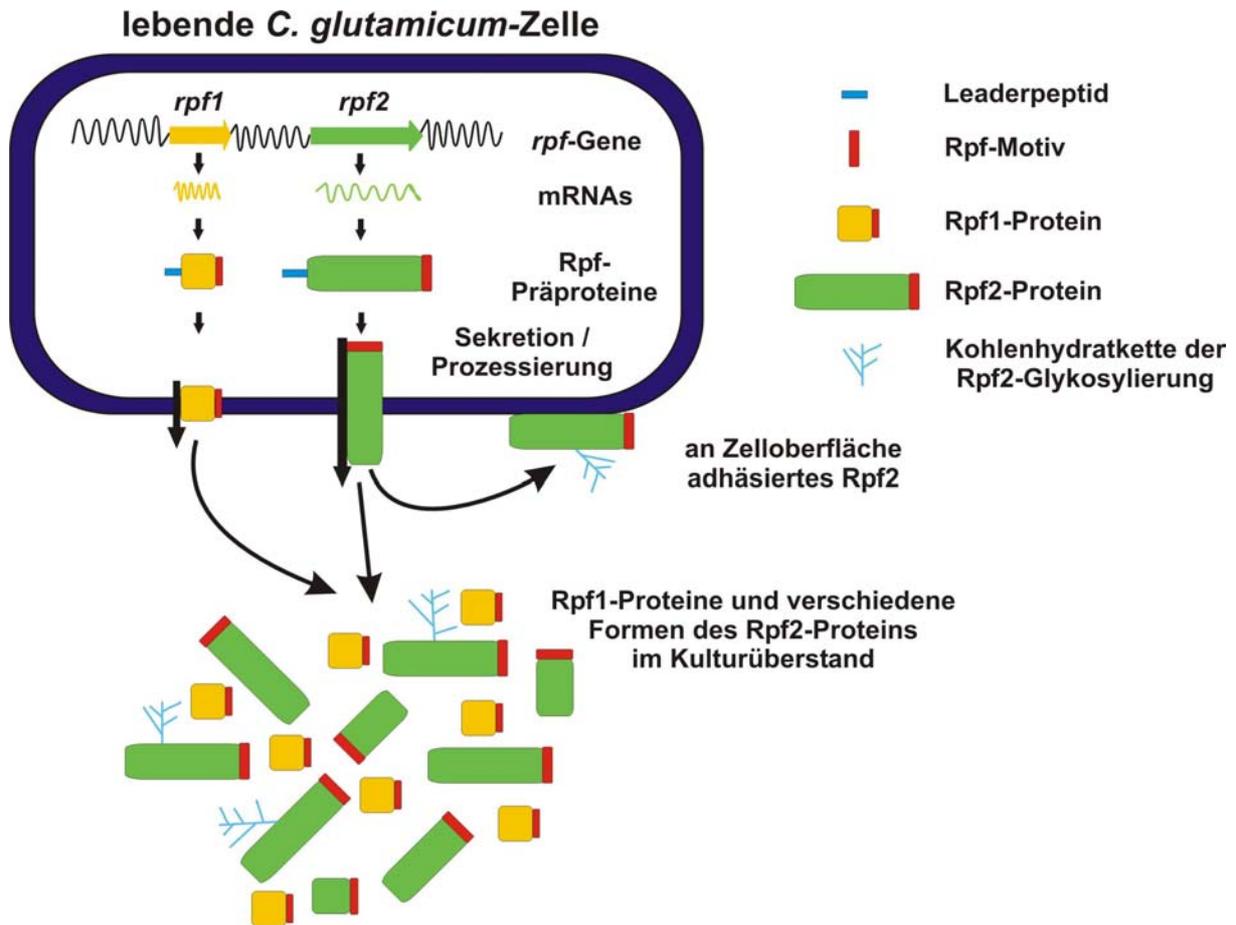


Abb.V.02: Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde im Hinblick auf die auftretenden Formen des Rpf2-Proteins. Es kommt im Kulturüberstand von *C. glutamicum* sowohl in mehreren verkürzten als auch in glykosylierten Formen vor.

Die Rpf2-Aminosäuresequenz besitzt eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (Asn₁₁₂-Val₁₁₃-Thr₁₁₄) innerhalb eines Peptids, dessen Masse bei *peptide mass fingerprint*-Analysen nicht identifiziert werden konnte (vgl. Abb.IV.13). N-Glykosylierungen finden nur an definierten Aminosäuremotiven der Konsensus-Sequenz Asn-Xaa-Ser/Thr statt (Schäffer *et al.*, 2001). In prokaryontischen Proteinen wurden bisher keine von ihr abweichenden N-Glykosylierungsstellen identifiziert. Allerdings können O-Glykosylierungen für das Rpf2-Protein ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Für diesen Glykosylierungstypus kommen grundsätzlich alle in der Primärstruktur vorhandenen Serin-, Threonin- und eventuell sogar Tyrosinreste in Betracht, da O-Glykosylierungsstellen im Gegensatz zu N-Glykosylierungsstellen kein definiertes Sequenzmotiv aufweisen (Lis und Sharon, 1993; Schäffer *et al.*, 2001).

Neutrale makromolekulare Kohlenhydrate, bestehend aus Glukose, Mannose und Arabinose, wurden bislang hauptsächlich bei Analysen der molekularen Zusammensetzung

des *outermost layers* von *C. glutamicum* identifiziert (Puech *et al.*, 2001). Die kovalent an das Rpf2-Protein gebundenen Zucker könnten also mit diesen Komponenten des *outermost layers* interagieren bzw., was vermutlich wahrscheinlicher ist, aus der *C. glutamicum*-Zelloberfläche herausragen, wie es bereits für *surface layer*-Glykoproteine aus Archaeobakterien und *Bacillaceae* (Schäffer und Messner, 2001) bekannt ist. In Analogie zu den verschiedenen Funktionen, die für Proteinglykosylierungen postuliert werden (Benz und Schmidt, 2002) kann auch für die Rpf2-Glykosylierung davon ausgegangen werden, dass sie für die Aufrechterhaltung der Proteinkonformation, die Erhöhung der Rpf2-Stabilität, den Schutz vor proteolytischem Abbau oder für die Erkennung von Signalen in der bakteriellen Kommunikation von Bedeutung ist.

3 Die *rpf*-Gene sind auch in Kombination für *C. glutamicum* nicht essentiell

Gene replacement-Strategien führten zur Konstruktion von *C. glutamicum*-Stämmen, die definierte Deletionen im *rpf1*- und im *rpf2*-Gen tragen. Auch in *M. tuberculosis* lassen sich einzelne *rpf*-Gene mutieren, ohne dass die Lebensfähigkeit der resultierenden Stämme beeinträchtigt wird (Tufariello *et al.*, 2004). Die Ausschaltung jedes der fünf *rpf*-ähnlichen Gene in *M. tuberculosis* Erdmann führte zu lebensfähigen Mutanten, die im Vergleich zu einem *M. tuberculosis* Erdmann-Wildtypstamm sowohl *in vitro* als auch in Mausorganen nach einer Aerosol-Infektion kein verändertes Wachstum zeigten. Mehrfachmutanten der mycobakteriellen *rpf*-Gene wurden in der genannten Studie jedoch nicht analysiert.

Die Beobachtung, dass in *C. glutamicum* beide *rpf*-Gene gleichzeitig deletierbar sind, steht im Gegensatz zur Essentialität des singulären *rpf*-Gens in *M. luteus*, welches ohne Komplementation durch eine zweite Genkopie nicht ausgeschaltet werden kann (Mukamolova *et al.*, 2002a). Im Gegensatz zu *M. luteus* sind *C. glutamicum*-Zellen somit offenbar in der Lage, auch ohne das Vorhandensein jeglicher Rpf-Proteinen zu wachsen. Möglicherweise stellt *M. luteus* in der Gruppe derjenigen Organismen, die Rpf-Proteine synthetisieren können, also insofern eine Besonderheit dar, als dass bis jetzt nur für *M. luteus* ein singuläres und außerdem essentielles *rpf*-Gen nachgewiesen wurde. Alle anderen Vertreter dieser Gruppe besitzen jeweils zwei bis fünf Gene, die für Proteine mit einem Rpf-Motiv kodieren.

4 Die gleichzeitige Deletion beider *rpf*-Gene in *C. glutamicum* kann zu beeinträchtigtem Wachstum führen

Wachstumsanalysen deuten daraufhin, dass das Rpf1- und das Rpf2-Protein in *C. glutamicum* sehr ähnliche, eventuell sogar identische Funktionen übernehmen. Weder *rpf1*- noch *rpf2*-Einzelmutanten zeigten in den durchgeführten Wachstumsanalysen einen veränderten Phänotyp. Auch für *M. tuberculosis* wird aufgrund eines fehlenden Phänotyps der *rpf*-Einzelmutanten davon ausgegangen, dass die fünf *rpf*-ähnlichen Gene funktional redundant sind, also der Verlust eines Rpf-Proteins durch mindestens eines der anderen kompensiert werden kann (Tufariello *et al.*, 2004). Zudem weisen sämtliche *rpf*-ähnlichen Gene in *M. tuberculosis* zwar keine identischen aber doch überlappende Expressionsprofile über den Wachstumsverlauf der untersuchten Kulturen auf, was nach Ansicht der Autoren ebenfalls eine funktionale Redundanz der fünf Rpf-Proteine nahelegt (Tufariello *et al.*, 2004).

In *C. glutamicum* konnte lediglich bei gleichzeitigem Fehlen beider Rpf-Proteine unter bestimmten Anzuchtbedingungen, wie der Überimpfung eines kleinen Inokulums bzw. dem Transfer der Zellen aus einer langandauernden Stationärphase, ein beeinträchtigtes Wachstum festgestellt werden. Aus den dargestellten Wachstumstests (vgl. Abschnitt IV.8 und IV.9) lassen sich zwei charakteristische Eigenschaften der Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* ableiten:

1. Die Rpf-Proteine besitzen eine Bedeutung für das Wachstum von *C. glutamicum*-Zellen nach Überimpfen eines kleinen Inokulums.
2. Sie beeinflussen das Wachstum von über einen längeren Zeitraum gelagerten *C. glutamicum*-Zellen.

Diese für die Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* abgeleiteten physiologischen Funktionen ähneln Beobachtungen für die Rpf-Proteine aus *M. luteus* und *M. tuberculosis*. Mukamolova *et al.* konnten bereits 1998 für *M. luteus* nachweisen, dass das Rpf-Protein bei temporär nicht kultivierbaren Zellen, also Zellen, die sich im sogenannten *dormant-state* befinden und aus lagzeitinkubierten Kulturen stammen, die erneute Initiation eines normalen Wachstums (*resuscitation*) und eine erneute Koloniebildung fördert (Mukamolova *et al.*, 1998). Auch die fünf Rpf-ähnlichen Proteine aus *M. tuberculosis* besitzen, als Histidin-Fusionsproteine in *E. coli*-Zellen heterolog exprimiert und anschließend aufgereinigt, bereits in picomolarer Konzentration eine wachstumsstimulierende Wirkung auf *M. bovis* BCG-Kulturen, die sich in einer langandauernden Stationärphase befinden (Mukamolova *et al.*, 2002b).

Zudem war bei *M. luteus*-Kulturen mit geringen Startzellichten eine deutliche Abhängigkeit des Zellwachstums vom Rpf-Protein festzustellen. Enthielten Kulturen in Succinat-Minimalmedium bei Beginn der Anzucht weniger als 10^5 Zellen \times ml⁻¹, war makros-

kopisch erst dann ein Wachstum von *M. luteus* erkennbar, wenn Rpf von außen zugesetzt wurde (Mukamolova *et al.*, 1999). Aus diesen und weiteren Befunden wurde gefolgert, dass das Rpf-Protein aus *M. luteus* einen essentiellen Wachstumsfaktor darstellt, der eine Signalwirkung für weitere in der Kultur befindliche *M. luteus*-Zellen besitzt (Mukamolova *et al.*, 2002a). Die Autoren gehen davon aus, dass das konservierte Rpf-Motiv des Proteins von einem vermutlich auf der Zelloberfläche von *M. luteus* lokalisierten Rezeptor, der bisher allerdings weder identifiziert noch charakterisiert werden konnte, erkannt und so eine Signaltransduktion in die Zelle realisiert wird (Mukamolova *et al.*, 2002a).

Die experimentellen Befunde hinsichtlich der Deletierbarkeit der *rpf*-Gene in *C. glutamicum* und die daraus resultierenden phänotypischen Veränderungen sind in Abbildung V.03 graphisch dargestellt.

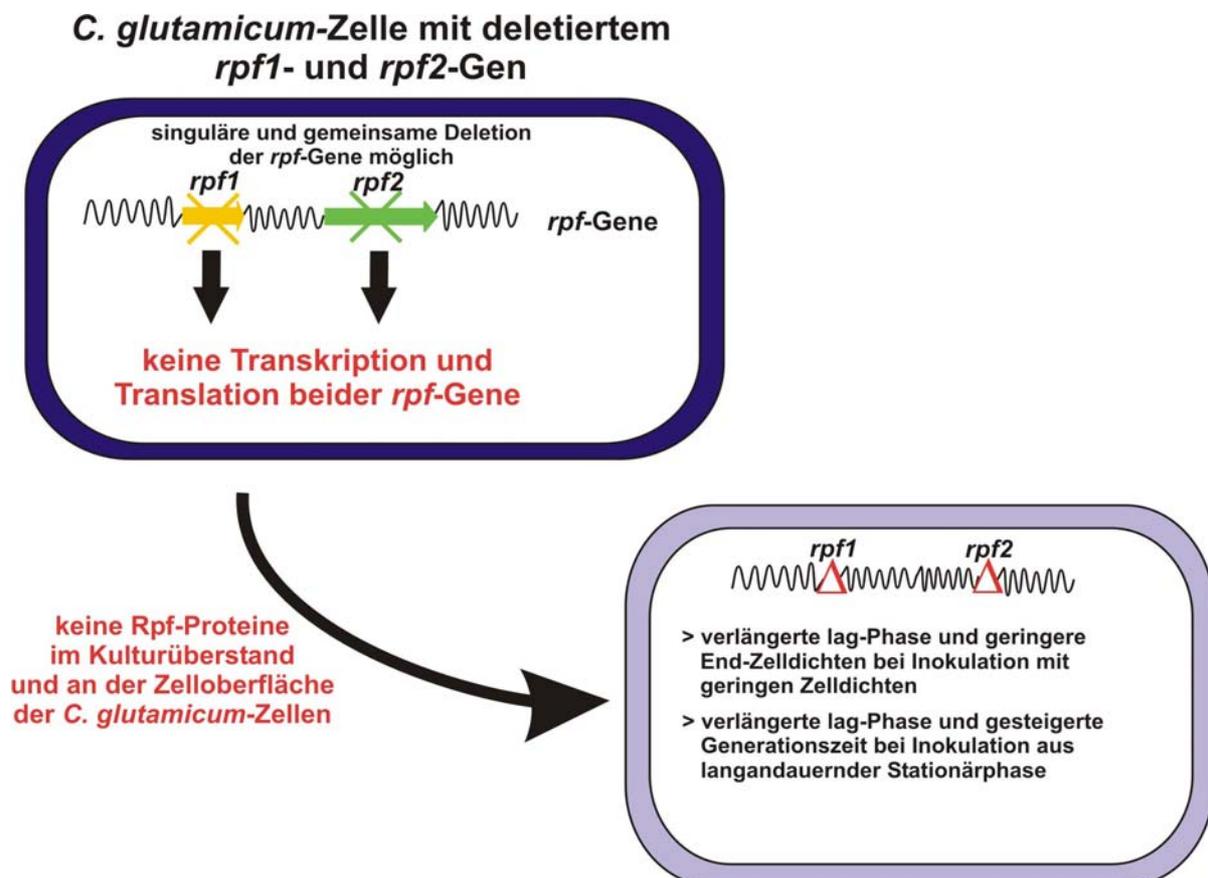


Abb.V.03: Graphische Darstellung der Bedeutung der Rpf-Proteine für das Wachstum von *C. glutamicum*-Zellen. Werden beide *rpf*-Gene gleichzeitig deletiert, zeigen *C. glutamicum*-Zellen bei Inokulation mit geringen Zelldichten bzw. nach Transfer aus einer langandauernden Stationärphase ein beeinträchtigt Wachstum.

In einer erst kürzlich erschienenen Publikation wurde allerdings aufgrund umfangreicher Berechnungen mit verschiedenen Bioinformatik-Werkzeugen eine Vorhersage für die Struktur der Rpf-Domäne publiziert, die auf eine Faltung wie bei Lysozymen des c-Typus hindeutet (Cohen-Gonsaud *et al.*, 2004). Obwohl bisher experimentelle Belege für eine ent-

sprechende enzymatische Aktivität der Rpf-Domäne fehlen und die Homologie zwischen Rpf-Proteinen und Lysozymen zu gering ist, um sicher davon ausgehen zu können, dass die Proteine ähnliche Funktionen besitzen, ist es aufgrund dieser Befunde dennoch denkbar, dass die Rpf-Proteine möglicherweise mit einem weiteren Moleküle aus dem Kulturüberstand oder einer Komponente der Zellwand interagieren und erst dadurch eine Signalwirkung initiieren. Sie also möglicherweise nicht selbst das eigentliche Signalmolekül sind.

5 Der Kulturüberstand logarithmisch wachsender *C. glutamicum*-Zellen enthält einen wachstumbeeinflussenden Faktor

Die erfolgreiche Konstruktion einer *rpf1-rpf2*-Doppelmutante war zudem die Voraussetzung für die Charakterisierung einer weiteren Eigenschaft der Rpf-Proteine aus *C. glutamicum*, die der *resuscitation-promoting factor* aus *M. luteus* vermutlich nicht besitzt. Durch Versuche mit Kulturüberständen logarithmisch wachsender *C. glutamicum*-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese bei Zugabe zu einer mit langzeitinkubierten *C. glutamicum*-Zellen neu angeimpften Kultur, eine lag-Phasen-verkürzende Wirkung auf alle getesteten Stämme mit Ausnahme der Doppeldelensionsmutante aufweisen. Diese ist nicht in der Lage, auf die Zugabe des Kulturüberstands zu reagieren und benötigt eine mit dem Kontrollansatz vergleichbare Zeitspanne, um eine wahrnehmbare Trübung des Mediums hervorzurufen.

Interessanterweise sind auch Überstände von sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kulturen der *rpf*-Doppelmutante in der Lage, die apparente lag-Phase von langzeitgelagerten *C. glutamicum*-Zellen signifikant zu verkürzen. Da diese Überstände nachweislich keine Rpf-Proteine enthalten, scheint der wachstumsfördernde Effekt folglich von mindestens einer weiteren, bisher uncharakterisierten Substanz im Kulturüberstand von *C. glutamicum*-Zellen verursacht zu werden. Darüberhinaus muß der wachstumsfördernde Effekt auch vom Vorhandensein mindestens eines Rpf-Proteins abhängen, da die lag-Phase der *rpf*-Doppelmutante MH28 generell nicht durch die Zugabe von Kulturüberständen beeinflussbar ist. Es liegt also nahe, dass eine funktionelle Kopplung zwischen den Rpf-Proteinen und einer weiteren wachstumsfördernden Substanz besteht.

Sun und Zhang (1999) haben bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein hitzestabiles Molekül geringer molekularer Masse beschrieben, das kleinen Inokula des *M. tuberculosis*-Stammes H37Ra erleichtert, in frischem Medium anzuwachsen und das den Anteil von lebenden Zellen in gealterten Kulturen erhöht. Diese Aktivität korrelierte mit dem Vorkommen bestimmter Phospholipide, wie z. B. Phosphatidylserin oder Phosphatidylcholin und dem Vorhandensein des 8 kDa großen mycobakteriellen Proteins Rv1174c (Zhang *et al.*, 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass drei synthetische Peptide, die jeweils verschie-

dene Teile dieses Proteins repräsentieren, bereits in picomolaren Konzentrationen wachstumsfördernd sind. Allerdings kann ein zu Rv1174c ähnliches Protein als wachstumsfördernder Faktor für *C. glutamicum* ausgeschlossen werden, da die Gesamtgenomsequenz nachweislich keine Kodierregion für ein entsprechendes Protein besitzt.

6 Ein Modell für eine auf mehreren Komponenten basierende interzelluläre Kommunikation von *C. glutamicum*

Die aus dieser Arbeit resultierenden Ergebnisse weisen für beide von *C. glutamicum* synthetisierten Rpf-Proteine eindeutig nach, dass sie, ähnlich wie die Rpf-Proteine aus *M. luteus* und *M. tuberculosis*, für das Anwachsen einer neu inokulierten Kultur unter bestimmten Bedingungen, etwa bei einer geringen Startzelldichte bzw. bei der Überimpfung aus einer langandauernden Stationärphase, von Bedeutung sind. Im Gegensatz zum Rpf-Protein aus *M. luteus*, dem eine Funktion als direkt wirkendes Signalmolekül (bzw. direkt wirkender Wachstumsfaktor) zugeschrieben wird (Mukamolova *et al.*, 2002a), scheint der Wirkmechanismus der Rpf-Proteine in *C. glutamicum* jedoch deutlich komplexer zu sein.

Die Beobachtung, dass auch Kulturüberstände einer *rpf*-Doppelmutante auf Zellen die mindestens eines der Rpf-Proteine synthetisieren eine lag-Phasen-verkürzende Wirkung besitzen, diese jedoch nicht auf Zellen ausüben können, die keines der Rpf-Proteine produzieren, legt eine Interaktion der Rpf-Proteine mit einer weiteren (unbekannten) Substanz ausserhalb der Zellen nahe.

In Abbildung V.04 ist ein mögliches Modell für eine auf den Rpf-Proteinen und einer weiteren wachstumsfördernden Substanz basierende interzelluläre Kommunikation gezeigt, die schließlich für eine lag-Phasenverkürzung der Zielzellen sorgt. Werden aus einer langandauernden Stationärphase stammende *C. glutamicum*-Zellen, die mindestens eines der Rpf-Proteine synthetisieren können, in frisches Medium überimpft und diesem sterilfiltrierter Kulturüberstand einer *C. glutamicum*-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase zugesetzt, treffen die sekretierten Rpf-Proteine mit einer aus dem Kulturüberstand stammenden, weiteren wachstumsfördernden Substanz zusammen. Vermutlich sorgt erst diese, wahrscheinlich noch vor Erkennung durch einen möglichen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen stattfindende Interaktion für die bei *C. glutamicum* beobachtete Verkürzung der lag-Phase.

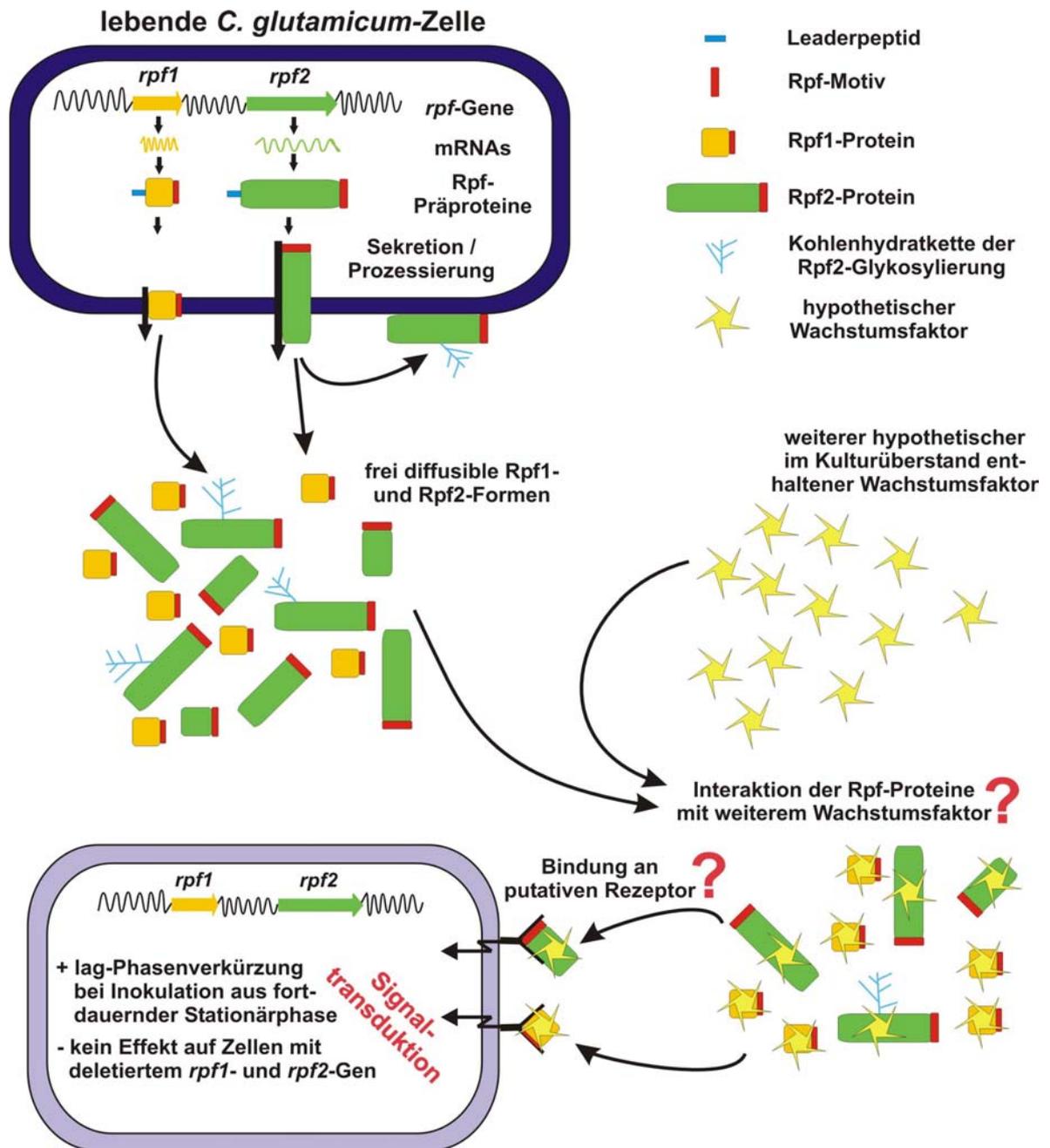


Abb.V.04: Modell für eine lag-Phasen-verkürzende Wirkung der Rpf-Proteine im Zusammenspiel mit einer weiteren wachstumsbeeinflussenden Substanz im Kulturüberstand von *C. glutamicum*-Zellen. Werden *C. glutamicum*-Zellen aus einer langandauernden Stationärphase in frisches Medium überimpft, bewirkt die Zugabe von sterilfiltriertem Kulturüberstand logarithmisch wachsender *C. glutamicum*-Zellen bei Vorhandensein von Rpf-Proteinen eine signifikante Verkürzung der lag-Phase.

Mit dem Rpf2-Protein aus *C. glutamicum* wurde darüber hinaus das erste Beispiel für ein glykosyliertes Protein identifiziert, das an der interzellulären Kommunikation zwischen Bakterienzellen beteiligt ist. Ob die Glykosylierung für die Funktionalität des Rpf2-Proteins unabdingbar ist, an der Verankerung des Proteins auf der Zelloberfläche beteiligt ist oder aber auch unglykosylierte Rpf2-Formen eine Funktion in der Kommunikation zwischen *C. glutamicum*-Zellen übernehmen können, muß in weiterführenden Analysen untersucht wer-

den. Ebenso sind Ort, Mechanismus und beteiligte Komponenten der Rpf2-Glykosylierung in *C. glutamicum* noch völlig unbekannt. Auch die Frage, ob das Rpf1- und Rpf2-Protein generell äquivalente Funktionen besitzen oder z. B. zellgebundene Formen des Rpf2-Proteins unter bestimmten Bedingungen andere Funktionen wahrnehmen können als freidiffusible Rpf1-Moleküle, läßt sich mit den bisherigen Erkenntnissen nicht endgültig beantworten.

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten und charakterisierten *rpf*-Mutanten von *C. glutamicum* liefern aber erste, eindeutige Hinweise auf eine interzelluläre Kommunikation von *C. glutamicum*-Zellen, die durch Signalmoleküle realisiert ist. Sie können darüberhinaus eine wertvolle Basis bilden, um die offensichtlich komplexen Funktionen und Wirkmechanismen der Rpf-Proteine in *C. glutamicum* eingehender analysieren und besser verstehen zu können. Die hier präsentierten Ergebnisse führen unweigerlich zu neuen interessanten Fragen hinsichtlich der genauen physiologischen Bedeutung der Rpf-Proteine aus *C. glutamicum* und der zusätzlichen, noch nicht genauer charakterisierten Substanz im Kulturüberstand von *C. glutamicum*-Zellen, die ebenfalls für die interzelluläre Kommunikation von *C. glutamicum* eine Rolle zu spielen scheint.

Sicherlich sind weitere strukturelle und biochemische Analysen der Rpf-Proteine und der Rpf2-Glykosylierung sowie Untersuchungen im Hinblick auf weitere wachstumsbeeinflussende Faktoren im Kulturüberstand von *C. glutamicum*-Zellen notwendig, will man die interzelluläre Kommunikation und ihre Mechanismen in *C. glutamicum* im Detail verstehen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD** (1996) Molecular biology of the cell. 3. edition. Garland, New York
- Altschul SF, Madden TL, Schaeffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Amann E, Ochs B, Abel KJ** (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69:301-315
- Ausloos P, Clifton CL, Lias SG, Mikaya AI, Stein SE, Tchekhovskoi DV, Sparkman OD, Zaikin V, Zhu D** (1999) The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library. *J Am Mass Spectrom* 10:770-781
- Bardonnet N, Blanco C** (1991) Improved vectors for transcriptional signal screening in corynebacteria. *FEMS Microbiol Letters* 84: 97-102
- Barksdale L** (1970) *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev* 34:378-422
- Bateman A, Bycroft M** (2000) The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol* 299:1113-1119
- Bayan N, Houssin C, Chami M, Leblon G** (2003) Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J Biotechnol* 104:55-67
- Benz I, Schmidt A** (2002) Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 45:267-276
- Bonnassie S, Burini JF, Oreglia J, Trautwetter A, Patte JC, Sicard AM** (1991) Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactoferentum* by electrotransformation. *J Gen Microbiol* 136:2107-2112
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Callard R, Gearing A** (1994) The Cytokine Facts Book. Academic Press, London UK
- Cardenas RF, Martin JF, Gill JA** (1991) Construction and characterization of promoter-probe vectors for corynebacteria using the kanamycin-resistance reporter gene. *Gene* 98:117-121
- Clewell DB** (1993) Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73:9-12
- Cohen-Gonsaud M, Keep NH, Davies AP, Ward J, Henderson B, Labesse G** (2004) Ressuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. *Trends in Biochem Sci* 29:7-10
- Collins MD, Godfellow M, Mikinnin DE** (1982) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J Gen Microbiol* 128:129-149
- Collins MD Cummins CS** (1986) Genus *Corynebacterium* *Lehmann and Neumann* 1896. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe, ME, Holt, JG (eds.), pp. 1266-1276. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Davis MJ, Gillespie AGJr, Vidaver AK, Harris RW** (1984) *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodotis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugar cane and Bermudagrass stunting disease. *Int J Syst Bacteriol* 34:107-117
- Deb JK Nath N** (1999) Plasmids of corynebacteria. *FEMS Microbiol Lett* 175:11-20

- Dobos KM, Khoo KH, Swiderek KM, Brennan PJ, Belisle JT** (1996) Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 178:2498-2506
- Dunny GM, Leonhard BAB** (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 51:527-564
- Dusch N, Pühler A, Kalinowski J** (1999) Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 65:1530-1539
- Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H** (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102:93-98
- Farrell RE Jr** (1993) *RNA Methodologies*. Academic Press, New York.
- Fudou R, Jojima Y, Seto A, Yamada K, Kimura E, Nakamatsu T, Hiraishi A, Yamanaka S** (2002) *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1127-1131
- Funke G., Larsson PA, Collins MD** (1995) Heterogeneity within human-derived centers for disease control and prevention (CDC). Coryneform group AWF-1-like bacteria and description of *Corynebacterium aureus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45:735-739
- Gilkes NR, Warren RA, Miller Jr RC, Kilbum DG** (1988) Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *J Biol Chem* 263:10401-10407
- Greenberg EP, Winans S, Fuqua C** (1996) Quorum sensing by bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:727-751
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4645-4649
- Haynes JA, Britz ML** (1989) Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol Lett* 61:329-334
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C** (1993) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5011-5015
- Hermann T, Pfefferle W, Baumann C, Busker E, Schaffer S, Bott M, Sahm H, Dusch N, Kalinowski J, Pühler A, Bendt AK, Krämer R, Burkovski A** (2001) Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* 22:1712-1723
- Hermann T** (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* 104:155-172
- Hodgson** (1998) LION and Degussa apply genomics to fermentation. *Nat Biotechnol* 16:715
- Hoppe B Martens J** (1983) Aminosäuren – Bausteine des Lebens. *Chemie in unserer Zeit* 17: 41-53
- Horton RM** (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis - SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol* 3:93-99

- Hüser AT, Becker A, Brune I, Dondrup M, Kalinowski J, Plassmeier J, Pühler A, Wiegräbe I, Tauch A** (2003) Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J Biotechnol*, 106:269-286
- Ikeda M** (2003) Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 79:1-35
- Ikeda M, Nakagawa S** (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:99-109
- Jäger W, Schäfer A, Pühler A, Labes G, 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
- Jäger W, Peters-Wendisch PG, Kalinowski J, Pühler A** (1995) Isolation of insertion elements from gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Rhodococcus* strains using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene as a positive selection marker. *FEMS Microbiol Lett* 126:1-6
- Jones D, Collins MD** (1986) Section 15. Irregular, nonsporing gram-positive rods. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt GH (eds), pp. 1261-1434. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Kaiser D, Losick R** (1993) How and why bacteria talk to each other. *Cell* 73:873-885
- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Hartmann M, Huthmacher K, Krämer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey DA, Rupp O, Rückert C, Sahm H, Wendisch, VF, Wiegräbe I, Tauch A** (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* 104:5-25
- Kaprelyants AS, Kell DB** (1993) Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl Env Microbiol* 59:3187-3196
- Kaprelyants AS, Kell DB** (1996) Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends Microbiol* 4:237-242
- Karas M, Hillenkamp F** (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2391
- Katsumata R, Ozaki A, Oka T, Furuya A** (1984) Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J Bacteriol* 159:306-11
- Kell DB, Young M** (2000) Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Opin Microbiol* 3:238-243
- Kell DB, Kaprelyants AS, Grafen A** (1995) On pheromones, social behaviour and the function of secondary metabolism in bacteria. *Trends Ecol Evol* 10:126-129
- Khyse-Anderson J** (1984) Electrophoretic transfer of multiple Genes: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* 10:203-209
- Kinoshita S, Udaka S, Shinomo M** (1957) Studies on amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* 3:193-205
- Kircher M, Leuchtenberger W** (1998) Aminosäuren – ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie in unserer Zeit* 28:281-293
- Kirchner O, Tauch A** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* 104:287-299

- Kleerebezem M, Quadri LEM, Kuipers OP, de Vos WM** (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24:895-904
- Klose J** (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26: 231-243
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lazazzera BA, Grossman AD** (1998) The ins and outs of peptide signalling. *Trends Microbiol* 24:895-904
- Lee CW, Lucas S, Desomaceaud MJ** (1985) Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 26:201-205
- Leuchtenberger W** (1984) Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren. *Chemie für Labor und Betrieb* 6:278-285
- Leuchtenberger W** (1996) Amino acids - Technical production and use. In: Rehm, HJ, Reed, G, Pühler A, Stadler P (eds.), *Biotechnology*, vol. 6. VCH, Weinheim Germany, pp 465-502
- Lis H, Sharon N** (1993) Protein glycosylation - Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218:1-27
- Loos A, Glanemann C, Willis LB, O'Brien XM, Lessard PA, Gerstmeier R, Guillouet S, Sinskey AJ** (2001) Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 67:2310-2318
- Lottspeich F, Zorbach H** (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Martin JF** (1989) Molecular genetics of amino acid-producing corynebacteria. *Symp Soc Gen Microbiol* 44: 25-59
- McPherson RA** (1995) Evolution of polymerase chain reaction to a quantitative laboratory tool. *Clinical Chemistry* 41: 1065-1067
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A** (2003) GenDB – an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acid Res* 31:2187-2195
- Miwa K, Matsui K, Terabe N, Nakamori S, Sano K, Momose H** (1985) Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric Biol Chem* 48:2901-2903
- Morgenstern, B** (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* 15:211-218
- Morinaga Y, Tsuchiya M, Miwa K, Sano K** (1987) Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using the shuttle vector pEB003. *J Biotechnol* 5:305-312
- Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB** (1998) A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8916-8921
- Mukamolova GV, Kormer SS, Kell DB, Kaprelyants AS** (1999) Stimulation of the multiplication of *Micrococcus luteus* by an autocrine growth factor. *Arch Microbiol* 172:9-14
- Mukamolova GV, Turapov OA, Kazarin K, Telkov M, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M** (2002a) The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Mol Microbiol* 46:611-621

- Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M** (2002b) A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 46:613-635
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1-6
- O'Farrell PH** (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021
- Ogata K, Kinoshita S, Tsunoda T, Aida K** (1976) Microbial production of nucleic acid related substances. John Wiley, New York, N.Y.
- Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, Ando S, Yokoi H, Ochiai K, Ikeda, M** (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:217-223
- Ong E, Kilburn DG, Miller Jr RC, Warren RA**, (1994) *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *J Bacteriol* 176:999-1008
- Pearson WR, Lipman DJ** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS** (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567
- Pfefferle W, Möckel B, Bathe B, Marx A** (2003) Biotechnological manufacture of lysine. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 79:59-112
- Puech V, Chami M, Lemassu A, Lanéelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daffé M** (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* 147:1365-1382
- Pühler A, Kalinowski J** (1995) Molekulargenetik am Beispiel Aminosäure-produzierender Corynebakterien. *Biologie in unserer Zeit* 25: 221-229
- Rowlands RT** (1984) Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microbiol Technol* 6:3-10
- Sahm H, Eggeling L** (1999) D-pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl Environ Microbiol* 65:1973-1979
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY
- Sandercock LE, McLeod AM, Ong E, Warren RA** (1994) Non-S-layer glycoproteins in eubacteria. *FEMS Microbiol Lett* 118-1-7
- Sandmann G** (1994) Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem* 223: 7-24
- Santamaria RI, Gil JA, Mesas J, Martin JF** (1984) Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J Gen Microbiol* 130:2237-2246
- Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ** (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48:77-84

- Schäfer A, Kalinowski J, Simon R, Seep-Feldhaus AH, Pühler A** (1990) High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol* 172:1663-1666
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73
- Schäffer C, Messner P** (2001) Glycobiology of surface layer proteins. *Biochimie* 83:591-599
- Schäffer C, Graninger M, Messner P** (2001) Procaryotic glycosylation. *Proteomics* 1:248-261
- Schwarzer A, Pühler A** (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and gene replacement. *Bio/Technology* 9:84-87
- Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov MV, Mukamolova GV, Young M, Kell DB, Kaprelyants AS** (2002) Formation and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology* 148:1581-1591
- Sonnen H, Thierbach G, Kautz S, Kalinowski J, Schneider J, Pühler A, Kutzner HJ** (1991) Characterization of pGA1, a new plasmid from *Corynebacterium glutamicum* LP-6. *Gene* 107:69-74
- Staden, R.** (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5:233-241
- Stackebrandt E, Woese CR** (1981) The evolution of prokaryotes. In: *Molecular and cellular aspects of microbial evolution*. Carlile MJ, Collins, JF, Moseley BEB (eds.), pp. 1-31. Cambridge University Press, Cambridge
- Stephens K** (1986) Pheromones among the prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* 13:309-334
- Sun Z, Zhang Y** (1999) Spent culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra improves viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth. *J Bacteriol* 181:7626-7628
- Swift S, Bainton NJ, Winson MK** (1994) Gram-negative bacterial communication by N-acyl homoserine lactones: an universal language? *Trends Microbiol* 2:193-198
- Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J** (2002) Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* 45:362-367
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG** (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882
- Thomson JM, Parrott WA** (1998) pMECA: a cloning plasmid with 44 unique restriction sites that allows selection of recombinants based on colony size. *Biotechniques* 24: 922-924
- Tufariello, JAM, Jacobs Jr. WR, Chan J** (2004) Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun* 72:515-526
- Votyakova TV, Kaprelyants AS, Kell DB** (1994) Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. *Appl Env Microbiol* 60:3284-3291
- Wohlleben W, Muth G, Kalinowski J** (1993) Genetic engineering of gram positive bacteria. In: *Biotechnology*. Rehm HJ, Reed G, Pühler A, Stadler P (eds.), pp. 457-505. VCH, Weinheim, Germany
- Zhang Y, Yang Y, Wodds A, Cotter RJ, Sun Z** (2001) Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 284:542-547

VII ANHANG

1 Abbildungsverzeichnis

II.01	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>C. glutamicum</i>	2
II.02	Modell zur Darstellung des Übergangs aktiv wachsender Bakterienzellen in einen „schlafenden“-Zustand (<i>dormant state</i>) während einer ausgedehnten Stationärphase.	7
II.03	<i>Resuscitation</i> -Aktivität verschiedener Fraktionen einer Proteinaufreinigung aus Kulturüberstand logarithmisch wachsender <i>M. luteus</i> -Zellen	8
II.04	Einfluß des Rpf-Proteins aus <i>M. luteus</i> auf das Wachstum von <i>M. luteus</i> -Zellen in einer Succinatminimalmedium-Kultur bei Inkubation im Schüttelkolben	10
II.05	Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde für das <i>rpf</i> -Gen aus <i>M. luteus</i> und das von ihm kodierte Rpf-Protein.....	11
II.06	Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde für die Rpf-Proteine aus <i>M. tuberculosis</i> und der für sie kodierenden Gene.....	13
III.01	Schematische Darstellung des GeneSOEing.....	42
III.02	Schematische Darstellung des Integrations- bzw. Deletionsnachweises durch PCR	43
III.03	Schematische Darstellung der Bindung von zwei Histidinresten an die NI-NTA-Gruppe eines Agarosepartikels	50
IV.01	Abgeleitete Aminosäuresequenz des <i>rpf1</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i>	63
IV.02	Abgeleitete Aminosäuresequenz des <i>rpf1</i> -Gens aus <i>C. glutamicum</i>	64
IV.03	Konservierte Aminosäuresequenz des <i>resuscitation-promoting factor</i> (Rpf)-Motivs ..	65
IV.04	Phylogenetische Einordnung der Rpf-Proteine ohne Berücksichtigung des jeweiligen Rpf-Motivs.....	65
IV.05	Konservierte Genanordnung innerhalb der <i>rpf2</i> -Genregion von <i>C. glutamicum</i> , <i>C. efficiens</i> , <i>C. diphtheriae</i> , <i>S. coelicolor</i> , <i>M. tuberculosis</i> und <i>M. leprae</i>	66
IV.06	Konservierte Genanordnung innerhalb der <i>rpf1</i> -Genregion von <i>C. glutamicum</i> , <i>C. efficiens</i> , <i>C. diphtheriae</i> , <i>S. coelicolor</i> , <i>M. tuberculosis</i> und <i>M. leprae</i>	67
IV.07	Typischer Wachstumsverlauf einer <i>C. glutamicum</i> RES167-Kultur im Schüttelkolben in Minimalmedium MM1 mit 2% Glukose.....	68
IV.08	Transkriptionsanalyse der <i>rpf</i> -Gene aus <i>C. glutamicum</i> über den vollständigen Wachstumsverlauf einer Minimalmedium-Kultur im Schüttelkolben.....	69
IV.09	Nachweis polycistronischer Transkripte für Gene innerhalb der <i>rpf2</i> -Genregion in <i>C. glutamicum</i>	70
IV.10	Intrazelluläre Proteine verschiedener <i>C. glutamicum</i> -Stämme	72
IV.11	Proteine im Kulturüberstand verschiedener <i>C. glutamicum</i> -Stämme	72
IV.12	Aufreinigung der Rpf-Proteine aus <i>C. glutamicum</i>	73

IV.13	Identifizierung verschiedener Formen des Rpf2-Proteins in Überständen von <i>C. glutamicum</i> -Kulturen.....	74
IV.14	Identifikation des Rpf2-Proteins aus <i>C. glutamicum</i> durch <i>peptide mass fingerprints</i>	75
IV.15	Zweidimensionale SDS-PAGE von im Kulturüberstand des Stammes <i>C. glutamicum</i> RES167 enthaltenen Proteinen.....	76
IV.16	Schematische Darstellung des Nachweises von Glykokonjugaten mit dem DIG Glycan Detection Kit (Roche)	77
IV.17	Glykosylierung des Rpf2-Proteins aus <i>C. glutamicum</i>	78
IV.18	Identifizierung von Galaktose und Mannose als Bestandteile des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung durch GC/MS.....	79
IV.19	Lokalisierung des Rpf2-Proteins auf der Oberfläche von <i>C. glutamicum</i> RES167-Zellen.....	80
IV.20	Wachstum verschiedener <i>C. glutamicum</i> -Stämme nach Transfer kleiner Inokula in frisches LBG-Medium	81
IV.21	Wachstum der <i>C. glutamicum</i> Stämme MH26, MH27 und MH28 nach Inokulation aus einer langandauernden Stationärphase.....	83
V.01	Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde bezüglich der Synthese und Sekretion von Rpf-Proteinen durch <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	86
V.02	Zusammenfassende graphische Darstellung der experimentellen Befunde im Hinblick auf die auftretenden Formen des Rpf2-Proteins	88
V.03	Graphische Darstellung der Bedeutung der Rpf-Proteine für das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	91
V.04	Modell für eine lag-Phasenverkürzende Wirkung der Rpf-Proteine im Zusammenspiel mit einer vermuteten weiteren wachstumsbeeinflussenden Substanz im Kulturüberstand von <i>C. glutamicum</i> -Zellen.	94

2 Tabellenverzeichnis

II.01	Industrielle Einsatzgebiete coryneformer Bakterien	3
III.01	Verwendete Bakterienstämme	15
III.02	Verwendete Plasmide.....	16
III.03	Verwendete PCR-Primer	17
III.04	Zur Primärselektion verwendete Antibiotikakonzentrationen.....	19
III.05	In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Antikörper und Längenstandards.....	25
III.06	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien	26
III.07	In dieser Arbeit verwendete Materialien	28
III.08	In dieser Arbeit verwendete Kits	29
III.09	In dieser Arbeit verwendete Geräte	29
III.10	In dieser Arbeit verwendete Software.....	30
III.11	Zusammensetzung von Lösungen unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen für Trenngele bei der 1D-SDS-PAGE	52
III.12	Zusammensetzung des Sammelgels für die 1D-SDS-PAGE	52
III.13	Im XACQ-Programm eingestellte Parameter für MALDI-TOF-Analysen von Peptiden mit dem Biflex III-Spektrometer	59
IV.01	Die Zugabe von sterilem Kulturüberstand logarithmisch wachsender <i>C. glutami- cum</i> -Zellen beeinflusst die apparente lag-Phase von <i>C. glutamicum</i> -Stämmen mit unterschiedlichen <i>rpf</i> -Genotypen.....	84

3 Häufig verwendete Abkürzungen

Ω	Ohm (elektrischer Widerstand)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BHIS	Brain Heart Infusion Sorbitol Medium
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CoA	Coenzym A
d	Tag
Da	Dalton
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
G+C	Guanin + Cytosin
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
M	Molar

m	Milli (10^{-3})
MALDI	Matrix assisted laser desorption / ionisation
<i>mcs</i>	Multiple cloning site
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulare Masse
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Salz
nt	Nukleotide
Nx	Nalidixin
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RG	Reagenzglas
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	Sensitivität
SAP	<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Str	Streptomycin
Suc	Saccharose
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,'N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T_m	Schmelztemperatur
TOF	time of flight
Tris	Trishydroxyaminomethan
U	Unit
ü/N	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtszusatz
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid

4 Ein- und Drei-Buchstaben-Code für Aminosäuren

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

5 Sequenzdaten

Kodierende DNA-Sequenzen der *rpf*-Gene aus *C. glutamicum*. Zahlen am Beginn jeder Zeile entsprechen der Nukleotidposition. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstabencode angegeben.

5.1 Sequenz des *rpf1*-Gens aus *C. glutamicum*

```

1   atgggacgtc actccactaa gactagctcc gcgttcacca agctcgcagc
    M G R   H S T   K T S S   A F T   K L A

51  ttccaccatc gctttcggtg ctgctgcaac catcatggct ccttctgcat
    A S T I   A F G   A A A   T I M A   P S A

101 ctgctgcacc tgattccgac tgggatcgcc tcgcacagtg cgagtccggt
    S A A   P D S D   W D R   L A Q   C E S G

151 ggtaactggg caatcaacac cggtaacggc taccacggtg gtctgcagtt
    G N W   A I N   T G N G   Y H G   G L Q

201 ctccgctagc acctgggctg cttacggcgg ccaggagttc gctacctacg
    F S A S   T W A   A Y G   G Q E F   A T Y

251 cataccaggc aaccctgag cagcagatcg ctggttcaga gcgcaccttg
    A Y Q   A T R E   Q Q I   A V A   E R T L

301 gctggtcagg gctggggcgc atggcctgct tgctccgctt cccttggact
    A G Q   G W G   A W P A   C S A   S L G

351 gaactccgct ccaaccacgc gtgacctctc cgctaccacc tccaccccag
    L N S A   P T Q   R D L   S A T T   S T P

401 agccagctgc agctgcacca gctggtgctg agtacaacgc tcctgcagcc
    E P A   A A A P   A V A   E Y N   A P A A

451 aacatcgcag ttggctccac cgacttgaac accatcaagt ccacctacgg
    N I A   V G S   T D L N   T I K   S T Y

501 cgctgtcacc ggcaccctcg ctcagtacgg catcacctgt ccagctgagg
    G A V T   G T L   A Q Y   G I T V   P A E

551 ttgagtctta ctacaacgct ttcgtcggct aa
    V E S   Y Y N A   F V G   -

```

5.2 Sequenz des *rpf2*-Gens aus *C. glutamicum*

```

1   atggcgcccc atcagaagtc acggatcaac cggatcaaca gcacccgctc ggtgccgttg
    M A P H Q K S R I N R I N S T R S V P L

61  cgtttggcta ccggtggcgt gctcgccacc ttgcttatcg ggggagtcac cgctgcagct
    R L A T G G V L A T L L I G G V T A A A

121 accaaaaagg acatcattgt tgatgtcaac ggcgagcaga tgtccctagt gactatgtcc
    T K K D I I V D V N G E Q M S L V T M S

181 ggcactgttg aagggtgtgct ggcgcaagct ggtgtggaac ttggtgacca ggacattggt
    G T V E G V L A Q A G V E L G D Q D I V

241 tccccttcac tggattcatc catcagtgat gaagacactg tgactgttcg tactgccaag
    S P S L D S S I S D E D T V T V R T A K

301 caggtggcgc tcgtggtgga aggtcaaadc caaacgtga ccaccactgc ggtttccgtg
    Q V A L V V E G Q I Q N V T T T A V S V

361 gaggacctcc tgcaggaagt cgggtggcatt accggtgctg atgcggtgga cgctgatctt
    E D L L Q E V G G I T G A D A V D A D L

421 tcagagacca tcccagaatc tggtttgaag gtgagtggtta ccaagccgaa gattatttcc
    S E T I P E S G L K V S V T K P K I I S

481 atcaatgatg gtggcaaggt cacttacggt tctttggcag ctcagaacgt acaggaagcc
    I N D G G K V T Y V S L A A Q N V Q E A

541 ctagagctgc gggatattga gctgggtgct caggaccgca ttaatgtgcc tctggatcag
    L E L R D I E L G A Q D R I N V P L D Q

601 cagctgaaga acaacgctgc gatccagatc gaccgcgctt acaacaccga aatcactgaa
    Q L K N N A A I Q I D R V D N T E I T E

661 actgtgtctt tcgatgctga gccaacctac gtggatgatc cagaagctcc agctggcgat
    T V S F D A E P T Y V D D P E A P A G D

721 gaaactgtgg tcgaagaagg cgctcctgga accaaggaag ttactcgcac cgtaacaacc
    E T V V E E G A P G T K E V T R T V T T

781 gttaatggtc aggaagaatc ttccacgggt atcaatgaag ttgaaatcac cgcagcaaag
    V N G Q E E S S T V I N E V E I T A A K

841 ccagcaacca ttagccgtgg caccaaaact gtcgctgcaa actccgtgtg ggatcagctg
    P A T I S R G T K T V A A N S V W D Q L

901 gcacagtgtg aatccggcgg aaactgggca atcaacacag gtaatggctt ctccggcggc
    A Q C E S G G N W A I N T G N G F S G G

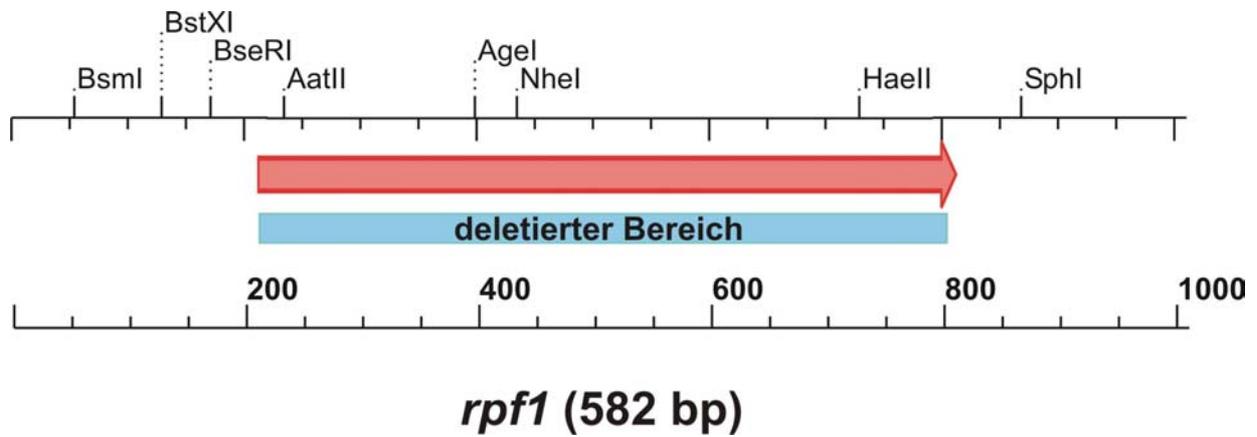
961 ctacagttcc acccacagac ctggctcgca tacggtggtg gagctttctc cggtgacgct
    L Q F H P Q T W L A Y G G G A F S G D A

1021 tccggtgcaa gccgtgaaca gcaaatctcc atcgcagaaa aggttcaggc tgcacaaggt
    S G A S R E Q Q I S I A E K V Q A A Q G

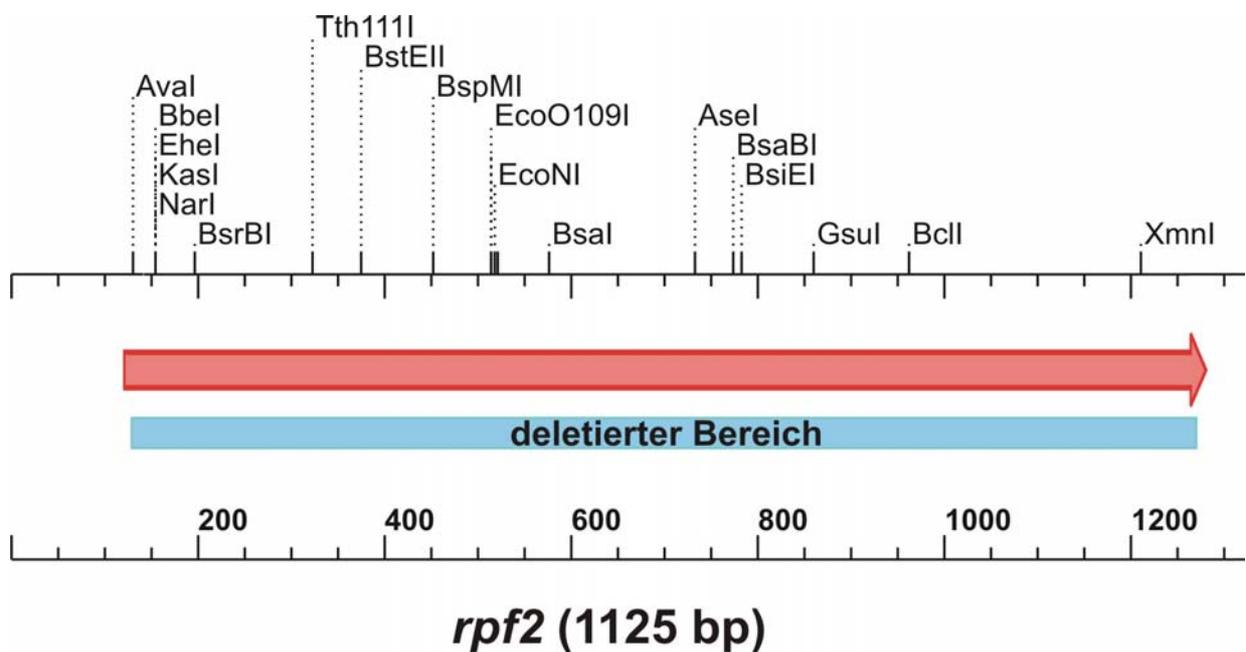
1081 tggggagcat ggctgcttg caccgcaagc ttgggcatcc gatag
    W G A W P A C T A S L G I R -

```

5.3 Gen- und Mutationskarte des *rpf1*-Gens aus *C. glutamicum*

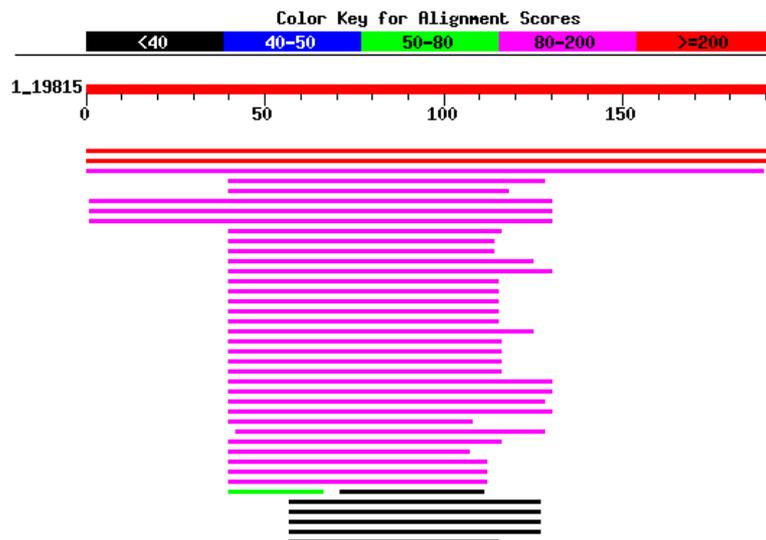


5.4 Gen- und Mutationskarte des *rpf2*-Gens aus *C. glutamicum*



6. Proteine mit Ähnlichkeit zu den Rpf Proteinen aus *C. glutamicum*

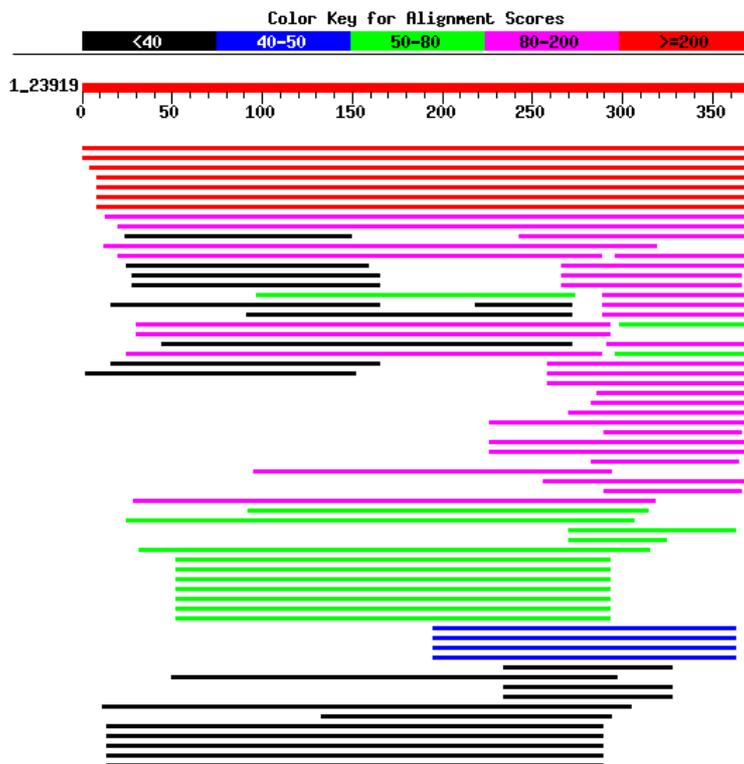
6.1 Ergebnis einer tBlastN-Abfrage gegen die *nr*-Datenbank (NCBI) mit der Aminosäuresequenz des Rpf1-Proteins aus *C. glutamicum*



Sequences producing significant alignments: (bits) Value

gi 21323419 dbj AP005276.1	Corynebacterium glutamicum ATCC...	292	6e-78
gi 23492722 dbj AP005217.1	Corynebacterium efficiens YS-31...	234	2e-60
gi 38199583 emb BX248356.1	Corynebacterium diphtheriae gra...	170	4e-41
gi 24426505 emb AL939115.1	SCO939115 Streptomyces coelicolo...	123	5e-27
gi 29610176 dbj AP005047.1	Streptomyces avermitilis genomi...	123	5e-27
gi 3261550 emb AL022004.1	MTV043 Mycobacterium tuberculosis...	120	4e-26
gi 31617341 emb BX248336.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	120	4e-26
gi 13880424 gb AE006976.1	AE006976 Mycobacterium tuberculos..	120	4e-26
gi 13093618 emb AL583924.1	MLEPRTN8 Mycobacterium leprae st...	117	2e-25
gi 2440087 emb Z99494.1	MLCB57 Mycobacterium leprae cosm...	117	2e-25
gi 1377774 gb L04666.1	MSGB1935CS M. leprae genomic sequenc...	117	2e-25
gi 29607035 dbj AP005035.1	Streptomyces avermitilis genomi...	117	4e-25
gi 29610706 dbj AP005049.1	Streptomyces avermitilis genomi...	113	5e-24
gi 38200856 emb BX248360.1	Corynebacterium diphtheriae gra...	112	7e-24
gi 13092412 emb AL583917.1	MLEPRTN1 Mycobacterium leprae st...	110	3e-23
gi 13880606 gb AE006987.1	AE006987 Mycobacterium tuberculos...	110	3e-23
gi 3261731 emb Z94752.1	MTCI237 Mycobacterium tuberculosis ...	110	3e-23
gi 31617663 emb BX248337.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	108	1e-22
gi 24419000 emb AL939107.1	SCO939107 Streptomyces coelicolo...	103	3e-21
gi 31618479 emb BX248340.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	102	1e-20
gi 3261816 emb Z97193.1	MTCY180 Mycobacterium tuberculosis ...	102	1e-20
gi 13881571 gb AE007049.1	AE007049 Mycobacterium tuberculos...	102	1e-20
gi 1491792 gb U38939.1	MTU38939 Mycobacterium tuberculosis ...	102	1e-20
gi 13882246 gb AE007090.1	AE007090 Mycobacterium tuberculos...	100	6e-20
gi 31619031 emb BX248342.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	100	6e-20
gi 19772914 emb Z96935.2	MLRPF Micrococcus luteus tnpA gene...	100	6e-20
gi 3261507 emb AL021246.1	MTV008 Mycobacterium tuberculosis...	98	2e-19
gi 29425700 gb AY129339.1	Mycobacteriophage Barnyard, comp...	97	4e-19
gi 35186925 gb AY372935.1	Micrococcus luteus Rpf gene, par...	93	6e-18
gi 149931 gb L01095.1	MSGB38COS M. leprae genomic DNA seque...	92	2e-17
gi 24418961 emb AL939131.1	SCO939131 Streptomyces coelicolo...	89	1e-16
gi 13882164 gb AE007085.1	AE007085 Mycobacterium tuberculos...	85	2e-15
gi 3261656 emb Z81368.1	MTCY253 Mycobacterium tuberculosis ...	85	2e-15
gi 1702968 gb AD000010.1	MSGY222 Mycobacterium tuberculosi...	85	2e-15
gi 4582345 emb AL049571.1	MLCB561 Mycobacterium leprae cosm...	52	1e-05

6.2 Ergebnis einer tBlastN-Abfrage gegen die *nr*-Datenbank (NCBI) mit der Aminosäuresequenz des Rpf2-Proteins aus *C. glutamicum*



Sequences producing significant alignments: (bits) Value

Accession	Organism	Bits	Value
gi 21323419 dbj AP005276.1	Corynebacterium glutamicum ATCC...	696	0.0
gi 23492722 dbj AP005217.1	Corynebacterium efficiens YS-31...	484	e-135
gi 38199583 emb BX248356.1	Corynebacterium diphtheriae gra...	350	6e-95
gi 3261731 emb Z94752.1 MTCI237	Mycobacterium tuberculosis ...	214	6e-54
gi 13880606 gb AE006987.1 AE006987	Mycobacterium tuberculos...	214	6e-54
gi 13092412 emb AL583917.1 MLEPRTN1	Mycobacterium leprae st...	214	8e-54
gi 31617663 emb BX248337.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	213	2e-53
gi 29607035 dbj AP005035.1	Streptomyces avermitilis genomi...	136	2e-30
gi 24426505 emb AL939115.1 SCO939115	Streptomyces coelicolo...	126	2e-27
gi 29610176 dbj AP005047.1	Streptomyces avermitilis genomi...	111	6e-23
gi 2440087 emb Z99494.1 MLCB57	Mycobacterium leprae cosmid B57	100	1e-19
gi 1377774 gb L04666.1 MSGB1935CS	M. leprae genomic sequenc...	100	1e-19
gi 13093618 emb AL583924.1 MLEPRTN8	Mycobacterium leprae st...	100	1e-19
gi 31617341 emb BX248336.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	97	1e-18
gi 13880424 gb AE006976.1 AE006976	Mycobacterium tuberculos...	97	1e-18
gi 3261550 emb AL022004.1 MTV043	Mycobacterium tuberculosis...	97	1e-18
gi 38200856 emb BX248360.1	Corynebacterium diphtheriae gra...	94	1e-17
gi 13881571 gb AE007049.1 AE007049	Mycobacterium tuberculos...	91	1e-16
gi 3261816 emb Z97193.1 MTCY180	Mycobacterium tuberculosis ...	91	1e-16
gi 31618479 emb BX248340.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	91	1e-16
gi 1491792 gb U38939.1 MTU38939	Mycobacterium tuberculosis ...	89	3e-16
gi 29610706 dbj AP005049.1	Streptomyces avermitilis genomi...	89	4e-16
gi 24419000 emb AL939107.1 SCO939107	Streptomyces coelicolo...	86	3e-15
gi 149931 gb L01095.1 MSGB38COS	M. leprae genomic DNA seque...	86	3e-15
gi 31619031 emb BX248342.1	Mycobacterium bovis subsp. bovi...	83	3e-14
gi 13882246 gb AE007090.1 AE007090	Mycobacterium tuberculos...	83	3e-14
gi 13882164 gb AE007085.1 AE007085	Mycobacterium tuberculos...	82	4e-14
gi 3261656 emb Z81368.1 MTCY253	Mycobacterium tuberculosis ...	82	4e-14
gi 19772914 emb Z96935.2 MLRPF	Micrococcus luteus tnpA gene...	82	7e-14
gi 3261507 emb AL021246.1 MTV008	Mycobacterium tuberculosis...	81	9e-14
gi 1702968 gb AD000010.1 MSGY222	Mycobacterium tuberculosis...	76	3e-12
gi 24418961 emb AL939131.1 SCO939131	Streptomyces coelicolo...	72	7e-11

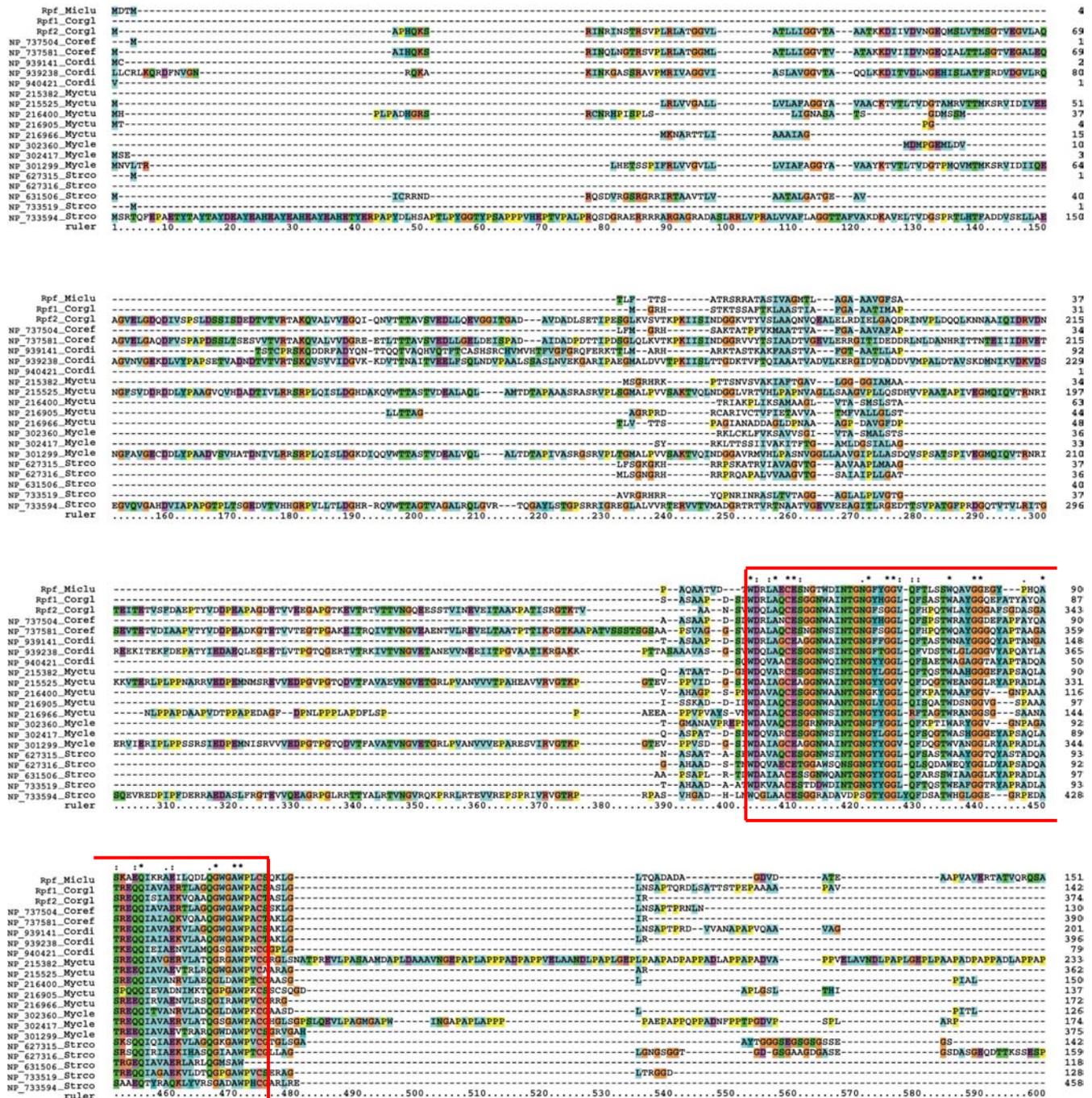
6.3 Rpf-Proteine ausgewählter *Actinomycetales*

Protein	Acc. No.	Kodierregion	Organismus	Nukleotide	Aminosäuren
Rpf1 (Cg0936)	NP_600048.1	cg0936 NCgl0785	<i>C. glutamicum</i>	582	193
Rpf2 (Cg1037)	NP_600137.1	cg1037 NCgl0872	<i>C. glutamicum</i>	1125	374
Rpf1, Ce0894 (GenDB)	NP_737504.1	ce0894	<i>C. efficiens</i>	594	197
Rpf2, Ce0971 (GenDB)	NP_737581.1	ce0971	<i>C. efficiens</i>	1173	390
Cd0867(GenDB)	NP_939141.1	DIP0775	<i>C. diphtheriae</i>	624	207
Cd0973(GenDB) (Rpf2-Homolog)	NP_939238.1	DIP0874	<i>C. diphtheriae</i>	1158	385
Cd2333(GenDB)	NP_940421.1	DIP2105	<i>C. diphtheriae</i>	330	109
RpfA	NP_215382.1	Rv0867	<i>M. tuberculosis</i>	1224	407
RpfB (Rpf2-Homolog)	NP_215525.1	Rv1009	<i>M. tuberculosis</i>	1089	362
RpfC	NP_216400.1	Rv1884	<i>M. tuberculosis</i>	531	176
RpfD	NP_216905.1	Rv2389	<i>M. tuberculosis</i>	465	154
RpfE	NP_216966	Rv2450	<i>M. tuberculosis</i>	519	172
ML0240 (Rpf2-Homolog)	NP_301299	MI0240	<i>M. leprae</i>	1128	375
ML2030	NP_302360	MI2030	<i>M. leprae</i>	474	157
ML2151	NP_302417	MI2151	<i>M. leprae</i>	525	174
SCO3097	NP_627315.1	Sco3097	<i>S. coelicolor</i>	735	244
SCO3098	NP_627316.1	Sco3098	<i>S. coelicolor</i>	1026	341
SCO7458	NP_631506.1	Sco7458	<i>S. coelicolor</i>	366	121
SCO0974	NP_733519.1	Sco0974	<i>S. coelicolor</i>	1320	439
SCO3150 (Rpf2-Homolog)	NP_733594.1	Sco3150	<i>S. coelicolor</i>	1377	458

Die Angaben zu den für Rpf-Proteine kodierenden DNA-Bereichen beziehen sich auf die entsprechenden Genbank-Genomeinträge für *C. glutamicum* (NC_003450.2), *C. efficiens* (NC_004369.1), *C. diphtheriae* (NC_002935.2), *M. tuberculosis* (NP_000962.1), *M. leprae* (NC002677.1) und *S. coelicolor* (NC_003888.3)

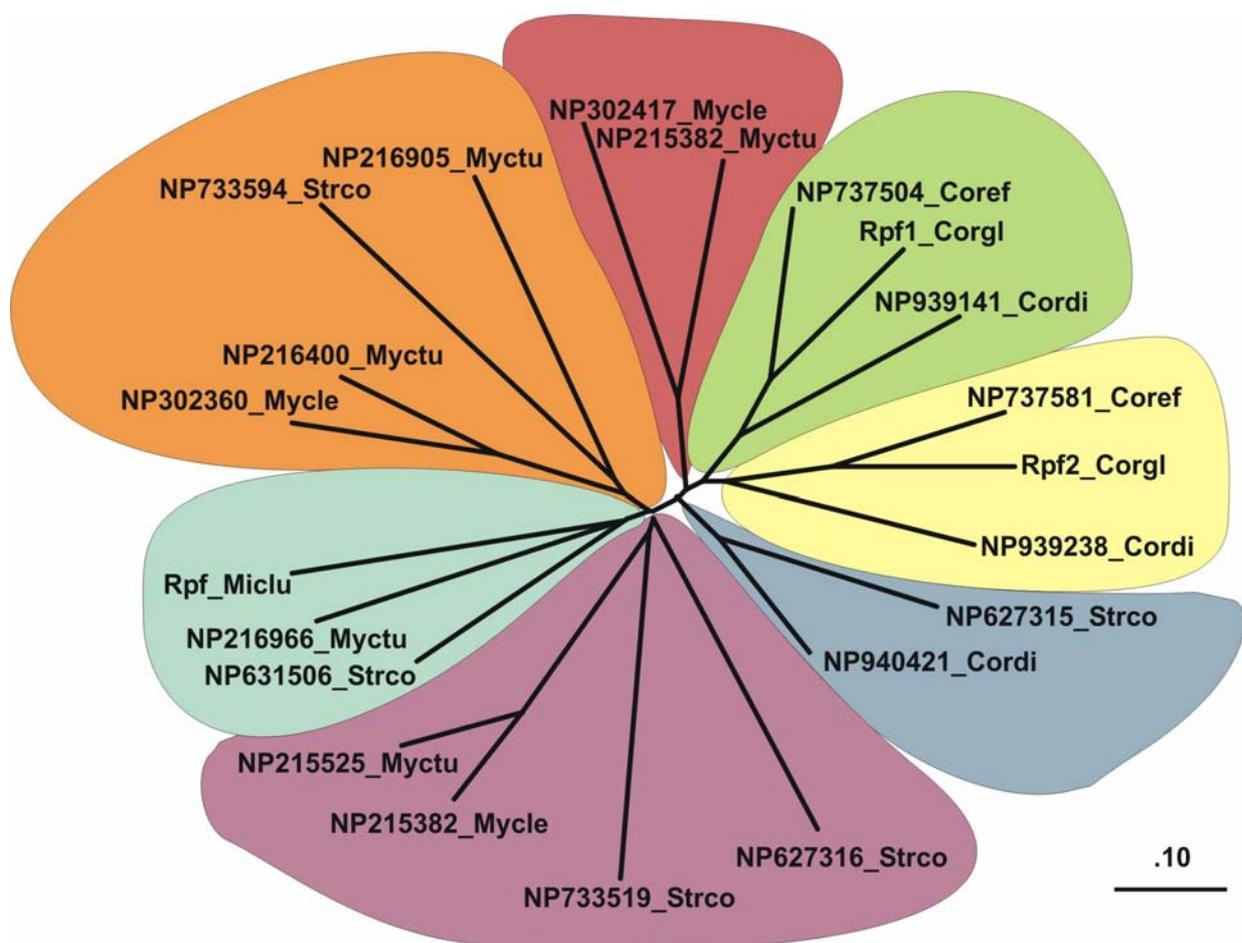
6.4 Multiples Alignment von Rpf-Proteinen ausgewählter Actinomycetales

Multiples Alignment der vollständigen Aminosäuresequenzen ausgewählter Rpf-Proteine, das mit dem Programm DiAlign (Morgenstern *et al.*, 1999) berechnet und mit CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) graphisch dargestellt wurde. Die Sequenzen variieren in ihrer Länge (vgl. VII.6.3) und in ihrer Aminosäuresequenz. Gut zu erkennen ist jedoch das hochkonservierte Rpf-Motiv (rot umrahmt).



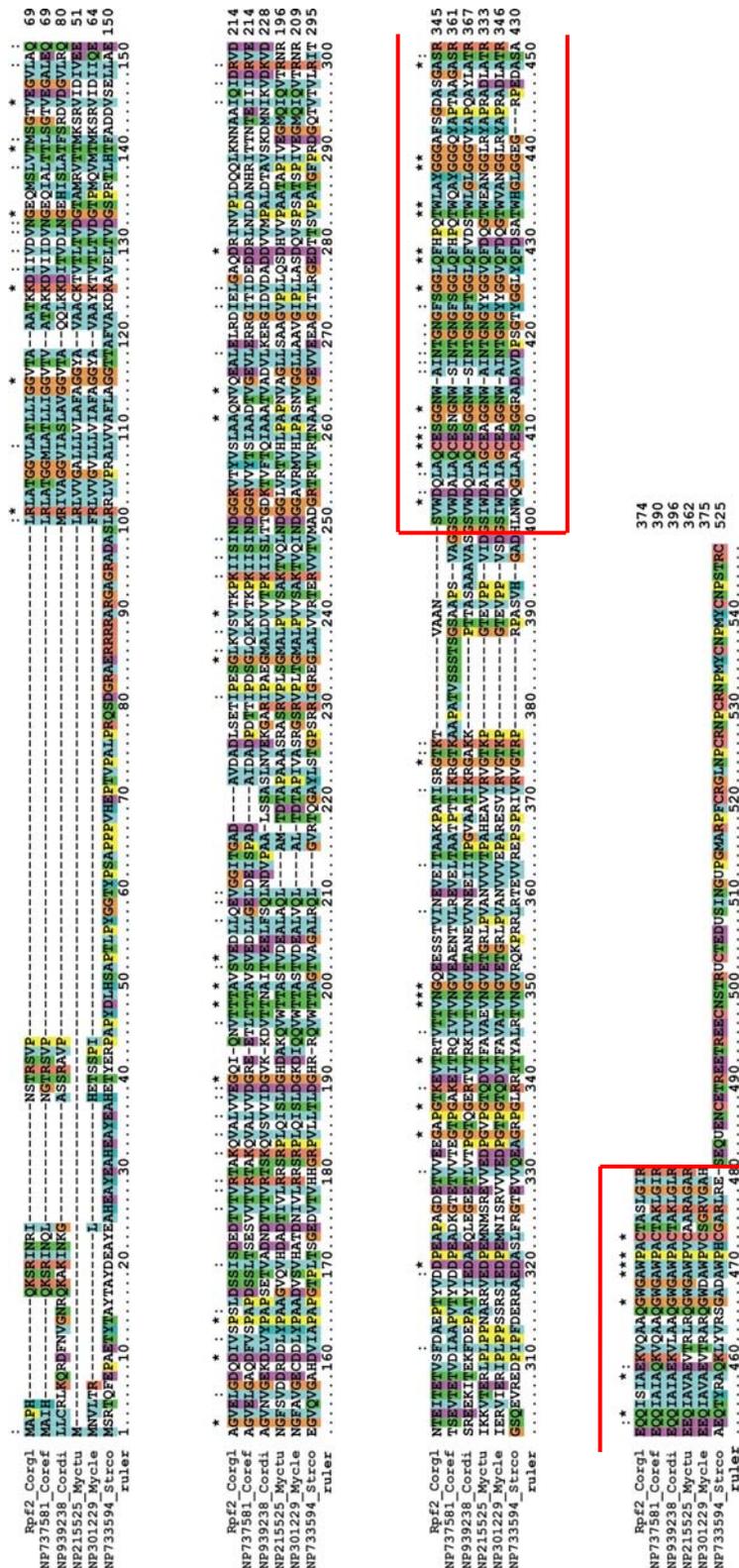
6.5 Phylogenetische Einordnung der Rpf-Proteine

Ein phylogenetischer Baum, berechnet mit dem im CLUSTALX-Programm (Thompson *et al.*, 1997) implementierten *neighbour joining*-Algorithmus und visualisiert mit dem Treetool-Programm, der auf einem mit dem Programm DiAlign (Morgenstern *et al.*, 1999) berechneten multiplen Alignment der Gesamtsequenzen der verschiedenen Rpf-Proteine basiert, gibt die taxonomische Nähe zwischen den verschiedenen Coryne- und Mycobakterien wieder. Eine eindeutige Klassifizierung der Rpf-Proteine in verschiedene Gruppen über Spezies-Grenzen hinweg ist hingegen nicht möglich.



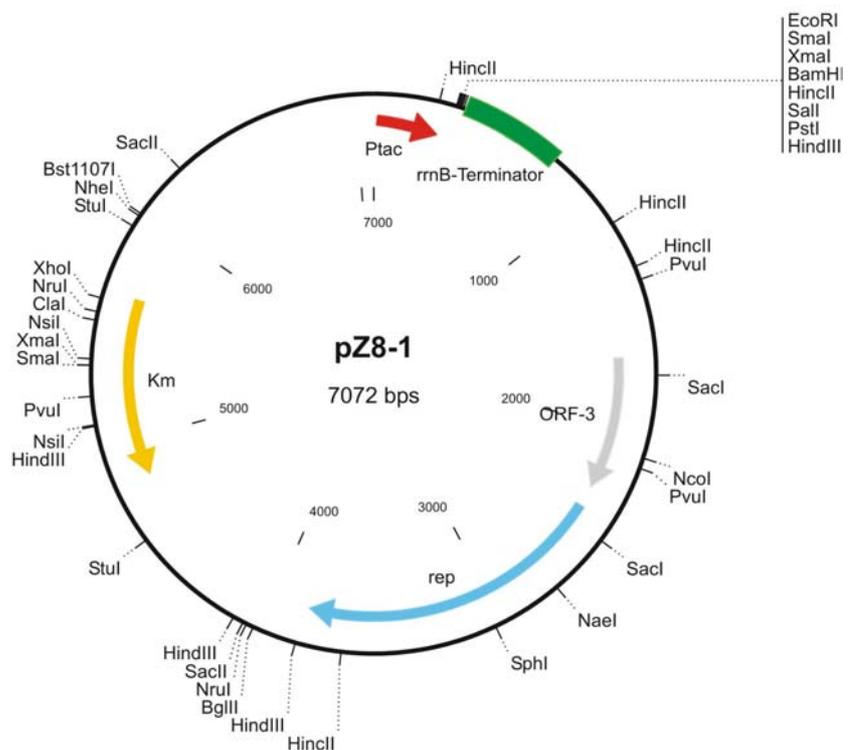
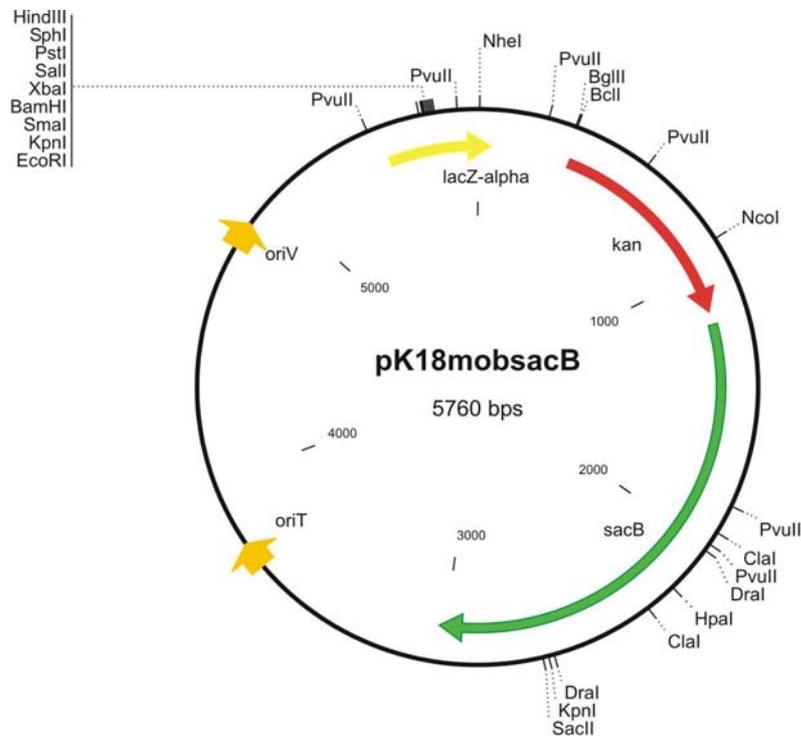
6.6 Multiples Alignment Rpf2-ähnlicher Proteine

Das Alignment wurde mit dem Programm DiAlign (Morgenstern *et al.*, 1999) berechnet und mit CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) dargestellt. Das in allen Rpf-Proteine hochkonservierte Rpf-Motiv ist rot umrahmt.

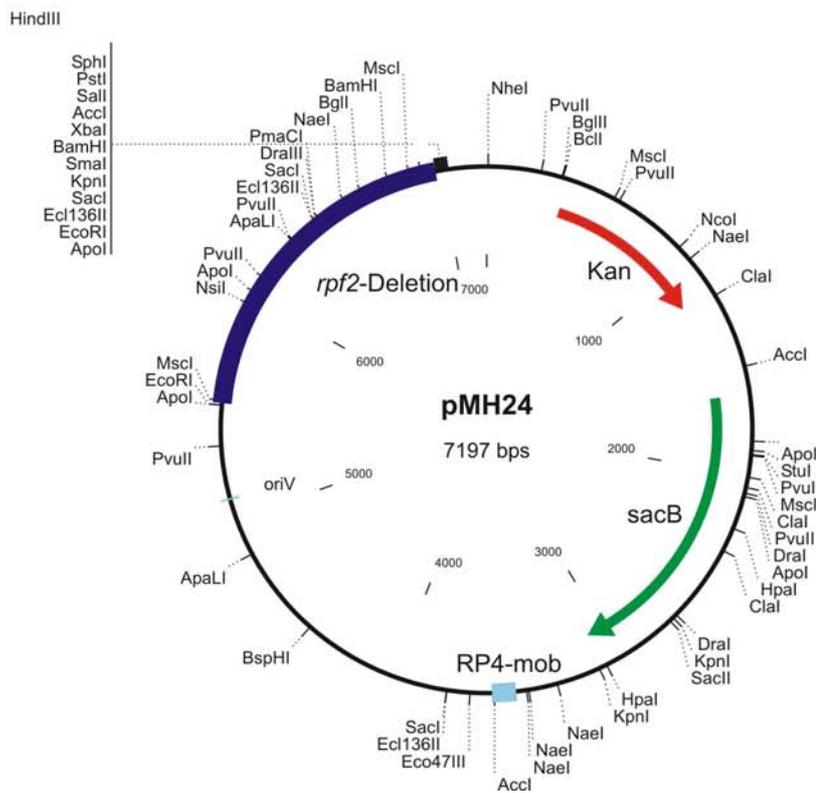
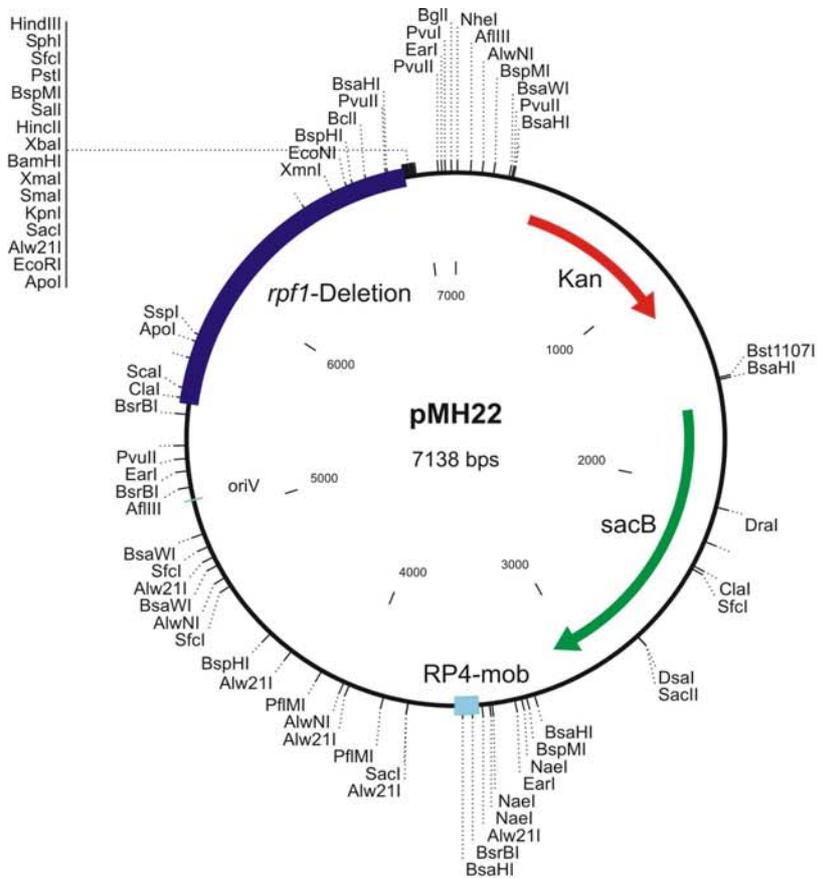


7 Plasmidkarten

7.1 In dieser Arbeit verwendete Vektoren

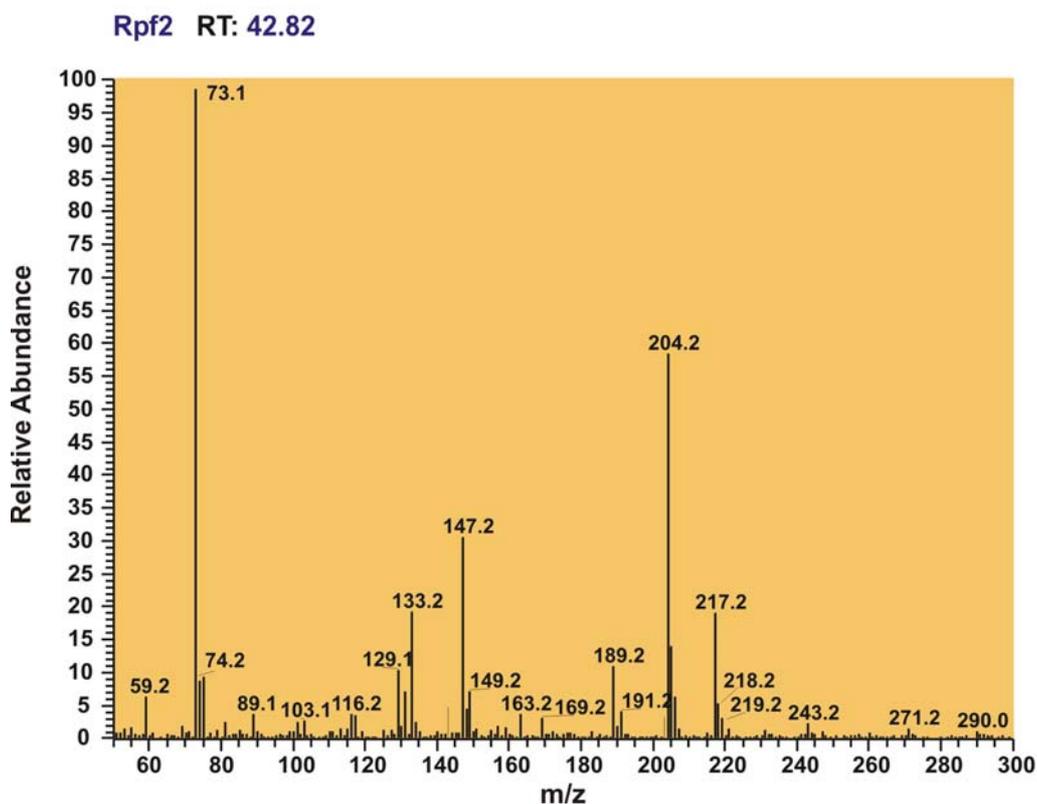
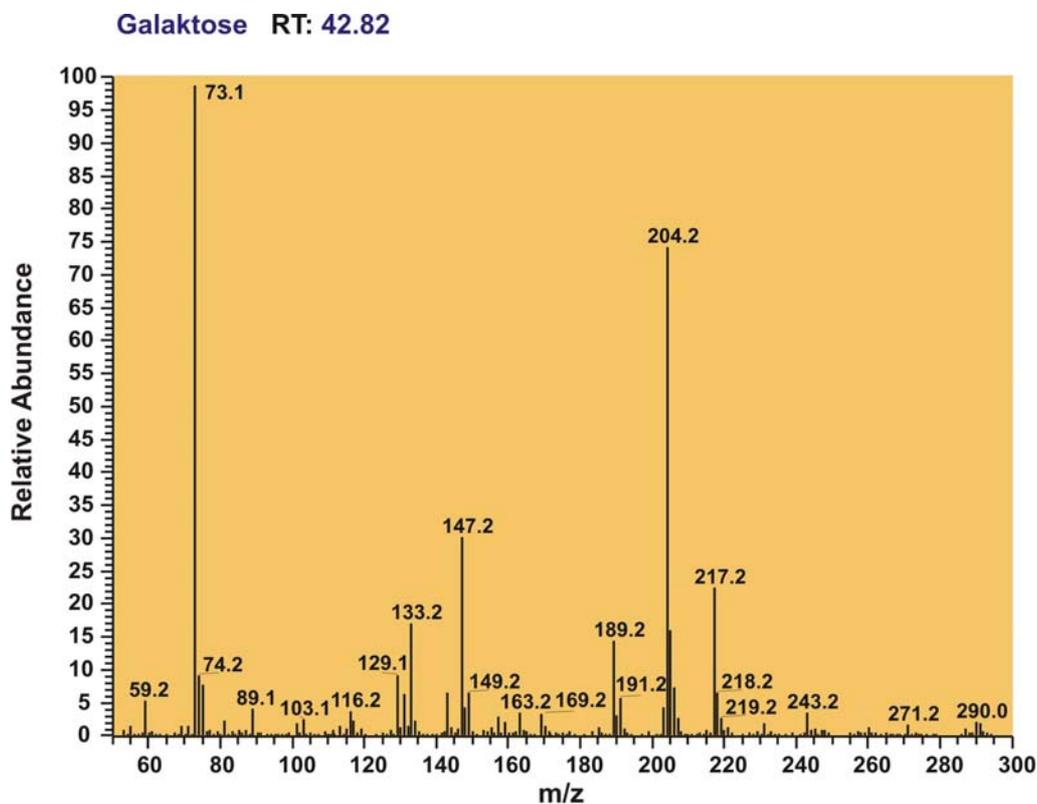


7.2 Vektorkonstrukte zur Erzeugung definierter Deletionen im Chromosom von *C. glutamicum*

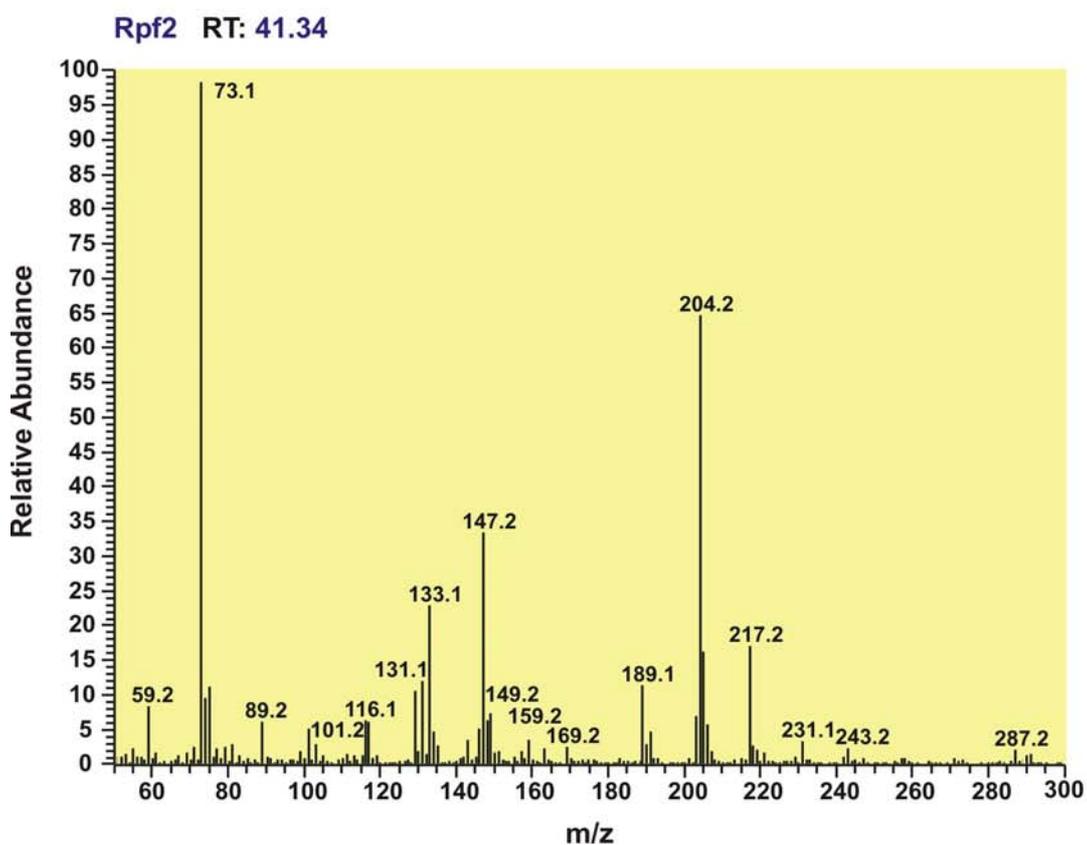
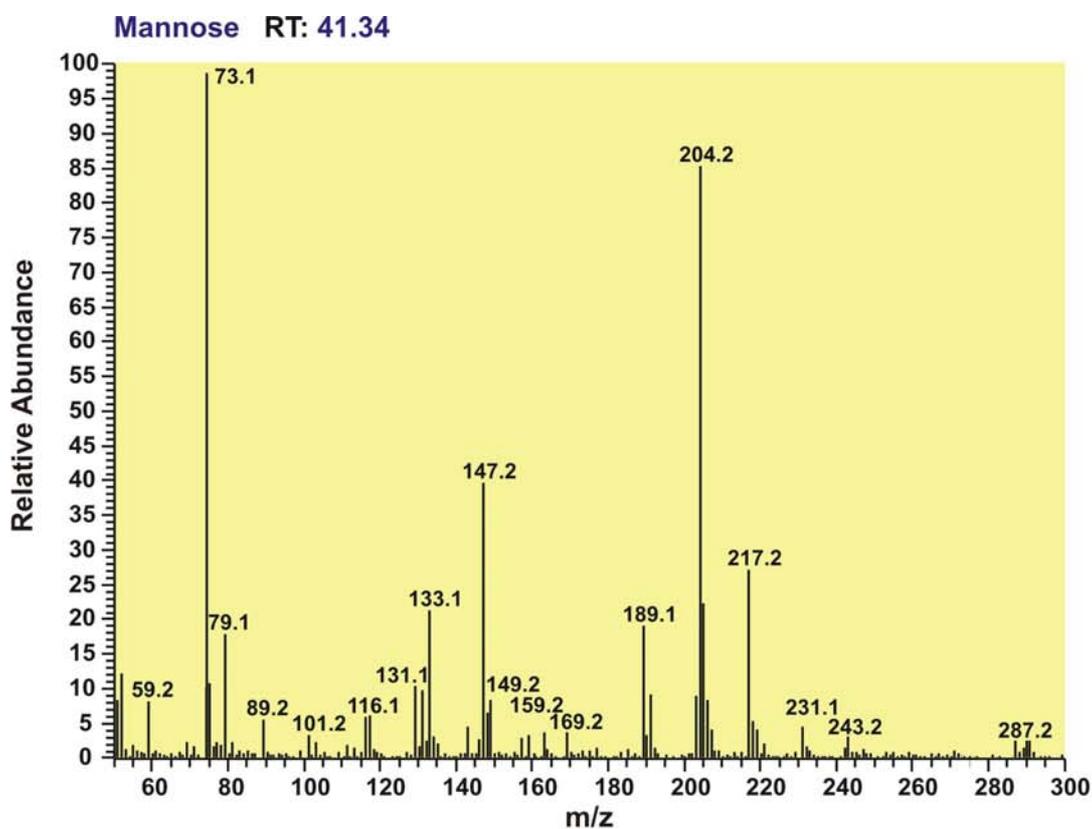


8 Massenspektren

8.1 Massenspektren zur Identifizierung von Galaktose als Bestandteil des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung



8.2 Massenspektrum zur Identifizierung von Mannose als Bestandteil des Kohlenhydratanteils der Rpf2-Glykosylierung



DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für seine wissenschaftliche Betreuung. Herrn Dr. Jörn Kalinowski als Leiter der Gruppe Corynebakterien-Genetik danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen, die neue Impulse für die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Andreas Tauch, der stets für die Beantwortung von Fragen und für viele konstruktive Diskussionen bei der Bearbeitung dieses Themas zur Verfügung stand. Darüberhinaus war er beim Verfassen der aus meiner Promotion hervorgegangenen Publikationen und der hier vorliegenden Arbeit eine große und wichtige Hilfe.

Allen Mitgliedern der „Coryne-Gruppe“ möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre danken, die den Laboralltag oft erleichtert hat. Nicht nur die insgesamt gute Stimmung, sondern auch viele konstruktive Ideen aus dem Kreis der Kollegen haben meine Arbeiten manches Mal beflügelt.

Zu besonderem Dank bin ich dem Leiter der Arbeitsgruppe Phytopathologie PD Dr. Karsten Niehaus und Aiko Barsch verpflichtet. Ohne ihre Unterstützung wären die Untersuchungen im Hinblick auf eine Glykosylierung des Rpf2-Proteins und die GC-MS-Analysen in dieser Form vermutlich nicht möglich gewesen.

Grosser Dank gilt der Herrmann-Schlosser Stiftung, Frankfurt, die meine Promotion während der ersten zwei Jahre finanziell unterstützt hat.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich während meines gesamten Studiums und der anschließenden Promotion in jeglicher Hinsicht unermüdlich unterstützt haben.

ERKLÄRUNG

Mit der vorliegenden Dissertation beantrage ich beim Promotionsausschuss der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld die Eröffnung des Promotionsverfahrens nach § 5 der Promotionsordnung in der Fassung vom 03. Juni 2002.

Die Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „Untersuchung von Proteinen mit „Resuscitation-Promoting Factor“-Motiv und der für sie kodierenden Gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032“ erfolgte unter der Betreuung von Prof. Dr. Alfred Pühler am Lehrstuhl für Genetik der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommene Zitate sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, 05 März 2004

(Michael Hartmann)