

**Untersuchung des Proteinexports in
Corynebacterium glutamicum anhand der
Produktion heterologer Exoenzyme**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

Vorgelegt von
Stephan Berens
aus Andernach (Rhld.)

Mai 2000

Hiermit beantrage ich nach § 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld vom 18. September 1995 die Eröffnung des Promotionsverfahrens beim Promotionsausschuß.

Meine Promotionsarbeit mit dem Titel „Untersuchung des Proteinexports in *Corynebacterium glutamicum* anhand der Produktion heterologer Exoproteine“ wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Alfred Pühler am Lehrstuhl für Genetik an der Universität Bielefeld durchgeführt.

Darstellung des Bildungsganges

- 1973-1977: Grundschule St. Stephan in 56626 Andernach
- 1977-1987: Kurfürst Salentin Gymnasium in 56626 Andernach
- Mai 1987: Abitur
- 1989-1995: Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich- Wilhelm
.....Universität, 53113 Bonn
- 02.02.1995: Diplom in Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
.....der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- März 1995: Promotionsstudium am Lehrstuhl für Genetik, Fakultät für Biologie,
.....Universität Bielefeld.
- 1995-1998: Stipendium des Graduiertenkollegs Zelluläre Grundlagen biotechno-
.....logischer Prozesse

Hiermit erkläre ich nach § 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld vom 18. September 1995, daß ich bislang keinen früheren und nicht-erfolgreichen Promotionsversuch unternommen habe.

Ich versichere, daß ich die Dissertation mit dem Titel „Untersuchung des Proteinexports in *Corynebacterium glutamicum* anhand der Produktion heterologer Exoproteine“ selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Stephan Berens)

Inhaltsverzeichnis

A	ZUSAMMENFASSUNG	1
B	EINLEITUNG	2
1	Corynebakterien: Taxonomie und Aufbau der Zellhülle	2
2	Corynebakterien: Wirtschaftliche Bedeutung und molekularbiologische Manipulation	5
3	„General Secretory Pathway“ als System des Proteinexports in Bakterien	8
C	MATERIAL UND METHODEN	19
1	Material	19
1.1	Bakterienstämme und Plasmide	19
1.2	Nährmedien und Zusätze	21
1.3	Lösungen und Puffer	23
1.4	Enzyme, Chemikalien und anderes Material	28
2	Mikrobiologische Methoden	31
2.1	Kultivierung von Bakterien	31
2.2	Bestimmung des Bakterientiters	31
2.3	Glyzerinkulturen	31
3	Genetische Methoden	32
3.1	Isolierung von DNA	32
3.2	DNA-Reinigung	34
3.3	DNA-Analysen im Minigel	35
3.4	Klonierungsexperimente	36
3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.6	DNA-Transfer	40
3.7	DNA-Hybridisierung	43
3.8	Sequenzierung und Auswertung	46

4	Protein-Biochemische Methoden	48
4.1	Expression, Extraktion und Darstellung von Proteinen	48
4.2	Proteinsequenzierung mit MALDI-PSD	51
4.3	Nachweis von Enzymaktivität	52
D	ERGEBNISSE	54
1	Analyse der <i>sec</i>-Gene aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	54
1.1	Isolierung und Analyse von <i>secD</i> und <i>secF</i> aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	54
1.2	Analyse von <i>secA</i> , <i>secY</i> , <i>secE</i> und <i>secG</i> und umliegender DNA-Regionen	65
1.3	Chromosomale Anordnung der <i>sec</i> -Gene in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	67
2	Mutation und Überexpression von <i>sec</i>-Genen in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	69
2.1	Überexpression von <i>sec</i> -Genen	69
2.2	Mutation von <i>sec</i> -Genen	73
2.3	Effekt der Überexpression und Mutation von <i>sec</i> -Genen auf die Zellwand-Proteine	81
3	Konstruktion eines Reportersystems zur Untersuchung der Proteinsekretion in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	84
3.1	Verschiedene heterologe Exoenzyme als Reportersysteme	84
3.2	α -Amylase als Reportersystem	86
4	Analyse der Effekte von <i>sec</i>-Mutation und <i>sec</i>-Überexpression in <i>Corynebacterium glutamicum</i> mit Hilfe des heterologen Reportersystems	93
4.1	Amylase-Sekretion der <i>sec</i> -Mutanten	93
4.2	Amylase-Sekretion der <i>sec</i> -Überexprimierer	96

E DISKUSSION 100

- 1 Die neuen Gene *secD* und *secF* aus *Corynebacterium glutamicum* liegen stromabwärts der *dciAE*-Region. 100**
- 2 Einige *sec*-Gene sind in ihrer chromosomalen Anordnung konserviert. 103**
- 3 Mutationen im „General Secretory Pathway“ bewirken Störungen im Aufbau der Zellhülle. 105**
- 4 Die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen steigert die Sekretion von Zellhüllproteinen. 108**
- 5 α -Amylase ist ein geeignetes Reportersystem der Proteinsekretion in *C. glutamicum*. 109**
- 6 Mutationen innerhalb des „General Secretory Pathway“ reduzieren die Sekretion des heterologen Proteins. 111**
- 7 Die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen steigert die Proteinsekretion. 113**

F LITERATURVERZEICHNIS 116

G ANHANG 125

DANKSAGUNG

Zusammenfassung

Die neuen *sec*-Gene *secD* und *secF* aus *Corynebacterium glutamicum* wurden isoliert und analysiert. *C. glutamicum secD* besteht aus 1911 bp und beginnt vermutlich mit dem seltenen Startcodon TTG. Das Protein wird aus 637 Aminosäuren gebildet (MW 67,7 kDa), weist sechs Transmembrandomänen und einen extracytoplasmatischen "Loop" von 371 Aminosäureresten auf und zeigt sechs konservierte Sequenzmotive unbekannter Funktion.

C. glutamicum secF besteht aus 1209 bp, beginnt fünf Basen nach dem *secD* Stoppcodon und seine Shine-Dalgarno Sequenz ist Teil des *secD* 3'Ende. Das Protein besteht aus 403 Aminosäureresten (MW 43,7 kDa), zeigt ebenfalls sechs Transmembrandomänen und einen extracytoplasmatischen "Loop" von 95 Aminosäureresten sowie vier konservierte Sequenzmotive. Zudem zeigen sich zwei konservierte Regionen mit hoher Homologie zu SecY, bei denen es sich möglicherweise um Interaktionsstellen handelt. Beide Proteine sind in ihren transmembranen Bereichen konserviert und im extracytoplasmatischen Loop variabel. Die bereits beschriebenen Gene *secA*, *secY*, *secE* und *secG* wurden mitsamt umliegenden Bereichen isoliert und sequenziert. Eine Analyse ergab, dass alle *sec*-Gene mit Ausnahme von *secG* in Nachbarschaft von Genen der Translation und Transkription angeordnet sind. Diese Anordnung ist innerhalb der Bakterien hoch konserviert.

Mutationsstudien zeigten, dass eine Mutation allein bei den Genen *secD*, *secF* und *secG* möglich sind. Alle Mutanten zeigen Störungen im Zellwandaufbau, was sich in Vergrößerung der Zellen für *secD*- und *secF*-Mutanten und erhöhter Empfindlichkeit für Detergenzien für *secG*-Mutanten äußert. Komplementationsexperimente legen nahe, dass *secD* und *secF* nicht in einer Operon-Struktur angelegt sind.

Zur Analyse der Proteinsekretion in *C. glutamicum* wurde ein, auf der Sekretion einer heterologen α -Amylase aus *Streptomyces griseus* basierendes, chromosomal- oder Plasmid-kodiertes Testsystem konstruiert. Amylase sekretierende *C. glutamicum*-Stämme können auf Stärke als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Eine Analyse der *sec*-Mutanten ergab, dass die Amylase-Sekretion in *secG*-Mutanten um fast 80 % reduziert ist, während sie in *secD*- und *secF*-Mutanten vollständig unterbunden wird. Während die Überexpression einzelner *sec*-Gene keinen signifikanten Einfluß auf die Rate der Amylase-Sekretion ausübt, wird sie durch Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen deutlich gesteigert. Gemeinsame Überexpression von *secD* und *secF* steigern die Sekretion des heterologen Proteins um den Faktor 1,6, die Kombinationen *secE*, *secD* und *secF* und *secY*, *secD*, und *secF* erhöhen die Sekretionsrate um den Faktor 2,3 beziehungsweise 2,6.

B Einleitung

1) Corynebakterien: Taxonomie und Aufbau der Zellhülle

Taxonomie von Corynebakterien

Corynebakterien sind fakultativ anaerobe, nicht sporulierende, unbewegliche Stäbchen. Das hantel- oder keulenförmige Aussehen dieser Mikroorganismen war namensgebend für diese Gattung (von griech. Koryne = Keule). Charakteristische Merkmale für diese Gattung sind der Aufbau des Peptidoglycans auf Basis von *meso*-Diaminopimelat sowie die Zusammensetzung der Zellwand aus dem Polymer Arabinogalaktan und kurzkettigen Mycolsäuren von 22-36 Kohlenstoffatomen Länge. Ein mikroskopisch erkennbares Charakteristikum der Corynebakterien ist die Zellteilung per "snapping division", ein durch ungleichmäßiges Aufreißen der Zellwand hervorgerufenes Abwinkeln der Zellen während der Teilung.

Um die medizinisch bedeutsame Bakterienspezies *Corynebacterium diphtheriae* taxonomisch einordnen zu können, wurde 1896 von Lehmann und Neumann die Gattung *Corynebacterium* eingeführt. Das *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* (Vol.2, 1986) ordnet heute die Corynebakterien als Genus "*Corynebacterium* Lehmann und Neumann 1896" der Sektion "Irregular nonsporring gram-positive rods" zu (Collins & Cummings, 1986). Gekennzeichnet durch ihren hohen GC-Gehalt von 51 bis 65 mol% (Liebl *et al.*, 1991) gehören sie der großen Gruppe der Gram-positiven, hoch-GC-haltigen Bakterien an, welche die Unterfamilie der Actinomyceten innerhalb der Eubakterien bilden (Stackebrand & Woese, 1981). Diese heterogene Sektion erfaßt vorwiegend human- und tierpathogene Stämme, aber auch einige apathoge Spezies der Haut-, Wasser- und Bodenflora. Die pflanzenpathogenen Vertreter wurden in den 80er Jahren zumeist in den Gruppen *Curtobacterium* und *Clavibacter* reklassifiziert (Collins & Jones, 1983; Collins *et al.*, 1982; Davis *et al.*, 1984).

Aufbau der Zellhülle

Chemotaxonomische Studien des Zellwandaufbaus, welche die Lipidzusammensetzung, die Peptidoglycan-Struktur und das Vorkommen von Mycolsäuren berücksichtigten, wiesen eine enge phylogenetische Verwandtschaft der Corynebakterien mit den Gattungen *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* nach. Diese vier Gattungen werden als CMN-Gruppe zusammengefaßt (Barksdale, 1970).

Unter den wenigen Proteinen, die durch *C. glutamicum* sekretiert werden, dominieren Bestandteile der Zellhülle (Peyret *et al.*, 1993). Die Zellhülle, schematisch dargestellt in Abbildung B-1, besteht aus der Cytoplasmamembran und aufeinanderfolgenden Schichten von Peptidoglycan, Mycolsäure-Arabinogalaktan und dem S-Layer (Marienfeld *et al.*, 1997), einer parakristallinen Schicht aus Proteinen (Sleytr & Beveridge, 1999).

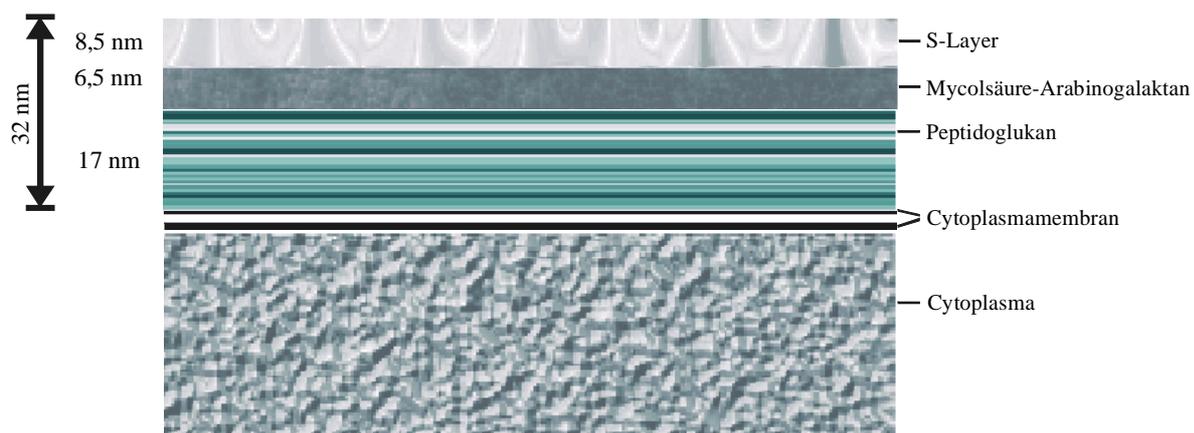


Abbildung B-1: Schematische Darstellung der *C. glutamicum* Zellwand nach Marienfeld *et al.*, (1997).

Zwei Proteine der Zellhülle wurden bislang genauer charakterisiert, nämlich PS1 (Joliff *et al.*, 1992), und PS2 (Peyret *et al.*, 1993; Chami *et al.*, 1997). Die Sequenz von PS1, das N-terminal Ähnlichkeit zum Antigen-85 Komplex aus *Mycobacterium* aufweist (Joliff *et al.*, 1992) legt nahe, das es sich auch bei dem corynebakteriellen Protein um eine Mycolyltransferase handelt (Belisle *et al.*, 1997) deren Carboxylesterase-Aktivität eine wichtige Rolle in der Genese der Mycolsäureschicht der Zellwand spielt. Im Gegensatz zu dem essentiellen Antigen85-Komplex aus *M. tuberculosis* läßt sich PS1 aber ohne offensichtliche negative Folgen ausschalten (Joliff *et al.*, 1992). PS2 stellt den Hauptbestandteil der S-Layer Schicht dar (Chami *et al.*, 1997). Das S-Layer, eine

monomolekulare Anordnung von Proteinen oder Glycoproteinen, ist eine der am weitesten verbreiteten Membranstrukturen von Archaea und Bakterien (Sleytr & Sara, 1997). Es weist eine Vielzahl von Funktionen auf, beispielsweise als Schutzhülle, isopores Molekularsieb, Molekülfalle oder als Virulenzfaktor (Sleytr, 1997). Beide Proteine, PS1 und PS2, werden durch *C. glutamicum* in großen Mengen sekretiert, bleiben aber gemäß ihrer Funktion an der Zelle verankert. Trotz allem macht von den Zellen abgelöstes PS1 und PS2 über 90% des Proteins aus, das sich im Kulturüberstand von *C. glutamicum* finden läßt (Peyret *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen, die sich der 2-D Gelelektrophorese- und der ELISA-Techniken bedienen, haben gezeigt, das *C. glutamicum* ungefähr 700 verschiedene Membran- und Zellhüllproteine aufweist (Burkovski, 1997; Hermann *et al.*, 1998). Nur wenige dieser Proteine wurden bisher identifiziert (Tabelle B-1).

Tabelle B-1: Proteine der Cytoplasmamembran und der Zellhülle aus *C. glutamicum*

Protein	Referenz
35 kDa Antigen	Hermann <i>et al.</i> , 1998
Antigen 84	Hermann <i>et al.</i> , 1998
ATP-Synthetase Untereinheit α , χ und δ	Hermann <i>et al.</i> , 1998
Zellwand-Porin	Lichtinger <i>et al.</i> , 1998

Nur ein Protein mit enzymatischer Aktivität, eine DNase, wurde bisher für *C. glutamicum* als direkt in das Kulturmedium sekretiert beschrieben (Liebl & Sinskey, 1988).

2) Corynebakterien: Wirtschaftliche Bedeutung und molekularbiologische Manipulation

Wirtschaftliche Bedeutung von Corynebakterien

Durch ihr breites Spektrum von Stoffwechsellleistungen erlangten Corynebakterien wissenschaftliches und industrielles Interesse (Wohleben *et al.*, 1993). Dabei wurden Corynebakterien bereits 1957 von Kinoshita *et al.* als Aminosäureproduzenten entdeckt. In Kulturüberständen von *C. glutamicum* waren große Mengen der Aminosäure L-Glutamat zu finden. Seitdem wurden fermentative Herstellungsverfahren für eine Vielzahl von Stoffen durch *C. glutamicum* und *Brevibacterium lactofermentum* (Crueger & Crueger, 1984) entwickelt, welche in der Industrie oder in medizinischen Bereichen eine breite Anwendung finden. In der Tabelle B-2 sind einige fermentative Einsatzgebiete von coryneformen Bakterien aufgelistet.

Tabelle B-2: Industrielle Einsatzgebiete coryneformer Bakterien.

Spezies	Einsatz
<i>C. glutamicum</i>	Aminosäure-Produktion (Yamada <i>et al.</i> , 1987)
<i>C. glutamicum</i>	Carotinoid-Produktion (Sandmann, 1994)
<i>Corynebacterium amoniagenes</i>	Nukleotid-Produktion (Ogata <i>et al.</i> , 1976)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Antibiotika-Produktion (Suzuki <i>et al.</i> , 1972)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Produktion von Vitamin C-Vorstufen (Anderson <i>et al.</i> , 1985)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Terpenoid-Oxidation (Yamada <i>et al.</i> , 1985)
<i>Corynebacterium sp.</i>	Abbau von Kohlenwasserstoffen (Cardini & Jurtshuk, 1970)
<i>Brevibacterium linens</i>	Käsereifung (Lee <i>et al.</i> , 1985)

Von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung ist die fermentative Herstellung von essentiellen Aminosäuren und Vitaminen, die als Supplemente zur ernährungsphysiologischen Futtermittelaufwertung in großen Mengen in der Landwirtschaft benötigt werden

(Leuchtenberger *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1985). Auch in der Lebensmittelindustrie werden Aminosäuren und Vitamine als Geschmacksverstärker (Na-L-Glutamat, DL-Alanin), Süßstoff (L-Aspartyl-L-Phenylalanin-Mathylester = Aspartam) oder als Antioxidantien (L-Cystein, L-Tryptophan, L-Histidin, Vitamin C) eingesetzt.

Wie in dem oberen Abschnitt beschrieben, sekretiert *C. glutamicum* keine eigenen Proteine mit hydrolytischer enzymatischer Aktivität wie Nukleasen, Glukanasen oder andere. Dies macht das Bakterium zu einem geeigneten Wirt für die Produktion heterologer Exoproteine, da keine störenden Nebenaktivitäten durch homologe Exoproteine auftreten, die die gesuchte Aktivität des Fremdproteins überdecken könnten. Ein weiterer Vorteil der Produktion von heterologen Exoproteinen in *C. glutamicum* liegt darin, daß Corynebakterien keine Protease in das Kulturmedium sekretieren, ganz im Gegensatz zu den klassischen Proteinproduzenten *Bacillus*, *Streptomyces* und *Staphylococcus* (Palva, 1989; Priest, 1977). Dies verhindert, daß die sekretierten Proteine durch endogene Proteasen sofort wieder abgebaut werden. Zudem ist keine der durch *C. glutamicum* sekretierten Substanzen toxisch und da es sowie so nur wenig verschiedene sind, ist die Aufreinigung des gewünschten Produkts vereinfacht.

Trotz des geringen Wissens über die Mechanismen der Translokation von Proteinen in Corynebakterien wurden bereits eine ganze Anzahl von Proteinen aus anderen Organismen in *C. glutamicum* exprimiert und sekretiert (Tabelle B-3).

Tabelle B-3: Heterologe Exoproteine in *C. glutamicum*.

Exoprotein	Ursprungsorganismus	Referenz
Antigen 85A	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Salim <i>et al.</i> , 1997
Protease	<i>Dichelobacter nodosus</i>	Billman-Jacobe <i>et al.</i> , 1995
Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>	Billman-Jacobe <i>et al.</i> , 1995
Gamma-Interferon	Huhn	Billman-Jacobe <i>et al.</i> , 1994
Exoglucanase	<i>Cellulomonas fimi</i>	Paradis <i>et al.</i> , 1987
Endoglucanase A	<i>Cellulomonas fimi</i>	Paradis <i>et al.</i> , 1987
Lipase	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
Nuclease	<i>Staphylococcus aureus</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
Protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
SNase	<i>Staphylococcus aureus</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1992
α -Amylase	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Smith <i>et al.</i> , 1986

α -Amylase	<i>Streptomyces lividans</i>	Cadenas <i>et al.</i> , 1992
α -Amylase	<i>Bacillus subtilis</i>	Ugorcakova <i>et al.</i> , 1996

Molekularbiologische Methoden zur genetischen Manipulation von *Corynebacterium glutamicum*

Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von coryneformen Bakterien bei der Herstellung wirtschaftlich interessanter Verbindungen wie Aminosäuren oder Vitaminen bestand ein großes Interesse von Wissenschaft und Industrie an zuverlässigen und reproduzierbaren, genetischen Manipulationsmethoden für *C. glutamicum*. Im Rahmen der klassischen Stammentwicklung wurde zur Steigerung der Ausbeute des gewünschten Produkts meist eine chemische, ungerichtete Mutagenese mit Ethylmethansulfonat oder Hydroxylamin durchgeführt und die Mutanten anschließend durch Selektion auf Überproduktion isoliert. Der gravierende Nachteil dieser Methode lag darin, daß häufig Mehrfachmutanten auftraten, die neben der erwünschten Mutation noch weitere Gendefekte trugen, deren Einfluß auf den gesuchten Phänotyp oft negativ oder nicht abzuschätzen war.

Erst die genaue Analyse der einzelnen Stoffwechselwege in *C. glutamicum* ermöglichte es, gezielt die metabolischen Routen oder deren Regulation zu beeinflussen. Deshalb wurde das wenig geeignete, ungerichtete Mutagenese-System durch neu entwickelte, gentechnische Methoden für *C. glutamicum* abgelöst (Martin, 1989; Wohleben *et al.*, 1993). Die meisten der derzeit dazu verwendeten Vektoren basieren auf der Replikons der kryptischen Plasmide pBL1 aus *Brevibacterium lactofermentum* (Santamaria *et al.*, 1984) und pHM1519 aus *Corynebacterium glutamicum* (Miwa *et al.*, 1985). Aufbauend darauf wurden zudem *E. coli* - *C. glutamicum* Shuttle-Vektoren konstruiert (Martin, 1989; Wohleben *et al.*, 1993; Kirchner, 1999) sowie Plasmide für spezielle Anwendungen, wie Promotor- oder Terminator-Testvektoren oder Integrations- und Expressionsvektoren (Morinaga *et al.*, 1987; Cadenas *et al.*, 1991; Eikmanns *et al.*, 1991; Bardonet & Blanco, 1991; Schwarzer & Pühler, 1991; Schäfer *et al.*, 1994b). Nach Optimierung von Konjugations- (Schäfer *et al.*, 1990, 1994a) und Elektroporationstechniken (Liebl *et al.*, 1989; Bonassie *et al.*, 1990; Kirchner, 1999) standen effiziente Methoden des DNA-Transfers zur Verfügung. Durch den Einsatz des *sacB*-Gens aus *Bacillus subtilis* (Jäger *et al.*, 1992), welches *C. glutamicum* Saccharose-Sensitivität verleiht, lassen sich positiv-selektionierbare, definierte Deletions- oder Insertionsmutanten

herstellen (Schäfer *et al.*, 1994b), die eine Basis für eingehende molekulargenetische Untersuchungen der zu analysierenden Stoffwechselwege darstellen.

Vergleichsweise wenige Methoden wurden bisher zur Steigerung der Sekretion homo- oder heterologer Proteine beschrieben. Da die beiden Proteine PS1 und PS2 in großen Mengen sekretiert werden, wurde die Verwendung ihrer Signalsequenz als Verfahren zur Steigerung der Sekretion von heterologen Exoproteinen patentiert (Joliff *et al.*, 1993a, b). Auch andere zielsteuernde Signale wie "stop transfer"-Signale wurden bereits für *C. glutamicum* patentiert (Liebl & Sinskey, 1990).

3) "General Secretory Pathway" als System des Proteinexports in Bakterien

Proteintransport in Bakterien

Proteine sind auf Grund ihrer Ladung und Größe nicht in der Lage, durch Diffusion eine cytoplasmatische Membran zu durchqueren. Deshalb erfordert der Export von Proteinen aus der Zelle oder Zellkompartimenten einen energieaufwendigen Prozeß. Im Gegensatz zu eukaryotischen Organismen sind Bakterien nicht zu einem vesikulären Transport befähigt, weshalb sie sich anderer Wege bedienen, um Proteine zu exportieren oder zu sekretieren. Dabei handelt es sich im wesentlichen um drei verschiedene Methoden (Salmond & Reeves, 1993).

Der Proteinexport nach **Typ I** erfolgt durch ABC-Transporter. Er ist spezifisch für bestimmte Proteine wie Hämolyisin in *Escherichia coli* oder Proteasen aus *Erwinia chrysanthemi* (Fath & Kolter, 1993). Der Export über die gesamte Zellhülle erfolgt dabei in einem einzigen Schritt.

Typ II stellt den Signalsequenz-abhängigen Exportweg durch die Cytoplasmamembran dar. Dabei handelt es sich um ein komplexes Mehrkomponenten-System, bestehend aus dem "General Secretory Pathway" (GSP) zur Überwindung der Cytoplasmamembran und, bei Gram negativen Bakterien, dem "Main Terminal Branch" zur Durchquerung der "Outer Membrane" (Pugsley, 1993). Der GSP ist ein ubiquitäres System der Proteintranslokation, das für die Sekretion der Proteine, die Signalsequenzen tragen verwendet wird (Pugsley, 1993).

Bei **Typ III** handelt es sich um die Sekretion von Virulenzfaktoren ohne N-terminale Signalsequenz, wie z.B. "Yops" aus *Yersinia pestis* (Forsberg et al., 1994) oder "Sips" aus *Salmonella*-Spezies (Galan, 1996).

Zusätzlich zu den eben genannten Transportwegen existieren noch weitere Spezialfälle, in denen für bestimmte Proteine spezifische, eigene Transporter bereitstehen. Die Hauptmenge des Exports erfolgt allerdings über den "General Secretary Pathway" (Economou, 1999).

Komponenten des "General Secretary Pathway" in Bakterien

Die meisten Exoproteine und Transmembranproteine werden durch den "General Secretary Pathway" (GSP) sekretiert, der sich in ähnlicher Form in allen Organismen finden läßt (Economou, 1999). Dabei handelt es sich um einen energieabhängigen Prozeß, der durch ATP-Hydrolyse und "proton motive force" angetrieben wird (Economou, 1998). In Gram-positiven Bakterien besteht der GSP aus sechs Hauptkomponenten, den Proteinen SecA, SecD, SecE, SecF, SecG und SecY, bei Gram-negativen liegt zusätzlich noch SecB vor (Freudl, 1992; den Blaauwen & Driessen, 1996; Economou, 1998).

SecA:

Das essentielle, periphere Membranprotein SecA ist der Motor der Translokation und zeigt als einziges Sec-Protein enzymatische Aktivität (Mitchell & Oliver, 1993). SecA weist mehrere konservierte, funktionelle Domänen auf. Eine Signalsequenz-bindende Region verbindet cytosolisches SecA mit dem Präprotein (Kimura *et al.*, 1991). Zwei ATP-bindende Domänen, eine mit hoher Affinität und eine mit niedriger Affinität, stellen die Energie für die Proteintranslokation zur Verfügung, die durch Insertion und Deinsertion von SecA in die Cytoplasmamembran erfolgt (Mitchell & Oliver, 1993; Blanco *et al.*, 1998; Economou & Wickner, 1994). Zusätzlich besitzt das Protein eine Domäne, die für die SecA-Dimerisierung und für die Interaktion des Dimers mit SecY verantwortlich ist (Kunioka *et al.*, 1998; Manting *et al.*, 1997). Die C-terminale Region, die in Gram-negativen Bakterien für die Interaktion mit SecB verantwortlich ist (Kunioka *et al.*, 1998), ist in Gram-positiven Bakterien nicht konserviert.

SecYEG:

Die Membranpore für die Proteintranslokation wird durch die essentiellen Proteine SecY und SecE sowie das nicht-essentielle Protein SecG gebildet (Duong & Wickner, 1997a). Der heterotrimäre Transmembrankomplex besteht aus wahrscheinlich vier SecYEG-Trimeren (Manting *et al.*, 2000) in quasipentagonaler Anordnung (Meyer *et al.*, 1999; Abbildung B-1). Das große, hochkonservierte SecY bildet dabei mit seinen 10 Transmembrandomänen (Tschauder *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1994; Bhattacharyya & Das, 1997) die eigentliche Membranpore. Das kleine Membranprotein SecE dient vermutlich dem Zusammenhalt, da es sowohl mit SecY als auch mit einem weiteren SecE in engem räumlichen Kontakt steht (Harris & Silhavy, 1999; Kaufmann *et al.*, 1999; Kontinen *et al.*, 1996). SecG, das kleinste Sec-Protein, ist zwar nicht essentiell für das Überleben der Zelle, spielt aber eine entscheidende Rolle bei der Proteinsekretion in Abwesenheit der "proton motive force" (Hanada *et al.*, 1996), da es die SecA-Funktion stark stimuliert (Economou *et al.*, 1995; Duong & Wickner, 1997a). Für die Proteinsekretion im allgemeinen scheint die An- oder Abwesenheit von SecG nur von Wichtigkeit zu sein, wenn die Zelle schon durch andere Faktoren in ihrem Wachstum gestört ist (Flower *et al.*, 2000). SecE und SecG assoziieren unabhängig voneinander mit SecY, wobei SecYEG die stabilste Form des Translokasekomplexes darstellt (Homma *et al.*, 1997).



Abbildung B-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Proteintranslokations-Komplexes von *Bacillus subtilis* (Meyer *et al.*, 1999). Deutlich erkennbar ist die quasipentagonale Symmetrie des Translokationskomplexes, bestehend aus SecYEG-Heterotrimeren.

SecDF:

Die Translokase-Untereinheiten SecD und SecF kommen innerhalb der Bakterien in zwei verschiedenen Zustandsformen vor. Während sie bei den meisten als zwei getrennte Polypeptide vorliegen, wie z. B. in *Mycobacterium* (Cole *et al.*, 1998), sind sie bei bestimmten Bakterienspezies zu einem Protein verschmolzen, zum Beispiel in *Bacillus subtilis* (Bolhuis *et al.*, 1999a), *Deinococcus radiodurans* (Bolhuis *et al.*, 1999a) oder *Staphylococcus carnosus* (Kappes & Freudl, 2000). Beide Proteine weisen konserviert sechs

Transmembrandomänen und einen extracytoplasmatischen "Loop" auf (Bolhuis *et al.*, 1999a) und unterstützen den Proteinexport auf verschiedene Weise:

1. Sie regulieren den Insertionszyklus von SecA in die Membran (Duong & Wickner, 1997b).
2. Sie verstärken den Export von Proteinen mit defekter Signalsequenz (Pogliano & Beckwith, 1994a).
3. Der "proton motive force"-betriebene Proteinexport wird gesteigert (Arkowitz & Wickner, 1994).
4. Sie unterstützen in manchen Bakterien die Freisetzung des reifen Proteins von der Membran (Gardel *et al.*, 1990; Matsuyama *et al.*, 1993). Ob sie diese Funktion auch in Gram-positiven Bakterien ausüben, ist unklar, zumindest in *B. subtilis* fehlt diese Aktivität (Bolhuis *et al.*, 1999a).

Wie SecG sind SecD und SecF nicht essentiell für die Proteintranslokation oder das Überleben der Zelle (Matsuyama *et al.*, 1992).

Der GSP in Gram-positiven Bakterien unterscheidet sich von dem der Gram-negativen Bakterien in zwei Punkten. Zum einen weisen nur die Gram-negativen das zusätzliche Protein SecB auf (Fekkes & Driessen, 1999). SecB ist ein für Präproteine spezifisches Chaperon, das mit SecA interagiert (Fekkes *et al.*, 1998). Der zweite wesentliche Unterschied beruht auf der Kompartimentierung der Gram-negativen Bakterien. Der Proteinexport durch das Sec-System transportiert die Proteine lediglich in das Periplasma. Um Proteine in das umgebende Medium zu sekretieren, benötigen die Gram-negativen Bakterien ein zusätzliches Exportsystem, den "Main Terminal Branch", das die Proteine über die "outer membrane" transportiert (Pugsley, 1993).

Neben den zentralen Bestandteilen des GSP, den Sec-Proteinen, sind noch andere Komponenten an dem Export von Proteinen beteiligt. Chaperone wie die Hitzeschock-Proteine DnaK und DnaJ sowie GroES und GroEL erhalten das Präprotein im entfaltenen Zustand, der zur Translokation notwendig ist (Wild *et al.*, 1993; Wild *et al.*, 1996). "Signal recognition particles" erfüllen in Bakterien die gleiche Aufgabe wie in Eukaryoten. Die aus einem Protein- und einem RNA-Anteil bestehenden Moleküle erkennen die Signalsequenz des Präproteins und sorgen für eine korrekte Lokalisation des zu sekretierenden Proteins (Fekkes & Driessen, 1999). Signalpeptidasen, transmembrane Proteasen, trennen das Signalpeptid des Präproteins ab, das anschließend in der Membran oder dem Cytoplasma verdaut wird (Bron *et al.*, 1998; Bolhuis *et al.*, 1999b).

Obwohl die Proteintranslokationsmaschinerie aus Bakterien große strukturelle Ähnlichkeit zu der aus Eukaryoten zeigt (Meyer *et al.*, 1999), weisen nur zwei der Sec-Proteine Homologien in Sequenz und Topologie zu Komponenten des Translokationssystems am endoplasmatischen Reticulum auf. SecY ist homolog zu Sec61p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Esnault *et al.*, 1994) und zu Sec61 α aus Säugetieren (Görlich *et al.*, 1992). SecE zeigt schwache Homologie zu Sss1p aus Hefen und Sec61 γ aus Säugern (Hartmann *et al.*, 1994). Die Proteine SecA, SecG, SecD und SecF sind dagegen bakterienspezifisch (Meyer *et al.*, 1999). Zudem ist der Translokationskomplex in Eukaryoten mit 8,5 nm Durchmesser und einer Porengröße von ca. 2 nm (Beckmann *et al.*, 1997) deutlich kleiner als der prokaryotische, der einen Durchmesser von 10,5 nm und eine Porengröße von ca. 5 nm aufweist (Manting *et al.*, 2000).

Nur wenig ist bekannt über die Regulation der Expression der *sec*-Gene. Studien an mRNA von *sec*-Genen aus *Streptomyces lividans* haben gezeigt, daß der Expressionslevel der *sec*-Gene abhängig von der Wachstums- und Differenzierungsphase der Bakterien ist, aber unabhängig von der Wachstumstemperatur (Morosoli *et al.*, 1999). Die Expressionsrate wird auch durch die verwendete Kohlenstoffquelle beeinflusst. Stehen lediglich polymere Kohlenhydrate zur Verfügung, werden mehr Sec-Proteine synthetisiert, vermutlich um dem gesteigerten Bedarf an Exoenzymen Rechnung zu tragen. Auch die SecA-Synthese in *Bacillus subtilis* ist abhängig von der Wachstumsphase der Bakterien, beim Übergang in die Stationärphase nimmt sie sehr stark zu (Herbort *et al.*, 1999). Auch hier ist die Expression einer Komponente des GSP an den gesteigerten Bedarf an Proteinsekretion gekoppelt. Die Synthese von SecDF in *B. subtilis* ist wie in *S. lividans* abhängig von der Wachstumsphase, der verwendeten Kohlenstoffquelle und dem Wachstumsmedium (Bolhuis *et al.*, 1999a).

Funktion des "General Secretory Pathway" in Gram-positiven Bakterien

Die Proteintranslokation durch die Cytoplasmamembran erfolgt durch einen heterotrimären Transmembrankomplex, bestehend aus den Proteinen SecY, SecE und SecG. Wie in Abbildung B-3 schematisch dargestellt, dimerisiert monomeres, cytosolisches SecA an der Signalsequenz des sich bildenden Präproteins am Ribosom (Kimura *et al.*, 1991) wobei es gemeinsam mit verschiedenen Chaperonen das Präprotein im entfalteten Zustand erhält (Wild *et al.*, 1996). Die Abhängigkeit des Proteinprecursors von SecA bei der Sekretion ist dabei graduell von Protein zu Protein unterschiedlich (Leloup *et al.*, 1999), was vermutlich auf einer individuellen Affinität des Precursors zu SecA beruht.

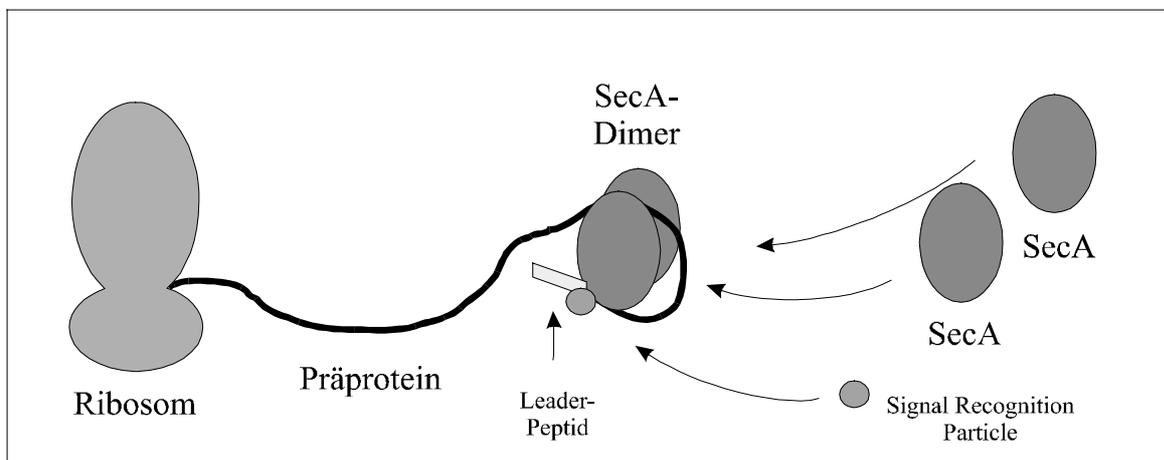


Abbildung B-3: Schematische Darstellung der Dimerisierung von SecA am sich bildenden Präprotein. Auch das "Signal Recognition Particle" bindet am "Leader Peptid"

Wie in Abbildung B-4 gezeigt, integriert sich der Komplex aus SecA und Präprotein sowohl amino- als auch carboxyterminal unter starker Konformationsänderung am SecYEG-Komplex in der Cytoplasmamembran (Eichler & Wickner, 1997). Die Integration von SecA fördert dabei die Entstehung eines funktionellen Translokationskomplexes aus vier SecYEG-Heterotrimeren (Manting *et al.*, 2000). Simultan dazu cointegriert sich die hydrophobe, N-terminale Region des Präproteins, bestehend aus der Signalsequenz (20-30 Aminosäuren), was zur Bildung eines extracytoplasmatischen „Loops“ aus den nachfolgenden 20-30 Aminosäuren des Präproteins führt (Schiebel *et al.*, 1991). Nach Abtrennung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase vom Typ I (Bron *et al.*, 1998) liegt der N-Terminus des Proteins frei.

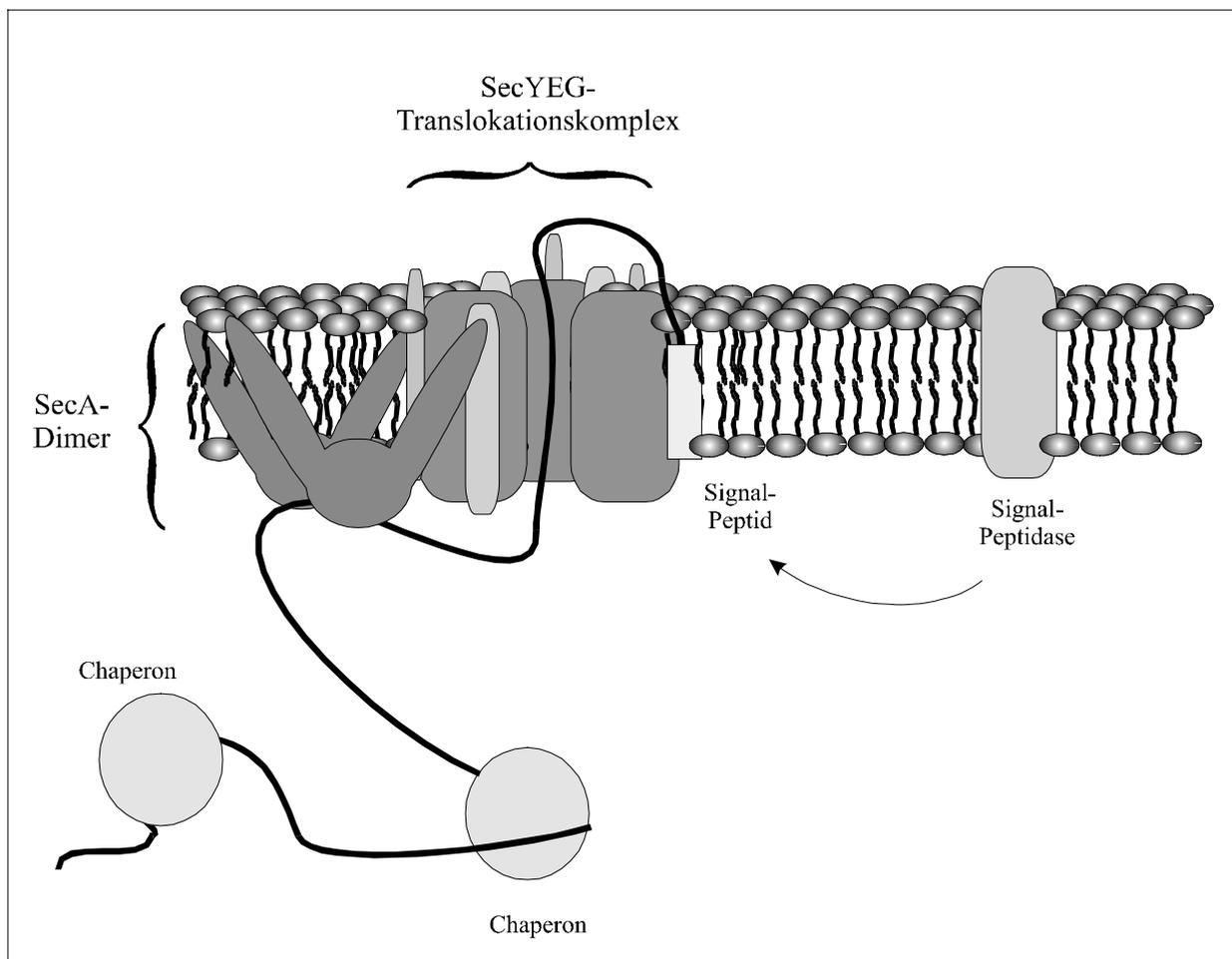


Abbildung B-4: Schematische Darstellung des frühen Zeitpunkt der Proteintranslokation. Der SecA-Präproteinkomplex hat sich unter Konformationsänderung an den SecYEG-Komplex angelagert, das Signalpeptid ist in die Membran inseriert.

Die Translokation des Präproteins durch den Porenkomplex (Abbildung B-5) wird durch zyklische De- und Reintegration von SecA in die Membran unter ATP-Verbrauch angetrieben (Lill *et al.*, 1989; Economou & Wickner, 1994; Karamanou *et al.* 1999). Zusätzlich stark gefördert wird der Transportprozeß durch die Membranpotential-erzeugte "proton motive force" (Shiozuka *et al.*, 1990).

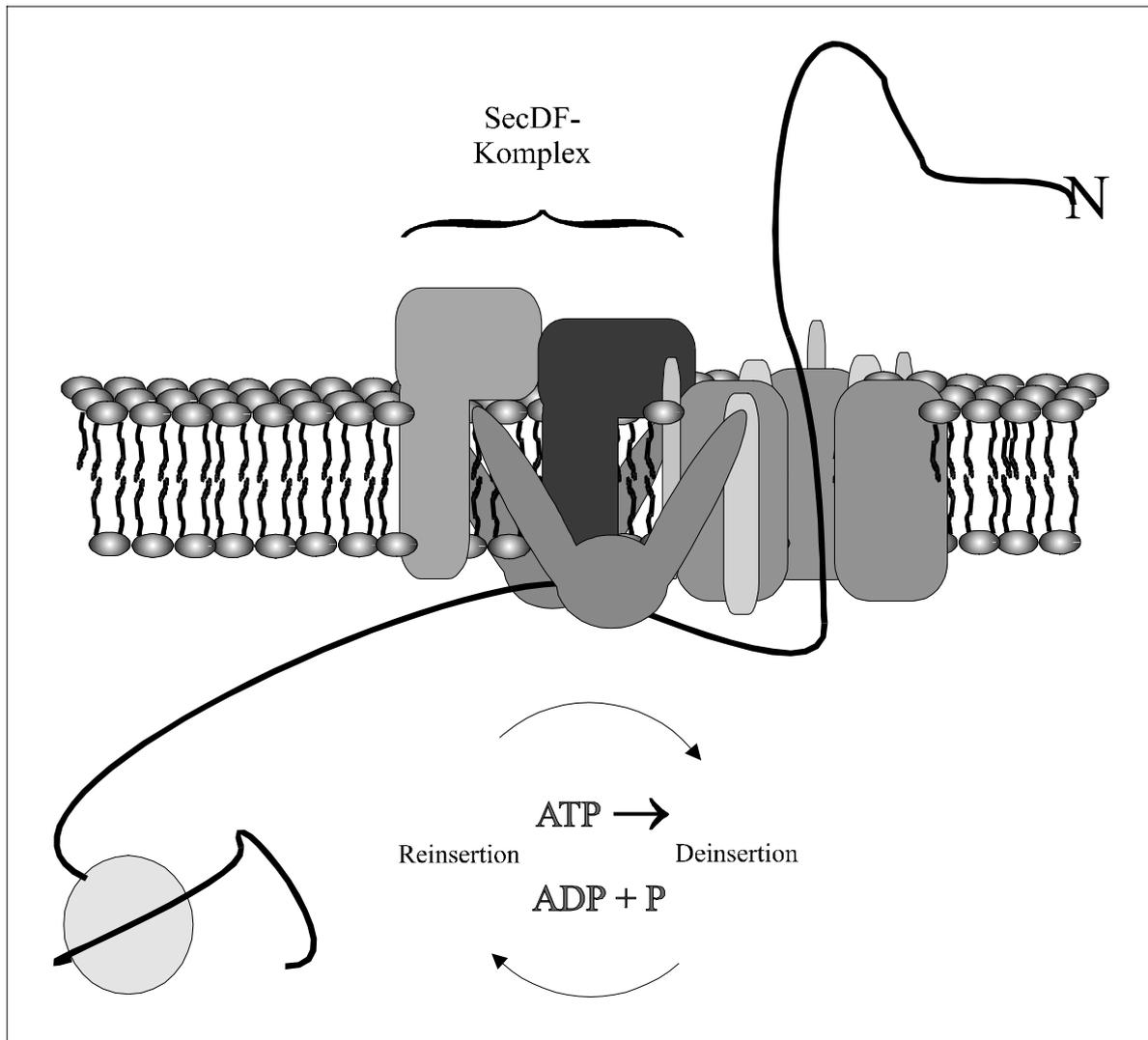


Abbildung B-5: Schematische Darstellung des späten Stadiums der Proteintranslokation. SecA de- und reinsertiert sich zyklisch unter ATP-Verbrauch in die Plasmamembran, das Exoprotein wird dabei durch die Membranpore geschoben. Der Insertionszyklus von SecA wird durch den SecDF-Komplex reguliert.

Nach Abschluß der Translokation liegt SecA wieder als cytosolisches Monomer (Abbildung B-6) vor und das reife Protein löst sich unter Mithilfe des SecDF-Komplexes von der Membran (Matsuyama *et al.*, 1993). Zugleich zerfällt der SecYEG-Translokationskomplex wieder in SecYEG-Heterotrimere (Manting *et al.*, 2000).

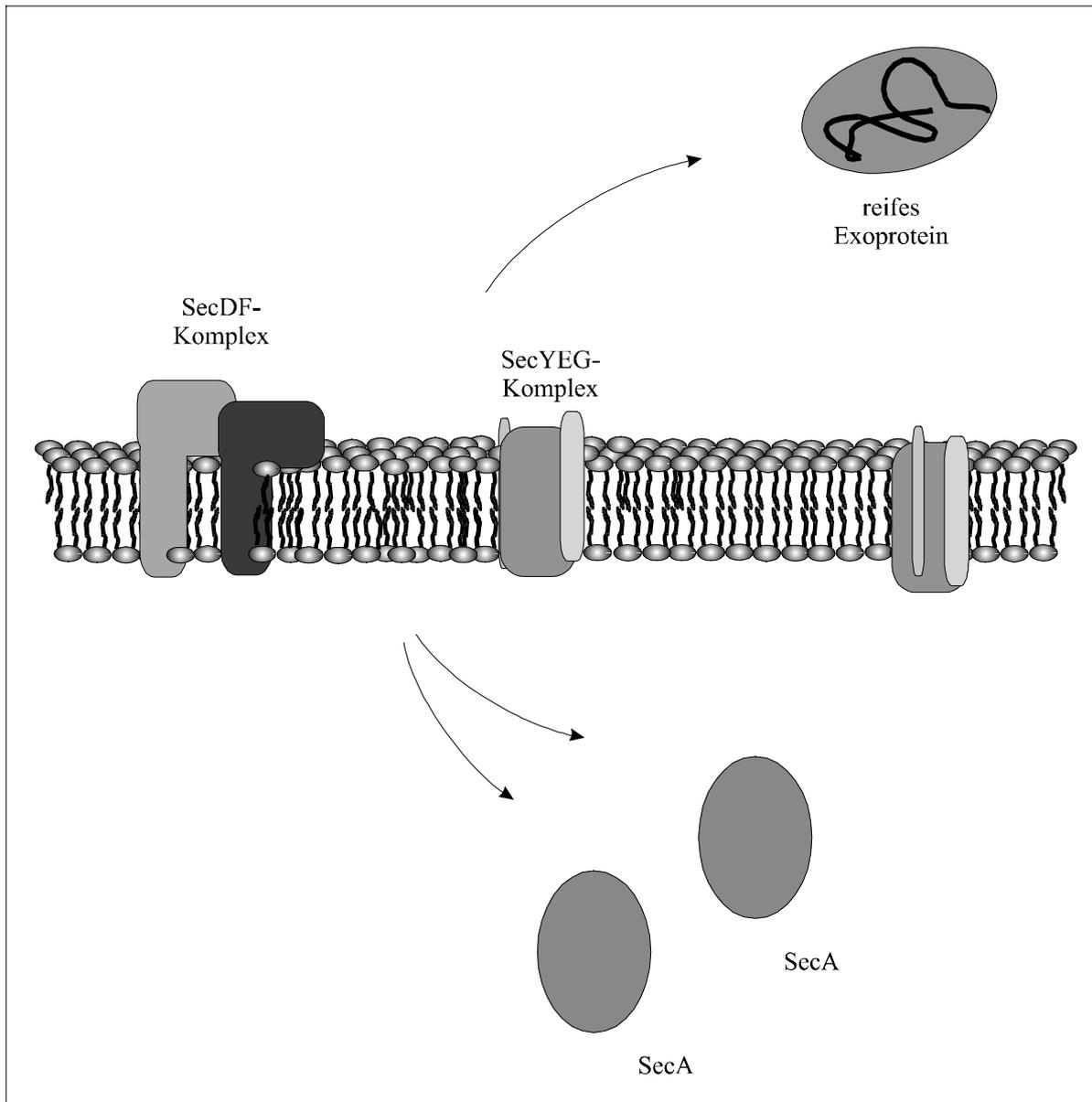


Abbildung B-6: Abschluß der Proteintranslokation. Das reife Exoprotein löst sich von der Cytoplasmamembran, der Translokationskomplex zerfällt in seine Komponenten.

Die Sekretion von Membranproteinen erfolgt prinzipiell nach dem gleichen Schema, benötigt aber nicht den SecDF-Komplex (Duong & Wickner, 1998). Transmembranproteine unterscheiden sich von sekretierten Proteinen durch ein zusätzliches, hydrophobes Segment, die "stop-transfer"-Sequenz (von Heijne, 1994, 1997). Diese Sequenz erfüllt drei Funktionen: Sie stoppt den Transfer des Membranproteins, sie erlaubt eine laterale Freisetzung des Proteins aus dem SecYEG-Komplex und sie gewährleistet den stabilen Einbau in die Membran. Die Arretierung der Translokation ist alleine abhängig von der Aktivität des SecYEG-Komplexes. Die laterale Freisetzung wird durch die Hydrophobizität des "stop-transfer"-Segments selbst gesteuert (Duong & Wickner, 1998).

Der "General Secretory Pathway" in *Corynebacterium glutamicum*

Von den sechs Hauptkomponenten des GSP wurden für *C. glutamicum* bereits vier auf genetischer Ebene beschrieben. Die Gene *secY* und *secA* wurden 1994 bzw. 1999 von Kobayashi *et al.* veröffentlicht. Beide Gene erwiesen sich innerhalb der Bakterien als hoch konserviert. Der 3'-Bereich des Gens *secE* wurde 1994 isoliert und patentiert (Asai *et al.*) und sein Promotor im Rahmen einer Studie über corynebakterielle Promotoren entdeckt (Patek *et al.*, 1996). Vollständig wurde *secE* erst 1998 sequenziert (GenBank AF130462). Die Sequenz von *secG* liegt ebenfalls in der GenBank vor (D14162). Über die Gene *secD* und *secF* lagen bisher keine molekulargenetischen Daten vor. Die Konservierung des GSP innerhalb der Bakterien legte ihr Vorhandensein jedoch nahe (Siefert *et al.*, 1997).

Eine Untersuchung des GSP in *C. glutamicum* wurde bisher nicht durchgeführt. Allerdings wurde der Einfluß der "proton motive force" und des Zustands der Membranlipide auf die Sekretion eines homologen Proteins PS1 untersucht (Bayan *et al.*, 1993). Ergebnis dieser Untersuchung war, daß eine chemische Entkopplung von $\Delta\mu_H$ die Exportrate von PS1 minimiert. Werden die Membranlipide parallel dazu noch durch einen "Temperatur-Shift" in einen Zustand der Unordnung gebracht, wird die Sekretion von PS1 vollständig inhibiert. Weiteres zur Funktion des GSP in *C. glutamicum* ist bisher nicht bekannt.

Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des "General Secretory Pathway" in *C. glutamicum*. Dazu mußten zunächst alle corynebakteriellen *sec*-Gene analysiert werden, auch die bis dahin unbekannt Gene *secD* und *secF*. Anschließend wurde die Frage untersucht, wie sich Manipulationen wie Mutation und Überexpression von Komponenten des GSP auf *C. glutamicum* auswirken und ob diese Manipulationen ein geeignetes Mittel sind, die Proteinsekretion zu steigern.

Daraus ergaben sich folgende Aufgaben: Erstens, die Klonierung und Analyse aller *sec*-Gene aus *C. glutamicum*, wobei *secA* und *secY* zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt waren und *secE* und *secG* während meiner Arbeit publiziert wurden. Zweitens die Herstellung von Mutanten und die Überexpression von *sec*-Genen und die Untersuchung der Auswirkung dieser Manipulationen auf die Sekretion homologer Proteine. Drittens die Konstruktion eines Reportersystems zur Analyse der Proteinsekretion, also die Expression eines heterologen Exoenzyms mit quantifizierbarer Aktivität, da *C. glutamicum* selbst keine enzymatisch aktiven Proteine in das Kulturmedium sekretiert. Viertens und letztens sollten die *sec*-Mutanten und Überproduzierer mit diesem Reportersystem. untersucht werden.

C Material und Methoden

Die in diese Arbeit eingesetzten Medien und Chemikalien wurden in p.A. Qualität oder in größerer Reinheit eingesetzt und von den üblichen Herstellern bezogen. Substanzen ohne Herstellerangaben wurden von der Firma Merck bezogen.

1 Material

1.1 Bakterienstämme und Plasmide

1.1.1 Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α MCR	<i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>lacZ</i> Δ M15 <i>hsdR recA1</i>	Grant et al., 1990
S17-1	Mobilisierbarer Donorstamm mit integriertem RP4-2 Derivat, <i>recA</i>	Simon et al., 1983
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	ATCC ^a
RES167	Restriktionsdefekte Mutante von ATCC 13032, Δ (<i>cglIM-cglIR-cglIIR</i>)	Uni Bielefeld
IAE	RES167 <i>dciAE</i> :: pCR2.1, Km ^R	diese Arbeit
INTD	RES167 <i>secD</i> :: pCR2.1, Km ^R	diese Arbeit
INTF	RES167 <i>secF</i> :: pCR2.1, Km ^R	diese Arbeit
INTG	RES167 <i>secG</i> :: <i>cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
IAmy	RES167 <i>dciAE</i> :: pIAmy1, Km ^R	diese Arbeit
IAmy2	RES167 <i>dciAE</i> :: pIAmy2, Tc ^R	diese Arbeit

ATCC: American Type Culture Collection

1.1.2 Plasmide

Plasmide	relevante Eigenschaften	Referenz
pUC19	<i>E. coli</i> Klonier- und Sequenziervektor, <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α , Ap ^R	Yanisch-Perron, 1985
pK18 <i>mob</i>	mobilisierbarer <i>E. coli</i> Klonier- und Sequenziervektor, <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α , Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994b
pK18 <i>mob sacB</i>	mobilisierbarer <i>E. coli</i> Vektor, <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α , <i>sacB</i> , Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994b
pEC31	pSVB31, trägt das Cm ^R -Gen <i>cmx</i> des Plasmids pTP10, Cm ^R , Ap ^R	Uni Bielefeld
pCV22	<i>C. glutamicum</i> Vektor, Km ^R	Uni Bielefeld
pCR2.1	<i>E. coli</i> Klonier- und Sequenziervektor für PCR-Produkte, <i>mcs</i> , <i>lacZ</i> α , Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
pXK99A	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, <i>trc</i> -Promotor, Km ^R	Uni Bielefeld
pXT99A	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, <i>trc</i> -Promotor, Tc ^R	Uni Bielefeld
pEC-XK99A	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Expressionsvektor, <i>trc</i> -Promotor, Km ^R	Uni Bielefeld
pEC-XC99A	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Expressionsvektor, <i>trc</i> -Promotor, Cm ^R	Uni Bielefeld
pEC-XT99A	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Expressionsvektor, <i>trc</i> -Promotor, Tc ^R	Uni Bielefeld
pSecA	pEC-XT99 mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secA</i>	diese Arbeit
pSecD	pEC-XT99 mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secD</i>	diese Arbeit
pSecE	pEC-XT99 mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secE</i>	diese Arbeit
pSecF	pEC-XT99 mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secF</i>	diese Arbeit
pSecG	pEC-XT99 mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secG</i>	diese Arbeit
pSecY	pEC-XT99 mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secY</i>	diese Arbeit
pSecDF	pEC-XK99 mit <i>SalI</i> Fragment von pRRES, enthält <i>C. glutamicum secD</i> und <i>secF</i> , Km ^R	diese Arbeit
pSecDF2	pEC-XK99 mit <i>SalI</i> Fragment von pRRES, enthält <i>C. glutamicum secD</i> und <i>secF</i> , Cm ^R	diese Arbeit
pSecEDF	pSecDF mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secE</i> , Km ^R	diese Arbeit
pSecYDF	pSecDF mit <i>EcoRI</i> PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secY</i> , Km ^R	diese Arbeit
pLW60	pK18 <i>mob</i> , enthält ein 0,8 kb <i>dciAE</i> Fragment, Km ^R	Wehmeier <i>et al.</i> , (1998)
pInsAE	pCR2.1, enthält ein 0,8 kb <i>BamHI/HindIII-dciAE</i> Fragment, Ap ^R , Km ^R	diese Arbeit
pRRES	pCR2.1, enthält ein 9,8 kb <i>EcoRV/SspI</i> Fragment von <i>C. glutamicum</i> , Ap ^R , Km ^R	diese Arbeit
pInsD	pCR2.1, enthält ein internes 0,6 kb PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secD</i> , Ap ^R , Km ^R	diese Arbeit
pInsF	pCR2.1, enthält ein internes 0,6 kb PCR-Amplifikat von <i>C. glutamicum secF</i> , Ap ^R , Km ^R	diese Arbeit
pInsG	pK18 <i>mob sacB</i> mit 1,3 kb PCR-Amplifikat mit zentralem <i>secG::cmx</i> , Km ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pDM201- <i>celA</i>	<i>Clavibacter michiganensis/E. coli</i> - Shuttle-Vektor pECM2 mit <i>celA</i> auf <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment, Km ^R , Cm _R	Meletzus <i>et al.</i> , (1992)
pCel10	pEC31, Austausch der Cm-resistenz durch <i>celA</i> auf <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment, Ap ^R	diese Arbeit
pCel20	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor, aus <i>SalI</i> -kloniertem pCel10 und pCV22, Ap ^R , Km ^R	diese Arbeit
pULMJ95	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor mit promotorlosem α -Amylase-Gen <i>amy</i> , Km ^R	Cadenas <i>et al.</i> , (1996)
pAmy	pEC-XT99 mit <i>EcoRI-Ecl136II amy</i> unter Kontrolle des <i>trc</i> -Promotors, Tc ^R	diese Arbeit
pIAmy1	pXK99 mit <i>EcoRI-Ecl136II amy</i> unter Kontrolle des <i>trc</i> -Promotors, Km ^R	diese Arbeit
pIAmy2	pXT99 mit <i>EcoRI-Ecl136II amy</i> unter Kontrolle des <i>trc</i> -Promotors, Tc ^R	diese Arbeit

1.2 Nährmedien und Zusätze

Falls nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf 1 l deionisiertes H₂O.

1.2.1 Nährmedien

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

10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
1 g Glucose-Monohydrat für *E. coli*
5 g Glucose-Monohydrat für *C. glutamicum*
pH 7,2

TYPS-Vollmedium (Amylase Testmedium)

5 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
5 g Peptone
10 g Stärke (löslich)
pH 7,2

SOC-Medium (Regenerationsmedium)

20 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
4 g Glucose-Monohydrat
600 mg NaCl
180 mg KCl
2 g MgCl * 6 H₂O
2,3 g MgSO₄ * 7 H₂O

BHIS-Medium

37 g Brain-Heart-Infusion
91 g Sorbitol

Minimalmedium CGXII (nach Keilhauer *et al.*, 1993)

20 g (NH ₄) ₂ SO ₄	Spurenelemente-Stammlösung:
5 g Harnstoff	1 g FeSO ₄ * 7 H ₂ O
1 g K ₂ HPO ₄	1 g MnSO ₄ * 7 H ₂ O
0,25 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
42 g MOPS	0,2 g CuSO ₄
1 ml Spurenelement-Lsg.	2 mg NiCl ₂
1 ml 1 %ige CaCl ₂ -Lösung	in 100 ml H ₂ O dest. lösen
0,5 mg Biotin	

in 750 ml H₂O lösen, nach dem Autoklavieren zu je 45 ml zugeben:
60 µl Protocatechusäure (30 mg/ml EtOH), sterilfiltriert
5 ml Glucose (55% w/v), autoklaviert
10 µl Thiamin (2 mg/ml), sterilfiltriert
mit H₂O auf je 60 ml auffüllen

Minimalmedium MM1 (nach Katsumata *et al.*, 1984, modifiziert)

10 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 g Harnstoff 1 g K ₂ HPO ₄ 0,4 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O 1 ml Spurenelement-Lsg. 0,5 mg Biotin in 750 ml H ₂ O lösen, nach dem Autoklavieren zugeben: 10 g Stärke (löslich), in 250 ml H ₂ O dest., autoklaviert. 10 µl Thiamin (2 mg/ml), sterilfiltriert	Spurenelemente-Stammlösung: 0,2 g FeSO ₄ * 7 H ₂ O 0,2 g MnSO ₄ * 7 H ₂ O 5 g NaCl in 100 ml H ₂ O dest. lösen
---	--

Festmedien

Vor dem Autoklavieren werden den entsprechenden Flüssigmedien 16 g/l Agar zugegeben.

1.2.2 Zusätze**Antibiotika**

Die jeweiligen Antibiotika wurden sterilfiltriert und den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Antibiotikum	Abk.	Lösungsmittel	<i>E. coli</i> (µg/ml)	<i>C. glutamicum</i> (µg/ml)
Ampicillin	Ap	20 % Ethanol	100	-
Kanamycin	Km	dest. H ₂ O	50	25
Chloramphenicol	Cm	98 % Ethanol	50	10
Tetracyclin	Tc	50 % Ethanol	5	5
Nalidixinsäure	Nx	0,1 N NaOH	50	50

Saccharose

als autoklavierte Stammlösung zusetzen.

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

20 mg/ml Stammlösung in deionisiertem Dimethylformamid, bei -20°C lagern
 2 ml zu 1 l Medium geben oder 50 µl pro Agarplatte ausspateln

IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid)

0,1 M IPTG in H₂O dest. lösen und in 1 ml Aliquots bei -20°C lagern

1.3 Lösungen und Puffer

1.3.1 Lösungen für DNA-Isolierung, -Reinigung und –Bearbeitung

20 % SDS

20 % (w/v) in H₂O dest., ü/N rühren lassen

RNAse

10 mg/ml RNAse in H₂O dest. lösen und 15 min kochen, um DNAsen zu zerstören
bei –20°C lagern

P1 (4°C)

50 mM Tris base
10 mM EDTA * 2 H₂O
in H₂O dest. lösen, mit HCl auf pH 8,0 einstellen und auf 1 l mit H₂O dest. auffüllen, autoklavieren
100 µg/ml RNAse zugeben

P2 (RT)

0,2 M NaOH
1 % (w/v) SDS
in sterilem H₂O dest. lösen

P3 (4°C)

3 M KAcetat
mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen

Phenol/Chloroform

1:2 Mischung von Phenol und Chloroform

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
in H₂O dest. lösen, pH 7,5

TA-React (10-fach)

330 mM Tris-Acetat
660 mM KAcetat
100 mM MgAcetat
5 mM Dithiothreitol
1 mg/ml BSA
pH 7,5

1.3.2 Lösungen und Puffer für die Eckhardt-Lyse

TES-Puffer

50 mM Tris-HCl
5 mM EDTA
50 mM NaCl

in H₂O dest. lösen, mit 1 N NaOH auf pH 8,0 einstellen

TA-Puffer

40 mM Tris-HCl
10 mM Na-Acetat
1 mM EDTA

in H₂O dest. lösen, mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen

E-1-F-Lösung

25 % Saccharose
3 % Ficoll 400

in TA-Puffer ansetzen, mit 1 N NaOH auf pH 8,4 einstellen, autoklavieren
jeweils frisch zugeben:

2 µl RNase A (10 mg/ml)
2 mg/ml Lysozym

Agarose

0,8 % Agarose (w/v)
0,2 % SDS (w/v)

in TA-Gelpuffer aufkochen, bis die Agarose vollständig gelöst ist, bei 60°C lagern

1.3.3 Lösungen und Puffer für DNA-Gelelektrophorese

Agarose

0,8 % Agarose (w/v)

in TA-Gelpuffer aufkochen, bis die Agarose vollständig gelöst ist, bei 60°C lagern

Bromphenolblau-Ladungspuffer

50 % Glycerin (w/v)
1 mM EDTA
0,05 % Bromphenolblau

autoklavieren

Ethidiumbromid-Färbelösung (EtBr)

1 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O

0,5 x TBE-Puffer (Sequenzierung)

12,11 g Tris-base
5,13 g B(OH)₃
0,37 g EDTA

in 2 l Millipore H₂O lösen

1.3.4 Lösungen für DNA-Transfer

TG-Puffer

1 mM Tris
10 % Glycerin
pH7,5
in H₂O bidest.

CaCl₂/PEG-Lösung (Schnelltransformation)

0,1 M CaCl₂
10 mg/ml PEG 6000
pH 8,0

15 % Glycerin

100 ml Glycerin (87%) in 480 ml H₂O dest. lösen

1.3.5 Lösungen und Puffer für Vakuum-Blot und Southern-Hybridisierung

Lösung A (Depurinierung)

0,25 M HCl

Lösung B (Denaturierung)

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
jeweils frisch 1:2 mischen

Lösung C (Neutralisierung)

1 M Tris
2 M NaCl
pH 5,0

20fach SSC (Transfer)

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
pH 6,7

Vorhybridisierungslösung

25 ml 20fach SSC
10 ml 10fach Blocking Reagenz
0,33 ml 30 % N-Lauroylsarkosin (= Sarkosyl)
0,1 ml 20 % SDS
mit H₂O dest. auf 100 ml auffüllen und bei -20°C lagern

Hybridisierungslösung

8 ml Vorhybridisierungslösung
markierte Probe
mischen, bei -20°C lagern

Blocking-Reagenz

10 g Blocking-Reagenz
in 100 ml Puffer 1 kurz aufkochen, autoklavieren und bei 4°C lagern

Waschlösung A

100 ml 20fach SSC
5 ml 20 % SDS
mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen

Waschlösung B

10 ml 20fach SSC
5 ml 20 % SDS
mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen

Puffer 1

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
0,175 M NaOH-Plätzchen (=7,0g)
in H₂O dest. lösen, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

Puffer 2

1 % Blocking Reagenz (w/v; entspricht 1/10 Volumen von der 10 %igen Stammlösung)
in Puffer 1 lösen

Puffer3

0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
20 mM MgCl₂ * 6 H₂O
in H₂O dest., nicht autoklavieren, pH 9,5

Antikörperkonjugat-Lösung

4 µl Anti-DIG-AP-Konjugat
20 ml Puffer 2

Färbelösung

45 µl NBT (Nitroblau-Tetrazolium-Salz) –Lösung (75 mg/ml,
in 70 % Dimethylformamid)
35 µl X-Phosphat-Lösung (5-Brom-5-Chlor-Indolylphosphat-Toluidin-Salz)
10 ml Puffer 3
jeweils frisch ansetzen, Färbung bei Dunkelheit (lichtempfindlich)

Denaturierungslösung 1 (Koloniehybridisierung)

0,5 N NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung 2 (Koloniehybridisierung)

1,0 M Tris-HCl, pH 7,0
1,5 M NaCl

1.3.6 Lösungen und Puffer für Zellaufschluß, Proteinextraktion und Enzymtests

Aufschlußpuffer

49,7 ml 1M K_2HPO_4
50,3 ml 1M KH_2PO_4
mit H_2O dest. auf 1 l auffüllen, autoklavieren
0.5 mM Dithiothreitol (DTT) zugeben

Waschpuffer

60 mM Tris-HCl
pH 6,8

Extraktionspuffer (für S-Layer Proteine)

60 mM Tris-HCl
4 % SDS
pH 6,8

1.3.7. Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Proteinfärbung

30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrlamid Stammlösung

30 g Acrylamid
0,8 g N,N-Methylen-Bisacrylamid
in 100 ml H_2O dest. lösen und sterilfiltrieren
bei 4°C im dunkeln lagern

4fach Trenngelpuffer

91 g Tris-base
0,4 % SDS (w/v)
in 300 ml H_2O dest. lösen, mit 1 N NaOH auf pH 8,8 einstellen, auf 500 ml auffüllen und bei 4°C lagern

4fach Sammelgelpuffer

6,05 g Tris-base
0,4 % SDS (w/v)
in 40 ml H_2O dest. lösen, mit 1 N HCL auf pH 6,8 einstellen auf 100 ml auffüllen und bei 4°C lagern

Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS (w/v)

6fach Probenpuffer

7 ml 4fach Sammelgelpuffer
3,6 ml Glycerol
1 g SDS
0,93 g DTT
1,2 mg Bromphenolblau
mit H_2O dest. auf 10 ml auffüllen und in 0,5 ml Aliquots bei -70°C lagern, Aliquot nach Gebrauch verwerfen

Fixierlösung

50 ml Eisessig
150 ml Ethanol
mit H₂O dest. auf 500 ml auffüllen

„Coomassie Brilliant Blue“-Färbung

2 g Coomassie Brilliant Blue R 250
0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250
425 ml Ethanol
50 ml Methanol
100 ml Eisessig
425 ml H₂O dest.
unter Rühren ü/N lösen, gegebenenfalls vor Gebrauch filtrieren

Schnell-Entfärber

450 ml Ethanol
100 ml Eisessig
450 ml H₂O dest.

Entfärber

7 % Essigsäure (w/v)
in H₂O dest.

1.3.8 Lösungen und Puffer zur Quantifizierung reduzierender Zucker

Probenpuffer (für Amylase-Assay)

4,9 ml 1M K₂HPO₄
5,0 ml 1M KH₂PO₄
mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Dinitrosalicylsäure-Reagenz

1 g Dinitrosalicylsäure
20 ml NaOH
50 ml H₂O dest.
unter erwärmen lösen
30 g K-Na-Tartrat
mit H₂O dest. auf 100 ml auffüllen

1.4 Enzyme, Chemikalien und anderes Material

1.4.1 Enzyme und Längenmarker

DNA molecular weight marker	Boehringer
Mark12 wide range protein standard	Boehringer
Klenow-DNA-Polymerase	Boehringer
Lysozym	Serva
Pronase E	Serva
Restriktions-Endonukleasen	Boehringer, BRL, Pharmacia, Stratagene

Ribonuclease A (RNase)	Serva
Shrimp Alkalische Phosphatase	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Boehringer
<i>taq</i> -Polymerase	Gibco-BRL

1.4.2 Substanzen

Nicht aufgeführte Substanzen wurden von der Firma Merck bezogen

Agar	Gibco-BRL
Agarose	Gibco-BRL
Antibiotika	Sigma, Serva
Bindesilan	Pharmacia
Biotin	Sigma
Bromphenolblau, Na-Salz	Serva
CM-Cellulose	Sigma
Dinitrosalicylsäure	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
Dye-Reagent Concentrate	BioRad
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Pharmacia
Ficoll 400	Serva
Hefe-Extrakt	Difco
Isopropanol	Sigma
Long-Ranger Gel Solution	Riedel-de-Haen
Lugolsche Lösung	Sigma
Luria Bertani Broth Base/Agar	Gibco-BRL
<i>Micrococcus lysodeicticus</i> (lyophilisiert)	Sigma
Milchpulver	Glücksklee
Morpholinopropansulfonsäure (mops)	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
N-Laurylsarkosin-Na-Salz	Serva
Nukleotide	Boehringer
Pepton	Difco
Phenol	Roth
Ponceau-S	Sigma
Protocatechuesäure	Sigma
Rinder Serumalbumin (BSA)	Serva
Sephadex G50 Medium	Pharmacia
Stärke, löslich, ACS-Reagenz	Sigma
Stärke, löslich, Kartoffel	Sigma
Thiamin	Sigma
Tris	Sigma
Trypton	Difco
Tween80	Sigma
X-Gal	Gibco-BRL

1.4.3 Materialien

3MM Papier	Whatman
Elektroporations-Küvetten (0,2 cm)	BioRad
Hybond-N Blot-Nylon-Membran	Amersham
Nitrocellulose Filter	Sartorius
Polaroid Filme 667, 665	Polaroid

Sterilfilter Millex GS 0,22 µm	Millipore
RiboLyser Tubes Blue	Hybaid
Glasperlen (Ø 0,1 mm)	Retsch

1.4.4 Kits

Cy5-AutoRead Sequencing Kit	Pharmacia
DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive	Boehringer
Nucleotrap/NucleotrapCR Extraktkit	Macherey-Nagel
Original TA Cloning Kit	Invitrogene
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Minprep Kit 250	Qiagen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer sequencing kit	Amersham

1.4.5 Geräte

A.L.F. Express DNA sequencer	Pharmacia
Biofuge 15	Heraeus
DC Power Supply 5004	Labor Technik Barkey
Feinwaagen	Satorius
Gene Pulser, Pulse Controller	BioRad
Hybridisierungssofen (Roller)	Bachofer
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann
Luftschüttler	New Brunswick
PCR-Thermal- Cycler PTC-100	MJ Research Inc.
pH-Meter	Knick
Photometer LKB Biochrom 4060	Pharmacia
Polaroid	Polaroid
SDS-Gelkammer Biometra G41	Biometra
Tischzentrifuge	Hermle
UV-Transilluminator	UVP Inc.
VacuGene Pump	Pharmacia Biotech
Videoprinter P67E	Mitsubishi
Wasserbäder	Kottermann

Rotorbeschleunigung

Umdrehung pro min (rpm)	Beschleunigung in Kühlzentrifuge J2-21 (g)		
	JA17-Rotor	JA14-Rotor	JA10-Rotor
6000	4960	5520	6370
8000	8820	9820	
10000	13800	15300	

2 Mikrobiologische Methoden

2.1 Kultivierung von Bakterien

Corynebacterium glutamicum und *Escherichia coli* werden auf Festmedium durch Einzelkolonieausstrich auf den entsprechenden Medien angezogen und anschließend im Brutschrank inkubiert. *E. coli* wird dabei über Nacht bei 37°C und *C. glutamicum* für 2 Tage bei 30°C angezogen. Die Platten-Kulturen werden bei 4°C gelagert und sollten für *E. coli* jeden Monat und für *C. glutamicum* alle 3-4 Monate erneuert werden. Die Stammhaltung erfolgt für alle Stämme bei 4°C auf Vollmedium-Platten, die Stammkonservierung in Glycerinkulturen, die bei -20°C gelagert werden. Die Anzucht rekombinanter oder plasmidtragender Stämme erfolgt immer unter selektiven Bedingungen.

Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgt durch die Beimpfung mit einer Einzelkolonie von einer frischen Festmedium-Kultur. Kleine *E. coli* Kulturen bis 10 ml werden in Reagenzgläsern im Rotationsschrank gezüchtet, größere bis 250 ml in Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei 250 rpm und 37°C. Flüssigkulturen von *C. glutamicum* werden immer in Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei 150-200 rpm und 30°C inkubiert.

2.2 Bestimmung des Bakterientiters

Die Bestimmung des Wachstums der Bakterien erfolgt durch Messung der optischen Dichte (o.D.) einer Kultur bei einer Wellenlänge von $\lambda=580$ nm, steriles Flüssigmedium dient dabei als Referenz. Eine o.D.₅₈₀ von 1 entspricht ca. 2×10^8 Zellen/ml für *E. coli* bzw. 1×10^8 Zellen/ml für *C. glutamicum*. Zur Bestimmung des Lebendtiters werden Verdünnungsreihen der Kulturen angelegt, ausplattiert und inkubiert. Die Lebendzellzahl errechnet sich aus der Anzahl der Kolonien multipliziert mit der Verdünnungsstufe.

2.3 Glycerin-Kulturen

Glycerin-Kulturen dienen der dauerhaften Lagerung von Bakterien. Dazu werden Bakterien von einer frischen Festmedium-Kultur mit einer sterilen Glaspipette abgenommen, in einem Eppendorf-Gefäß in 250 µl Vollmedium resuspendiert und mit 500 µl 87 %igem Glycerin durchmischt. Die Kulturen sind für mehrere Jahre bei Lagerung bei -20°C haltbar.

Zur Anzucht der Stämme aus einer Glycerin-Kultur heraus werden 10 µl auf Festmedium so ausplattiert, das Einzelkulturen wachsen.

3 Genetische Methoden

3.1 Isolierung von DNA

3.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung durch alkalische Lyse

(nach Ish-Horowicz & Burke, 1981)

Bei der alkalischen Lyse wird die Cytoplasmamembran der Bakterienzelle durch NaOH in Kombination mit Detergenzien zerstört und der Zellinhalt freigesetzt. Bei gram-positiven Bakterien wird zuvor die Zellwand mit Lysozym abgebaut. Aufgrund des hohen pH-Werts denaturiert die zelluläre DNA. Die Absenkung des pH-Werts durch Zugabe von Na-Acetat führt zur Renaturierung der Plasmid-DNA in ihre superhelicale Form, die chromosomale DNA hingegen vernetzt bei diesem Vorgang und kann zusammen mit den ausgefallenen Proteinen aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Die Plasmid-DNA wird anschließend durch Alkohol-fällung gereinigt. Lösungen: siehe 1.3.1.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

- antibiotikumhaltiges LB-Medium beimpfen und ü/N bei 37°C inkubieren
- 5 ml Kultur bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugieren
- alternativ: Bakterienrasen einer frischen LB-Agarplatte abkratzen
- Bakterien in 200 µl P1-Lösung resuspendieren, in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zugabe von 400 µl P2-Lösung, Eppi sofort mehrfach invertieren
- 340 µl P3-Lösung hinzugeben, Eppi sofort mehrfach invertieren
- 20 min zentrifugieren (15000 rpm)
- Überstand in ein neues Eppi überführen und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzen, mehrfach invertieren
- 30 min bei 15000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol waschen
- 5 min zentrifugieren, Überstand verwerfen
- DNA-Pellet 5 min bei 60°C trocknen
- in 50 µl sterilem H₂O dest. aufnehmen und 10 min bei 65°C lösen

Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum*

- - antibiotikumhaltiges LB-Medium beimpfen und ü/N bei 30°C inkubieren
- 10 ml Kultur bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugieren
- Zell-Pellet in 1 ml TES resuspendieren, in ein Eppi überführen, abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- alternativ: Bakterienrasen einer frischen LB-Agarplatte abkratzen
- Lysozym-Behandlung: Zellen in 200 µl P1-Lösung mit 20 mg/ml Lysozym resuspendieren und 2-3 h bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 400 µl P2-Lösung, Eppi sofort mehrfach invertieren
- 340 µl P3-Lösung hinzugeben, Eppi sofort mehrfach invertieren
- 20 min zentrifugieren (15000 rpm)
- Überstand in ein neues Eppi überführen und mit 500 µl Phenol/Chloroform mischen
- 3 min zentrifugieren, die obere, klare Phase in ein neues Eppi überführen und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzen.
- alle weiteren Schritte durchführen wie für *E. coli* beschrieben

Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit

(nach Qiagen Manual)

Der Qiagen Plasmid Mini Kit dient zur Isolierung ausreichender Mengen hoch reiner Plasmid-DNA zur Sequenzierung mit dem A.L.F. Express DNA-Sequencer. Bei dieser, auf der alkalischen Lyse beruhenden Methode wird die DNA zur Reinigung an eine Anionenaustauscher-Säule gebunden. Dabei werden Proteine, Polysaccharide, Metabolite und kurze Oligonucleotide durch Waschung mit 1 M NaCl entfernt. Die Plasmid-

DNA wird mit einem Puffer erhöhter NaCl-Konzentration (1,25 M) eluiert. Während der Präparation ist darauf zu achten, daß die Tip-20 Säulen weder trockenfallen noch eine Durchmischung der Wasch- und Eluationslösungen erfolgt.

- besonders dicke, selektive LB-Agarplatten ohne Glucose gießen
- Bakterienrasen einer frischen ü/N Platte abkratzen
- Zellen in 500 µl P1/RNase A resuspendieren
- 500 µl P2-Lösung zugeben, Eppi mehrfach invertieren, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 500 µl P3-Lösung zugeben, Eppi mehrfach invertieren
- 20 min bei 15000 rpm zentrifugieren
- Equilibrierung der Tip-20 Säule mit 1 ml QTB-Puffer
- Überstand des Lyse-Ansatzes auf die Säule geben und durchlaufen lassen
- Säule dreimal mit 1 ml QC-Puffer waschen
- DNA mit 800 µl QF-Puffer eluieren
- mit 700 µl Isopropanol mischen, 30 min bei 15000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol waschen, trocknen und in 20 µl sterilem H₂O resuspendieren

Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Minprep Kit 250

(nach Qiagen Manual)

Die Isolierung von hoch reiner Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Minprep Kit 250 zur Sequenzierung auf LiCor- oder ABI-Sequencern beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Plasmid-DNA wird dabei an eine Silica-Gel Membran gebunden. Da die DNA mit sterilem H₂O bidest. eluiert wird, ist eine Entsalzung durch Ethanol-Präzipitation nicht nötig.

- Bakterienrasen einer frischen ü/N Agarplatte abkratzen
- Zellen in 250 µl P1/RNase A resuspendieren
- 250 µl P2-Lösung zugeben, Eppi mehrfach invertieren, nicht mehr als 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 350 µl N3-Lösung zugeben, Eppi mehrfach invertieren
- 10 min bei 15000 rpm zentrifugieren
- QIAprep spin Säule in ein 2,2 ml Sammelgefäß einsetzen
- Überstand des Lyse-Ansatzes auf die QIAprep Säule geben und 30 s zentrifugieren, der Durchfluß wird verworfen
- Säule mit 750 µl PB-Puffer waschen, 30 s zentrifugieren, der Durchfluß wird verworfen
- 1 min zentrifugieren, zur Entfernung von Puffer-Resten
- Säule in einem Eppi plazieren, 30-50 µl H₂O bidest. zugeben und 1 min zentrifugieren

3.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

(nach Altenbuchner & Cullum, 1984)

Die Zellwand von *C. glutamicum* wird durch Lysozym abgebaut, die Zellen durch SDS lysiert. Durch eine Behandlung mit PronaseE und Phenolisierung wird die DNA von Proteinen und Zellresten gereinigt.

- *C. glutamicum* ü/N in 25 ml selektivem Vollmedium im Erlenmeyerkolben bei 30°C anziehen
- 10 ml Kultur in PE-Röhrchen 10 min bei 3000 rpm in der Tischzentrifuge pelletieren
- in 10 ml TES resuspendieren, erneut pelletieren
- Pellet in 3ml P1 mit 20 mg/ml Lysozym resuspendieren und 2.3 h bei 37°C rollern
- 200 µl 20 %iges SDS zugeben und invertieren bis die Lösung aufklart
- 5 min auf Eis inkubieren
- Spatelspitze PronaseE zugeben und ca. 2h bei 37°C rollern
- mit 3 ml Phenol/Chloroform versetzen und vorsichtig mehrfach invertieren
- im JA17-Rotor mit 8000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugieren
- obere Phase mit abgeschnittener blauer Pipettenspitze vorsichtig abnehmen und in ein neues PE-Röhrchen überführen
- mit 2 ml Phenol/Chloroform versetzen und vorsichtig mehrfach invertieren

- im JA17-Rotor mit 8000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugieren
- obere Phase mit abgeschnittener blauer Pipettenspitze vorsichtig abnehmen und in ein neues PE-Röhrchen überführen
- Lösung mit 2,5fachem Volumen 98 %igem Ethanol (-20°C) versetzen und vorsichtig invertieren, bis die DNA ausfällt
- DNA mit abgeschnittener blauer Spitze aufnehmen und in ein Eppi überführen und 5 min mit 15000 rpm zentrifugieren
- DNA mit 500 µl 70 %igem Ethanol waschen und 5 min bei 60°C trocknen lassen
- DNA in 200 µl H₂O dest. aufnehmen und bei 65 °C lösen
- bei 4°C lagern

3.2 DNA-Reinigung

3.2.1 Phenolisierung

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Aufreinigung von, mit Proteinen verunreinigter DNA aber auch zur Inaktivierung von Restriktionsenzymen in einem Spaltungsansatz wird die Phenolisierung eingesetzt. Dazu wird die verunreinigte DNA-Lösung mit H₂O dest. auf 150 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform vermischt. Dabei gehen die Proteine in die phenolische Phase über oder werden an der Phasengrenze durch Aufspreizung denaturiert, die DNA bleibt in der wässrigen Phase gelöst. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wird die wässrige Phase in ein neues Eppi überführt und erneut aufkonzentriert (siehe 3.2.3 DNA-Konzentrierung). Bei starker Verunreinigung der DNA kann die Phenolisierung wiederholt werden.

3.2.2 Ionenfreie DNA durch Sephadex-Behandlung

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Säulenchromatographie mit Sephadex stellt eine Größenausschluß-Chromatographie dar, bei der Substanzen nach ihrer Größe getrennt werden. Das Ausschlußvolumen der Sephadex-Poren erlaubt kleineren Molekülen wie Salzen oder Nucleotiden das Eindringen in das Material und hält diese damit zurück. Größere Moleküle, wie z.B. Plasmid-DNA sind dazu nicht im Stande, legen also innerhalb der Säule einen kürzeren Weg zurück, d.h., sie eluieren früher.

- Sephadex G50 Medium Pulver in H₂O bidest. quellen lassen, autoklavieren
- zur Silikonisierung von Glaskügelchen (Ø ca. 1 mm) diese in Silikonlösung tränken, Lösung abgießen und die Kügelchen 1 h bei 180 °C in einem offenen Gefäß backen
- steriles Kügelchen in blaue Pipettenspitze geben und in ein Weichagar-Röhrchen stellen
- 0,7 ml steriles Sephadex in die Spitze pipettieren
- Säule für 15 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- gepackte Säule in ein neues Weichagar-Röhrchen stellen
- auftropfen der zu reinigenden DNA
- 15 min zentrifugieren, die Ionen bleiben dabei in der Säule zurück
- DNA-Lösung z. B. zur Elektroporation weiterverwerten

3.2.3 DNA-Konzentrierung durch Alkoholfällung

(nach Wallace, 1987)

Eine wässrige DNA-Lösung wird zur Fällung mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 1/1 Volumen Isopropanol versetzt und 30 min zentrifugiert. Mitgefällte Salze werden durch Waschen mit 70 %igem Ethanol entfernt. Nach erneuter Zentrifugation zur quantitativen Entfernung des Ethanols wird das Pellet 2 min bei RT getrocknet und in sterilem H₂O dest. bei 65 °C gelöst.

3.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Eine E_{260} von 1 entspricht 50 μg doppelsträngiger bzw. 33 μg einzelsträngiger DNA pro ml. Die Reinheitsbestimmung der DNA erfolgt durch den Vergleich der Extinktionen bei 260 und 280 nm. Reine DNA liefert einen Quotienten $E_{260/280}$ von 1,165-1,85.

3.3 DNA-Analysen im Minigel

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese trennt DNA-Fragmente als negativ geladene Makromoleküle in Abhängigkeit ihrer Größe auf. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel abhängig von dem Molekulargewicht, der DNA-Konformation, (supercoiled oder linear), der Porengröße des Gels sowie der angelegten Spannung. Die Laufstrecke linearer, doppelsträngiger DNA verhält sich weitgehend umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts bzw. ihrer Länge in Kilobasen (kb). Die Länge unbekannter DNA-Fragmente kann durch den Vergleich mit einem Längenstandard ermittelt werden, z.B. mit dem DNA molecular weight marker X von Boehringer. Vor dem Auftragen der DNA wird sie mit einem Glycerin-haltigen Bromphenolblau-Mix (BPB) versetzt, der einerseits die Dichte der Proben erhöht und sie in die Geltaschen einsinken läßt, andererseits den Fortschritt der Elektrophorese anzeigt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung bis 100 Volt, wobei die Stromstärke 300 mA nicht überschreiten sollte, da sonst der Puffer überhitzt und die Agarose schmilzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Die Detektion erfolgt unter UV-Licht bei 320 nm. Für Lösungen und Puffer siehe 1.1.3.

Gelelektrophorese für Minigelkammern

(nach Odgen & Adams, 1987)

Die Agarose-Konzentration beträgt je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8-2 %. Dabei gilt, je kleiner das Fragment, desto höher die Agarose-Konzentration. Zur Auftrennung sehr kleiner Fragmente (< 400 bp) wurde 3 %ige NuSieve GTG-Agarose benutzt.

- Agarose in TA-Puffer aufkochen, bis die Agarose vollständig gelöst ist.
- Auf ca. 60 °C abkühlen lassen, in den Gelträger gießen und sofort den Gelkamm einsetzen
- Gel ca. 20 min auspolymerisieren lassen
- Mit TA-Puffer überschichten und Gelkamm vorsichtig entfernen
- DNA-Proben und Längenstandard mit je 5 μl BPB vermischen und in die Geltaschen pipettieren
- Elektrophorese bei maximal 100 V und 300 mA, der Verlauf der Elektrophorese kann an der BPB-Bande verfolgt werden.
- Anfärbung des Gel im Ethidiumbromid-Bad (10 μg EtBr/ml TA-Puffer) für 5 min
- Auswertung und fotografische Dokumentation des Gels unter UV-Licht auf einem Transilluminator

3.3.2 Eckhardt-Lyse

(Eckhardt, 1978, modifiziert)

Die Eckhardt-Lyse stellt eine schnelle und einfache Methode zur Analyse des Plasmid-Gehalts und der Plasmid-Länge dar. Die Lyse der Zellen erfolgt dabei durch SDS.

Gelvorbereitung:

- 0,8 %ige Agaroselösung in TA-Puffer aufkochen
- SDS in einer Endkonzentration von 0,2 % zusetzen
- in Gelkammer gießen und Gelkamm einsetzen

Durchführung:

- pro Lyse 5 µg TES-Puffer in eine Microtiterplatte geben
- mit sterilem Zahnstocher eine *E. coli* Kolonie abnehmen, im TES-Puffer suspendieren
- *E. coli*-Suspension mit 15 µl E-1-F/Lysozym/Rnase vermischen und sofort in die Geltaschen pipettieren
- in Kontrollspur 5 µl BPB auftragen
- Vorlauf bei 15 V, bis die Taschen vollständig aufgeklart sind (ca. 15 min)
- Hauptlauf bei 100 V
- Gel nach Beendigung des Laufs kurz in Wasser schenken und 5 min mit Ethidiumbromid anfärben
- Dokumentation mit dem Transilluminator

3.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode dient zur Isolierung definierter DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel. Die DNA wird enzymatisch gespalten, im Agarose-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die DNA wird mit UV-Licht sichtbar gemacht und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgt durch eine Glasmilch-Behandlung mit dem Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids (Macherey-Nagel).

Durchführung nach Manual:

- DNA-Fragment unter UV-Licht ausschneiden
- in vorher gewogenes Eppi geben, Gewicht bestimmen
- pro 100 mg Agarose 300 µl NT1 zugeben
- 15 µl Nucleotrap Suspension zugeben, vortexen
- 10 min Inkubation bei 50°C, dabei alle 2-3 min vortexen
- 30 s bei 15000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 500 µl NT2 zugeben, vortexen, 30 s zentrifugieren
- NT2 Waschschrift wiederholen, dann zweimal mit NT3 waschen
- Überstand vollständig entfernen, Pellet 10 min bei Raumtemperatur trocknen
- Pellet in 40 µl H₂O aufnehmen, vortexen, 30 s zentrifugieren
- Überstand mit DNA-Fragment in ein neues Eppi überführen

3.4 Klonierungsexperimente

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

3.4.1 DNA-Restriktion

Isolierte DNA wird zur Analyse oder Ligation mit geeigneten Restriktionsenzymen des Typs II gespalten. Diese Enzyme erkennen palindromische Sequenzen und katalysieren eine hydrolytische Spaltung des DNA-Phosphatgerüsts innerhalb dieser Sequenz. Dabei entstehen charakteristische 3' – oder 5' –Überhänge („sticky ends“) oder glatte Enden („blunt ends“). Da die Enzyme in Glycerinpuffern gelagert werden, ist bei Gebrauch darauf zu achten, daß der Glyceringehalt (= Enzymanteil) im Spaltungsansatz 10 % (v/v) nicht überschreitet, da es sonst zu Aktivitätseinbußen kommen kann. Die Spaltung erfolgt unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen unter Verwendung des mitgelieferten Puffers oder des TA-Restriktionspuffers. Bis auf wenige Ausnahmen spalten alle verwendeten Restriktionsenzyme bei 37 °C. Pro Spaltungsansatz werden 5 µl Plasmid-DNA einer alkalischen Lyse mit 1 Unit Restriktionsenzym verdaut. Bei Restriktionsverdau von Gesamt-DNA

werden sowohl die DNA Menge erhöht (10-15 µl) als auch die der Restriktionsenzyme. Die Spaltung erfolgt für 1-2 h bei angegebener Temperatur im Wasserbad, durch Hitzebehandlung oder Phenolisierung wird das Restriktionsenzym inaktiviert.

3.4.2 Erzeugung von „blunt ends“

Um Fragment mit unterschiedlichen sticky ends zu ligieren, müssen diese in blunt ends umgewandelt werden. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Polymerase-Aktivität sowie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Mit diesem Enzym können also sowohl 5'- Überhänge durch Auffüllen als auch 3'-Überhänge durch Abbau der nicht gepaarten Nukleotide in „blunt-ends“ überführt werden. Die so erzeugten blunt-end-Fragmente können in beliebiger Kombination ligiert werden.

- ca. 20 µl inaktivierter Spaltungsansatz
- 1 µl Klenow-DNA-Polymerase (2-4 units/µl)
- 1fach TA-Spaltungspuffer
- jeweils 1/10 Volumen der benötigten dNTPs (10mM)
- Ansatz mit sterilem H₂O dest. auf 30 µl auffüllen
- 30 min Inkubation bei 37 °C
- Inaktivierung des Klenow-Enzyms bei 70 °C für 20 min oder durch Phenolisierung
- Abtrennung freier Nukleotide durch Sephadex-Behandlung

3.4.3 5'-Dephosphorelierung von gespaltener DNA

Um die Religierung gespaltener DNA zu vermeiden, wird diese mit alkalischer Phosphatase (Shrimp alkaline Phosphatase, SAP) behandelt. Die Abspaltung der 5'- Phosphatgruppe an den Enden der linearisierten DNA verhindert deren Ligation. Eine Ligation ist nur mit nicht-dephosphorelierter, linearisierter DNA möglich, die damit in erhöhter Effizienz mit SAP-behandelter DNA ligiert werden kann. Die Dephosphorelierung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.4.4 DNA-Ligation

Ligasen reparieren Doppelstrangbrüche in DNA-Molekülen, indem sie unter Energieverbrauch die 3'- OH-Gruppe mit der 5'- Phosphatgruppe verknüpfen. Die DNA-Ligation erfolgt ATP-abhängig durch die Aktivität der T4-Ligase. Es können kompatible „sticky end“- sowie beliebige „blunt end“- Fragmente ligiert werden. Die Restriktionsenzyme der zur Ligation vorgesehenen Spaltungsansätze müssen zuvor inaktiviert werden. Die Inaktivierungstemperatur und -Dauer richtet sich dabei nach den verwendeten Restriktionsenzymen. Sind Inaktivierungstemperaturen über 70 °C nötig, ist die Phenolisierung der Hitzeinaktivierung vorzuziehen. Zur Ligation wird der Ansatz mit DNA, Ligase und 1fach ATP-haltigem Ligasepuffer auf ca. 30 µl aufgefüllt. Die Insert-DNA wird dabei im Überschuß zur Vektor-DNA gegeben. Die Reaktion startet bei 20 °C und wird langsam auf 4 °C abgekühlt. Dazu wird das Eppi mit dem Ligaseansatz in eine mit Wasser gefüllte Thermoskanne gegeben, die ü/N in einem Kühlschrank gestellt wird.

3.4.5 Identifizierung rekombinanter Plasmide durch *lacZ*-Farbreaktion

Eine funktionale β-Galaktosidase ist in *E. coli* durch die Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-haltigem Medium nachweisbar. Gebräuchliche Kloniervektoren wie pUC19 oder pK18*mob* besitzen ein *lacZα*-DNA-Fragment mit einer multiple cloning site (mcs). Mit dieser DNA wird ein *lacZα*-defekter *E. coli* Stamm auf Proteinebene komplementiert. Durch Klonierung fremder DNA in die mcs wird das *lacZα*-Fragment disruptiert und die

Kolonien färben sich auf X-Gal-haltigem Medium nicht mehr blau. Rekombinante Klone sind ausschließlich an ihrer weißen Farbe zu erkennen. Die Methode wird allgemein als blau/weiß-Selektion bezeichnet.

3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine *in vitro* Methode zur gezielten enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dies wird durch sich wiederholende, automatische Zyklen erreicht, wobei sich im Idealfall pro Durchgang die Anzahl der entstandenen Kopien verdoppelt. Ein PCR-Zyklus baut sich aus drei Schritten auf: Durch Hitzedenaturierung wird im ersten Schritt die Template-DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Es folgt das Annealing, bei dem durch Absenken der Temperatur die Primer an ihre spezifische Zielsequenz binden können. In dritten Schritt katalysiert eine thermostabile Polymerase bei 72 °C die Polymerisierung des neuen DNA-Strangs. Die verwendeten Primer werden dabei so gewählt, daß sie komplementär zu den Enden des gewünschten DNA-Fragments sind. Die Orientierung der Primer ist so, daß das zwischen ihnen liegende DNA-Fragment durch die Polymerisierung synthetisiert und damit amplifiziert wird. Neben den Primern und der thermostabilen Polymerase (meist *Taq*-Polymerase) werden im PCR-Reaktionsansatz Desoxynucleotide, ein Magnesium-haltiger Puffer sowie die Template-DNA benötigt. Die PCR wurde mit einem PCT-100 Thermocycler (MJ Research Inc.) durchgeführt.

Eine Besonderheit der *Taq*-Polymerase ist, daß sie matrizunabhängig stets eine Adenosin-Rest an das Amplifikat anhängt. Dies erleichtert die Klonierung in spezielle, linearisierte Vektoren wie pCR2.1, die einen 3'-T-Überhang an der Insertionsstelle besitzen. Das PCR-Amplifikat kann so direkt über das 3'-A-, „sticky end“ in den Vektor kloniert werden. Um die Adenosin-Extension an den PCR-Amplifikaten sicherzustellen, wird nach den PCR-Zyklen ein 10 minütiger Extensionsschritt durchgeführt.

3.5.1 PCR

- Komponenten des PCR-Ansatzes (Mastermix, für 4 Reaktionen):
 - 20 µl *Taq*-Puffer (des Polymerase-Herstellers)
 - 165 µl steriles H₂O dest.
 - 6,6 µl MgCl₂-Lösung
 - 4 µl dNTP-Gemisch (je 2,5 mM)
 - je 1 µl Primer
 - 1 µl Polymerase (5Units)
- 1 µl Template-DNA in PCR-Softstrip-Eppi füllen, pro Primerpaar eine Nullprobe ansetzen
- PCR-Softstrip in Thermocycler stellen
- Programm starten, während des Vorlaufs 50 µl Mastermix in jedes Eppi pipettieren, mit Pipette mischen
- PCR-Strip und Gerät schließen

Standard PCR-Protokoll:

1. 94 °C 2 min Vorlauf
2. 94 °C 1,5 min Denaturierung des DNA-Doppelstrangs
3. 55 °C 1,5 min Annealing der Primer
4. 72 °C 1,5 min Polymerisation
5. Schritte 2-4 werden 30 mal wiederholt
6. 72 °C 10 min Extensionsschritt
7. Ansätze bei 4 °C aufbewahren

Die Annealing Temperatur wird so gewählt, daß sie ca. 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt. Die Formel zur Abschätzung der Schmelztemperatur lautet:

$$T_m = 2 \text{ °C} \times (A+T) + 4 \text{ °C} \times (G+C)$$

Zur Überprüfung der Amplifikation werden je 5 µl des PCR-Ansatz im Agarose-Gel analysiert.

3.5.2 DIG-PCR

Die DIG-PCR dient zur Herstellung von Hybridisierungssonden für den Southern-Blot. Gegenüber der Standardmethode der Sondenherstellung hat sie den Vorteil, daß gezielt ein beliebiger DNA-Abschnitt als markierte Sonde dienen kann. Methodisch unterscheidet sich eine DIG-PCR nicht von einer Standard-PCR, dem dNTP-Mix werden lediglich 2,5 mM Digoxigenin markiertes DIG-UTP zugegeben, das während der Polymerisierung statistisch ca. alle 25 Basen anstelle von dTTP eingebaut wird. Das gewonnene, Digoxigenin markierte PCR-Produkt wird nicht kloniert, sondern direkt als Sonde benutzt.

3.5.3 Primer Design

Die Qualität der Primer spielt für die Effizienz und Spezifität der PCR eine entscheidende Rolle, weshalb bei der Auswahl der PCR-Primer einige Regeln beachtet werden müssen (McPherson, 1995). Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, sollten die Primer eine Mindestlänge von 18 Nucleotiden (nt) aufweisen, ab einer Länge von 30 nt ist jedoch keine Zunahme der Spezifität mehr zu erwarten. Die Länge und die Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer sollte möglichst identisch sein, mit einem GC-Gehalt zwischen 50 und 60%. Eine einfache Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) eines Primers ist T_m °C = 2 (A+T) + 4 (G+C). Extensionen, wie Schnittstellen für Restriktionsenzyme, werden an das 5'-Ende des Primers angehängt. Am 3'- bzw. am 5'-Ende des Primers sollten sich keine Poly(t)-Bereiche befinden, da Thymidin-Reste dazu neigen, unspezifische Bindungen auszubilden. Um diese und weitere Kriterien wie die Bildung von Haarnadelstrukturen oder Primer-Dimeren berücksichtigen zu können, werden spezielle Computerprogramme genutzt. Die hier aufgelisteten Primer wurden mit dem Programm „Primer Designer“, Version 2.2, erstellt.

Gen	Primer-Paar
<i>secA</i>	sa1: 5'-GTTTATCATTTCCGTATCGCT-3' sa2: 5'-CTTGATGAACTGCTTGCGGA-3'
<i>secA</i> Fragment	saf1: 5'-CGCGACAAGGACTACATCGT-3' saf2: 5'-GAGATGTCTGCGGATTCGAG-3'
<i>secY</i> Fragment	syf1: 5'-TGAGGAGGCCAGGAGGCCAG-3' syf2: 5'-AACCACCGTACTGACGACGA-3'
<i>secY</i>	sy1: 5'-TTAAGTGCTGAGGAGGCCAG-3' sy2: 5'-TTATCAGCACCGGTAGTTCC-3'
<i>secE</i>	se1: 5'-TGGATGAGTAGTGATTTAGA-3' se2: 5'-GATTCTGACTCCGTAGGTAG-3'
<i>secE</i> Region	ser1: 5'-CACCTGGCAGACGCACTCAA-3' ser2: 5'-AGCCGGAGTAGCACTGAATG-3'
<i>secG</i>	sg1: 5'-ACCTGGGTTCTCAAACGGCA-3' sg2: 5'-TTGTGACCTGTTGTCTCCC-3'
<i>secG</i> Region	sgr1: 5'-TCCAGGCCTTCCTCACGCAA-3' sgr2: 5'-AGCTGCGAGAATCCAGGCTA-3'
<i>secD</i>	sd1: 5'-TTGTCTGGTTGATTGGAATT-3' sd2: 5'-TGAAGTTTCAGTCTGGGAAT-3'
<i>secD</i> Fragment	sdf1: 5'-TGCTGTTGACAGGCGATCGT-3' sdf2: 5'-TCATCAGTGGTGCATGCAT-3'

<i>secF</i>	sf1: 5'-GGAGAAGTAGCCATGACTGA-3' sf2: 5'-CATCGTGAGTCATAGACGCA-3'
<i>secF</i> Fragment	sff1: 5'-GTACCAAGATGAGCATGCCA-3' sff2: 5'-ATCGAACGCATGAAGGTCTG-3'

3.5.4 Klonierung von PCR-Amplifikaten

(Topo Cloning manual)

Mittels *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte wurden unmittelbar in den 3'-T-Überhang des Vektors pCR2.1 des „Original Topo Cloning Kit“ kloniert. Dieser Kit erlaubt direktes Klonieren von *Taq*-Polymerase-generierten PCR-Produkten. Der Einsatz modifizierende Enzyme, DNA-Aufreinigung oder Restriktionsspaltung der Amplifikate sind für die Klonierung nicht erforderlich.

Der Ligationsansatz besteht aus:

- 2 µl steriles H₂O dest.
- 1 µl pCR2.1-DNA
- 2 µl PCR-Produkt

Die Ligation erfolgt innerhalb von 2-5 min bei Raumtemperatur.

Transformation:

- Kompetente Zellen (TOP10F[']) auf Eis auftauen
- 2 µl β-Mercaptoethanol (0,5 M) zu den Zellen pipettieren
- 1-2 µl Ligationsansatz mit den Zellen mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- exakt 30 s Hitzeschock bei 42 °C
- 2 min auf Eis
- 250 µl SOC-Medium hinzufügen und eine Stunde bei 37 °C regenerieren
- 50-200 µl des Ansatzes auf selektiven LB-X-Gal-Platten ausplattieren
- ü/N bei 37 °C inkubieren

3.6 DNA-Transfer

3.6.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine effiziente Methode zum Transfer freier DNA in Bakterienzellen. Sie beruht darauf, daß ein elektrischer Puls mit einer Feldstärke von über 10 kV/cm die Bildung von Poren in vorbehandelten Bakterien verursacht, wodurch exogene DNA in die Zellen gelangen kann. Die eingesetzten DNA- und Zellsuspensionen müssen weitgehend ionenfrei sein, um eine zu schnelle Entladung des Kondensators zu verhindern. Die Entladungszeiten liegen idealerweise bei >5 ms für *E. coli* und >3 ms für *C. glutamicum*. Wesentlich für die Vorbehandlung der Zellen ist die Konzentrierung und Entionisierung der Zellsuspension. Es wurden der „Gene Pulser“ und „Pulse Controller“ sowie Elektroporations-Küvetten der Firma BioRad (München) benutzt.

Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

(nach Tauch *et al.*, 1994)

Die Ausbeute an Transformanden kann durch Zellwand-destabilisierende Agenzien erheblich gesteigert werden, da sie während der frühlogarithmischen Wachstumsphase den Aufbau der Zellwand stark schwächen. Der Einbau von z.B. Glycin anstelle von Alanin in die Zellwand führt zu einer weniger stark quervernetzten und lockereren Zellwandstruktur.

- ein JA10- und zwei JA20-Becher pro Ansatz sterilisieren, ü/N bei 4 °C kühlen
- 2,5 ml *E. coli*-Vorkultur in 250 ml LB-Medium überimpfen, bei 37 °C bis zu o.D.₅₈₀ von 0,5-0,7 anziehen.
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen
- alle weiteren Schritte bei 0 °C ausführen, Lösungen und Zentrifuge kühlen
- 250 ml Kultur 15 min mit 6000 rpm im JA10-Rotor abzentrifugieren
- Überstand abgießen, Rücklauf vollständig abziehen
- Becher 2 mal mit ca. 20 ml H₂O bidest. vorsichtig ausschütteln, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet in 5 ml H₂O bidest. lösen, danach 250 ml H₂O bidest. zugeben
- 15 min bei 5000 rpm abzentrifugieren
- Überstand sofort abgießen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Suspension in 2 JA20-Becher verteilen und je 25 ml 15 % Glycerin zugeben
- 15 min bei 5000 rpm abzentrifugieren, Überstand abziehen
- Pellet in 0,5-1 ml 15 % Glycerin aufnehmen
- je 60 µl der Zellen bei -80 °C schockgefrieren und bei -80 °C lagern

Die kompetenten *E. coli*-Zellen sind mehrere Monate bei -80 °C haltbar. Zur Elektroporation wurde ausschließlich *Escherichia coli* DH5αMCR verwendet.

Herstellung kompetenter *C. glutamicum* Zellen für die Elektroporation

(Kirchner, 1999)

- Vorkultur in 50 ml BHIS-Medium animpfen und ü/N bei 30 °C anziehen
- 250 ml BHIS-Medium mit 5 ml Vorkultur beimpfen und im Schüttler bei 30 °C bis zu einer o.D.₅₇₈ von 1,75 inkubieren
- alle folgenden Schritte wurden bei 0 °C durchgeführt
- Kultur in 2 x 125 ml teilen und in 2 sterile JA14-Becher überführen
- für 20 min mit 6000 rpm im JA14-Rotor abzentrifugieren, Überstand restlos abziehen
- Pellet in 2 ml TG-Puffer resuspendieren, in JA17-Becher überführen, 20 ml TG-Puffer zugeben und 10 min bei 6000 rpm abzentrifugieren
- Waschung mit TG-Puffer wiederholen
- Pellet in 2 ml 10 %igem Glycerin resuspendieren, 20 ml 10 %iges Glycerin hinzufügen, mischen und bei 6000 rpm für 10 min abzentrifugieren
- Waschung mit 10 %igem Glycerin wiederholen, Überstand restlos abziehen
- Pellet in 1 ml 10 %igem Glycerin resuspendieren
- Aliquots von 150 µl in Eppis überführen
- bei -80 °C lagern.

Elektroporation der vorbereiteten *E. coli* Zellen

- Zellen auf Eis auftauen
- Elektroporations-Küvetten und ionenfreie DNA auf Eis stellen
- Wahl der Elektroporationsbedingungen:
 - Widerstand: 400 Ohm
 - Feldstärke: 25 µFarad
 - Voltzahl: 2,5 kVolt
- zu 60-100 µl Zellen ca. 5-10 µl ionenfreie DNA geben
- Suspension ganz nach unten in die Elektroporations-Küvetten füllen
- Küvette gut abtrocknen und in den „Gene-Pulser“ einspannen und Puls auslösen
- optimale Zeitkonstante zwischen 6-8 ms
- Sofort 1 ml SOC-Medium zu den Zellen geben und in ein Eppi überführen
- Zellen für 60 min bei 37 °C regenerieren
- Zellen auf Selektionsmedium austreichen

Elektroporation vorbereiteter *C. glutamicum* Zellen

- Wasserbad auf genau 46 °C erwärmen
- Reagenzglas mit 4 ml BHIS-Medium mindestens 5 min im Wasserbad temperieren
- Zellen auf Eis auftauen
- 0,1-10 µg DNA hinzufügen
- Suspension in die Elektroporationsküvette überführen und vorsichtig mit 0,8 ml 10 %igem Glycerin überschichten
- Küvette gut abtrocknen und in den „Gene-Pulser“ einspannen und Puls auslösen
- Wahl der Elektroporationsbedingungen:
 - Widerstand: 200 Ohm
 - Feldstärke: 25 µFarad
 - Voltzahl: 2,5 kVolt
- optimale Zeitkonstante zwischen 3,5 und 4,0 ms
- Zellen sofort in das vorgewärmte BHIS-Medium überführen und mischen
- für 6 min bei 46 °C im Wasserbad inkubieren
- für 50 min bei 30 °C im Schüttler regenerieren
- Zellen auf Selektionsmedium ausplattieren

Küvetten-Wiederverwertung

Die von den Herstellern gelieferten Einweg-Küvetten können 2-4 mal wiederverwendet werden, ohne das die Transformationsfrequenz ernsthaft sinkt. Dazu müssen die Küvetten aber Ionen- und Proteinfrei sein und wieder sterilisiert werden.

- Küvetten und Deckel sofort nach Gebrauch mit 70 % Ethanol auswaschen und in Ethanol sammeln
- Küvetten 2 x in der Spülmaschine spülen
- zum Sterilisieren kurz in 70 %igem Ethanol waschen
- unter der Sterilbank abdampfen lassen, Küvetten verschließen

3.6.2 Schnelltransformation

Durch Behandlung mit Calciumchlorid und Polyethylenglycol (PEG) erhalten *E. coli* Zellen Kompetenz zur Aufnahme freier DNA. Dieses Verfahren dient vor allem zur schnellen Transformation von unterschiedlichen *E. coli* Stämmen mit bereits vorhandenen Plasmiden, da die aufwendige Herstellung kompetenter Zellen entfällt. Klonierungen erfolgen wegen der erhöhten Transformationsrate trotzdem durch Elektroporation.

- 15-20 *E. coli* Kolonien von frischer Platte nehmen
- im Eppi in 100 µl CaCl₂/PEG-Lösung resuspendieren
- Zellen 5min auf Eis lagern
- 3-5 µl Plasmid-DNA zugeben
- Zellen 8 min auf Eis
- 30 s Hitzeschock bei 42 °C
- 2 min auf Eis
- 900 µl SOC-Medium zugegen, 1 h bei 37 °C regenerieren
- auf Selektionsmedium ausplattieren

3.6.3 Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum*

(nach Schäfer *et al.*, 1990)

E. coli Zellen können bei Vorhandensein von *tra*-Genen „Pili“ ausbilden, mit denen sie Kontakt zu anderen Zellen aufnehmen. Nach Ausbildung dieser Verbindungsbrücken kommt es zum Transfer *oriT*-tragender DNA.

Der hier verwendete Donor *E. coli* S17-1 trägt die *tra*-Gene des Plasmids RP4 integriert im Chromosom, die so *in trans* auf die Mobilisierungstelle (*oriT*) eines zu übertragenden Vektors wirken. Die Donorstämme sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, wogegen Rezipienten der spätlogarithmischen oder stationären Phase verwendet werden können. Um eine Gegenselektion nach der Kreuzung zu ermöglichen, sollte der Rezipientenstamm eine Antibiotika-Resistenz besitzen, über die der Donor-Stamm nicht verfügt. Beim konjugativen Plasmid-Transfer von *E. coli* nach *C. glutamicum* wird das Restriktionssystem des Rezipienten durch eine Hitzebehandlung ausgeschaltet, um eine effektivere Übertragung zu gewährleisten.

- *C. glutamicum* Rezipient in Vor- und Hauptkultur in LBG bis zu einer o.D₅₈₀ von ca. 4 anziehen
- Rezipientenkultur auf RT abkühlen lassen, 10 ml Kultur im Reagenzglas für 9 min bei 48,5 °C hitzeschocken
- Vorkultur des *E. coli* S17-1 Donors 1:50 in LBG überimpfen, bis zu einer o.D₅₈₀ von 1 anziehen
- je 4 x 10⁸ Donor- und Rezipientenzellen pelletieren
- Zellen in LBG waschen, danach zusammengeben
- Kreuzungsgemisch auf Nitrocellulose-Filter (0,45 µm Porengröße, Ø 25 mm) auf einer LB-Platte aufbringen
- Platten bei 30 °C für 20 h inkubieren
- Filter mit Zellen mittels steriler Pinzette in ein mit 10 ml LB gefülltes PE-Röhrchen überführen
- durch Vortexen die Zellen vom Filter abspülen, Filter entfernen und Zellen pelletieren
- Pellet in 1 ml LB resuspendieren und je 0,2 ml auf Selektionsmedium (Nx für *C. glutamicum* und Resistenz des Plasmids) plattieren
- Platten 2-3 d bei 30 °C inkubieren

3.7 DNA-Hybridisierung

(nach Southern, 1975)

Der Nachweis homologer DNA-Sequenzen erfolgt per Southern-Hybridisierung. Die zu überprüfende DNA wird mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten, im Agarose-Gel aufgetrennt und die doppelsträngige DNA nach Denaturierung an eine Nylonmembran gebunden (Southern-Blot). Man gibt markierte DNA als Hybridisierungssonde hinzu und erlaubt das „annealing“ der homologen Bereiche. Die Stringenz der Hybridisierung wird durch die Temperaturen bei Hybridisierung und Waschung sowie durch den Salzgehalt der Waschlösung bestimmt. Zur DNA-Markierung wurde der „DNA-Labeling and Detection Kit Nonradioactive“ (Boehringer, Mannheim) eingesetzt. Dabei werden durch den Einbau von Digoxigenin gekoppelten dUTP-Nukleotiden die neu synthetisierten DNA-Stränge markiert. Nach der Hybridisierung an die Ziel-DNA weist man die Sonde durch ein polyklonales Schaf-Anti-Digoxigenin-Antikörper-Konjugat immunologisch nach. Die Aktivität der, an diese Antikörper gebundenen alkalischen Phosphatase (Apho) wird durch eine in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-Indolylphosphat-Toluidin (X-Phosphat) ausgelöste Farbreaktion sichtbar gemacht. Lösungen und Puffer siehe 1.3.5.

3.7.1 Southern-Blot

(nach LKB 2016 VacuGene-Blot Manual)

In einem Gel aufgetrennte DNA-Fragmente werden mittels Vakuum-Blot auf einen Nylonfilter transferiert. Im Gegensatz zum herkömmlichen Southern-Blot (Southern, 1975) wird dabei durch das Anlegen eines Vakuums der Pufferverbrauch und der Zeitaufwand minimiert.

- gespaltene DNA und Längenstandard im Gel auftrennen und kurz mit EtBr anfärben
- Gel unter UV-Durchlicht dokumentieren
- Blotkammer (VacuGene-Kammer LKB 2016) zusammenbauen
- Nylonmembran etwas größer als das Maskenfenster zurechtschneiden, durch das Fenster unter die Maske legen, Ränder markieren
- Gel luftblasenfrei über das Maskenfenster auf die Membran legen
- Blotkammer verschließen, Vakuum von 50- 80 mbar anlegen
- Gel mit folgenden Lösungen überschichten, ohne dabei das Vakuum zu unterbrechen (zum Wechseln der Lösungen diese mit einem Vakuumschlauch absaugen):
- 10 min Depurinierungslösung A
- 10 min Denaturierungslösung B (frisch ansetzen)

- 10 min Neutralisierungslösung C
- 30 min 20fach SSC
- Rest der Lösung absaugen, Vakuum abschalten und Gel entfernen
- Filter 5 min trocknen lassen
- Filter in Frapanfolie einwickeln, DNA 5 min mit UV-Licht fixieren (crosslinking)
- Membran sofort zur Hybridisierung einsetzen oder zwischen 3MM-Papier lagern

3.7.2 DNA-Markierung mit Digoxigenin

(nach DNA-Labeling and Detection Kit Nonradioactive Manual)

Die zu markierende, doppelsträngige DNA wird denaturiert. Bei der „random primed“ DNA-Markierungsmethode wird ein Gemisch aus Oligonukleotiden (ca. 6 bp) mit zufallsbedingter Sequenz („random primer“) als Primer genutzt, mit deren Hilfe die Klenow-Polymerase in Gegenwart von Nukleotiden die *de novo*-Synthese des Gegenstrangs der Ziel-DNA katalysiert. Zur Markierung der neu synthetisierten DNA wird dem Reaktionsgemisch Digoxigenin-markiertes Desoxyuridintriphosphat (dUTP) zugegeben, welches von dem Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat detektiert wird. Die markierte DNA-Probe wird durch Kochen und anschließendes Abkühlen auf Eis in die Einzelstrang-Form überführt und kann dann für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

- Denaturierung der eingestzten DNA durch 5 min Kochen
- schnelles Abkühlen auf Eis (5 min)
- Digoxigenin-Markierung in folgendem Ansatz:
 - 20 µl linearisierte, denaturierte DNA
 - 3 µl 10fach konzentriertes Hexanukleotidgemisch
 - 3 µl 10fach konzentriertes dNTP-Markierungsgemisch
 - 2 µl Klenow-Polymerase (2 Units/µl)
- Reaktionsansatz 2 h oder ü/N bei 37 °C inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 1/10 Ansatzvolumen 0,2 M EDTA (pH 8,0) stoppen
- markierte DNA mit 1/10 Ansatzvolumen 4 M LiCl (pH 7,5) und 2,5facher Ansatzmenge 98 % Ethanol (-20 °C) fällen
- 30 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Pellet mit 50 µl 70 %igem Ethanol waschen, 5 min abzentrifugieren
- Pellet trocknen und in 100 µl H₂O dest. resuspendieren

3.7.3 Hybridisierung

Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wird zunächst durch Inkubation mit der Vorhybridisierungslösung abgesättigt. Damit werden freie Bindestellen auf der Membran mit dem Blockingreagenz besetzt und unspezifische Bindungen der DNA-Sonde unterbunden. Nach der Vorhybridisierung wird die markierte, einzelsträngige Sonde zugegeben. Lösungen und Puffer siehe 1.3.5.

Vorhybrisisierung

- Hybridisierungsschrank auf 68 °C vorheizen
- Nylonfilter mit der DNA-Seite nach innen luftblasenfrei in den Hybridisierungskolben überführen
- 10 ml Vorhybridisierungslösung zugeben
- 1 h bei 68 °C im Drehinkubator inkubieren

Hybridisierung

- markierte Probe mit 8 ml Vorhybridisierungslösung verdünnen
- 10 min bei 100 °C denaturieren, sofort für 5 min auf Eis
- Vorhybridisierungslösung durch markierte Probe ersetzen
- Hybridisierung für 12-14 h bei 68 °C im Drehinkubator

Waschung

Um überschüssige, mit Digoxigenin-dUTP-markierte DNA zu entfernen, muß der Filter mehrfach gewaschen werden.

- Hybridisierungsprobe auffangen und bei -20 °C lagern (kann mehrfach verwendet werden)
- Filter 2 mal 5 min bei RT mit 100 ml Waschlösung A rollern
- Filter 2 mal 15 min bei 68 °C mit 50 ml vorgewärmter Waschlösung B rollern

Die Filter können direkt zur Detektion der hybridisierten DNA verwendet oder für einen späteren Nachweis lichtgeschützt aufbewahrt werden.

3.7.4 Immunologischer Nachweis

(nach DNA-Labeling and Detection Kit Nonradioactive Manual)

Der mit alkalischer Phosphatase markierte Schaf-Anti-Digoxigenin-Antikörper bindet an die markierte DNA. Ungebundenes Antikörper-Konjugat wird durch Waschschrte entfernt, bevor die markierte DNA durch Inkubation mit der Färbelösung sichtbar gemacht wird.

- Filter im Hybridisierungskolben 1 min in Puffer 1 waschen
- 30 min in 100 ml Puffer 2 inkubieren
- 30 min in 20 ml Antikörper-Konjugat-Lösung bei RT rollern
- 2 mal 15 min in Puffer 1 waschen
- 2 min in Puffer 3 equilibrieren
- in 10 ml frischer Färbelösung (NBT/X-Phosphat) färben, bis Banden sichtbar sind
- Färbung mit TA-Puffer abstoppen

Den Filter dokumentieren, trocknen und zwischen 3MM-Papier lichtgeschützt in Alufolie aufbewahren

3.7.5 Koloniehybridisierung

(nach Bathe *et al.*, 1996)

Im Gegensatz zur Standard-Hybridisierung werden bei der Koloniehybridisierung nicht DNA-Fragmente sondern ganze Zellen auf die Nylonmembran aufgebracht. Die Zellen werden direkt auf dem Filter durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen, was ein Screenen möglichst vieler Kolonien in möglichst kurzer Zeit gewährleistet. Lösungen und Puffer siehe 1.3.5.

- Stochern von *E. coli* Klonen auf eine LB-Platte und Inkubation ü/N bei 37 °C
- 2 Schichten 3MM-Papier werden jeweils mit Denaturierungslösung 1, Neutralisierungslösung 2 und 2fach SSC durchtränkt.
- Vorkühlung der Stocherplatten für 30 min. bei 4 °C
- vorsichtiges, luftblasenfreies Auflegen der Nylonmembranen (Hybond) auf die Oberseite der Stocherplatte mit zwei sterilen Pinzetten
- ca. 1 min Inkubation bei 4 °C , Markierung der Orientierung der Membran auf der Platte
- vorsichtig die Membran von der Platte entfernen und mit der Kolonieseite nach oben auf 3MM-Papier trocknen
- Membran 15 min auf, mit Denaturierungslösung getränktem 3MM-Papier legen, danach vorsichtig mit 3MM-Papier trocknen
- Membran 15 min auf, mit Neutralisierungslösung getränktem 3MM-Papier legen danach vorsichtig mit 3MM-Papier trocknen
- Membran 10 min auf, mit 2fach SSC getränktem 3MM-Papier legen
- Fixierung der DNA durch crosslinking mit UV-Licht

Die Membran wird danach, wie oben beschrieben, mit der entsprechenden Sonde hybridisiert und angefärbt.

3.8 Sequenzierung und Auswertung

3.8.1 Sequenzierung

(Ansorge *et al.*, 1986, 1987)

Der DNA-Sequenzierung von Plasmid-DNA mit dem A.L.F.-Sequencer liegt die Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977) zugrunde. Man setzt einem dNTP-Mix jeweils ein Didesoxynukleotid zu. Ausgehend von einem definiertem Primer kommt es bei der Neusynthese der zu sequenzierenden DNA zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen. Die Fragmentlängen entsprechen dabei jeweils der Position dieses Nukleotids im DNA-Strang. Die Auftrennung der Fragmente und deren Detektion erfolgt im Polyacrylamid-Gel mit Hilfe des Automated Liquid Fluorescent (A. L. F.) Express DNA-Sequencers (Pharmacia). Die zur Sequenzierung eingesetzten Primer sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy-5 markiert. Nach ca 2/3 der Laufstrecke im Gel regt ein fixierter Laserstrahl den Fluoreszenzfarbstoff an, dessen emittiertes Licht von dem Sequencer aufgenommen wird. Die Sequenzierung eines DNA-Stranges erfolgt im Vierspurverfahren, bei dem man die DNA in vier Reaktionsansätzen, die jeweils ein A-, C-, G- oder T-Dideoxynucleotid enthalten, synthetisiert. Die vier Ansätze werden anschließend in getrennten Spuren im A.L.F. aufgetragen. Das A.L.F.-Manager Computerprogramm zeichnet die Fluoreszenzsignale auf und prozessiert sie zu einem Sequenzvorschlag. Für die Sequenzierung wurde der Cy-5 AutoRead Sequencing Kit (Pharmacia) verwendet.

Präparation der Sequenziergele

(A.L.F. Express Sequencer Manual)

- Glasplatten, Lichtkoppler, Spacer und mit H₂O dest. und 70 %igem Ethanol gründlich putzen und trockenblasen
- 400 µl Bindsilan und je 100 µl 10 %ige Essigsäure mischen und beide Glasplatten in Höhe der Geltaschen mit je 250 µl silanisieren
- Platten erneut mit H₂O dest. und 70 %igem Ethanol reinigen, dabei Bindsilan nicht über die Platten verteilen
- Platten, Spacer und Lichtkoppler zusammenbauen und mit Klemmen fixieren
- Gelkamm nochmal säubern, abblasen und zwischen die Glasplatten setzen
- 60 ml Gel-Mix ansetzen:
 - 21,7 g Harnstoff
 - 6,6 ml Long Ranger Gel Solution
 - 9,0 ml 10fach TBE-Puffer
 - mit Millipore-Wasser auf 60 ml auffüllen
- Gel-Mix filtrieren und ca. 10 min entgasen
- 30 µl TEMED und 300 µl 10 %iges APS (w/v) zugeben, ca 30 s gut vermischen
- in eine senkrecht am unteren Rand der Gelkammer stehende Spritze füllen und durch leichtes Anheben der Spritze den Gel-Mix luftblasenfrei zwischen die Glasplatten laufen lassen
- Gel mindestens 1 h auspolymerisieren lassen

Sequenzierreaktion

(nach Zimmermann *et al.*, 1990)

Für die in dieser Arbeit selbst durchgeführten Sequenzierungen wurden folgende Primer eingesetzt:

Primer	Beschreibung	Sequenz
rev	M13 Reverse Sequencq Primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
uni	M13 Universal Sequence Primer	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

Primer-Annealing:

- zu je 10 µl hoch reiner DNA (2-5 µg) werden 2 µl Primer (1,6-2,1 pmol/µl) gegeben
- Denaturierung der Primer durch Zugabe von genau 1 µl 1 M NaOH
- Kurz vortexen und in der Biofuge abzentrifugieren
- Mix 5 min bei 70 °C inkubieren (Denaturierung)
- 2 min bei RT abkühlen lassen und abzentrifugieren

- Neutralisierung durch Zugabe von genau 1 µl 1 M HCl
- 2 µl Annealing-Puffer und 3 µl DMSO zusetzen, mischen
- Ansatz in ein mit 600 ml Wasser (37°C) gefülltes 2 l Becherglas stellen und 45 min auf RT abkühlen lassen

Sythesereaktion (Cy-5 AutoRead Sequencing Kit, Pharmacia):

- pro Sequenzieranalyse je 3 µl A, G, T, und C Nukleotidmixe in eine Mikrotiterplatte pipettieren
- 8 µl T7-Polymerase mit 15 µl Verdünnungspuffer in einem eisgekühlten Eppi mischen (Endkonzentration 3 Unit/µl)
- 1 µl Extensionspuffer und 2 µl verdünnte T7-Polymerase zum Annealing-Ansatz geben
- Mikrotiterplatte im 37 °C Block 1 min vorwärmen
- in definierten Zeitabständen (30 s) jeweils 5 µl des Mixes zu den einzelnen Nukleotidmischen pipettieren
- nach genau 5 min jeweils 5 µl Stopplösung in den selben Zeitabständen (30 s) zugeben
- Ansatz bleibt bei 4 °C stabil

A.L.F.-Sequenzierung

(nach A.L.F. Sequencer Manual)

- auspolymerisiertes Gel nach Vorschrift in den A.L.F.-Sequencer einbauen
- Waaskreislauf und Stromkontakte schließen
- Platte auf 55 °C vorwärmen, Laserstrahl kontrollieren und eventuell ausrichten
- 2 l 0,5fach TBE-Elektrophoresepuffer in die Tanks füllen
- Kamm ziehen und Geltaschen mit Laufpuffer mittels Spritze und Kanüle gut ausspülen
- Proben 5 min bei 85 °C denaturieren, danach auf Eis stellen
- Proben auftragen
- Lauf starten:
 - Spannung: 800 V Laserleistung: 2 mW
 - Stromstärke: 60 mA Meßintervall: 2 s
 - Leistung: 25 W Laufzeit: 720 min
 - Temperatur: 55 °C
- nach dem Lauf A.L.F. die Rohdaten prozessieren lassen
- Gel nach Vorschrift auseinanderbauen und reinigen

3.8.2 Sequenzauswertung

(„Staden Program“ Manual, 1992)

Sämtliche Computeranalyse von DNA-Sequenzen wurden auf einer „SUN SPARC ULTRA 1“ Computeranlage unter dem Betriebssystem „Open Windows“ Version 3.5.1 (Unix) durchgeführt. Die vom A:L.F. Manager aufgezeichneten Sequenzdaten wurden mit Hilfe des „Staden Program“ Version 97-0 (Staden, 1986) sowie des FASTA-Programmpakets (Pearson & Lipman, 1988) durchgeführt. Diese Programme erlauben es, einzelne Sequenzen zu Contigs zusammenzufügen und die DNA- sowie die abgeleiteten Proteinsequenzen computerunterstützt zu analysieren. Homologievergleiche von DNA- und Proteinsequenzen mit den aktuellen Versionen der „EMBL“- und „GenBank“-Nukleotidbanken sowie der „SWISSPROT“-Proteindatenbank wurden mit Hilfe des online Services der „BLAST search programs“ (Altschul *et al.*, 1990, 1997; Gish *et al.* 1993; Worley *et al.*, 1995) durchgeführt.

4 Protein-Biochemische Methoden

4.1 Expression, Extraktion und Darstellung von Proteinen

4.1.1 Proteinexpression und -extraktion

Zur biotechnologischen Herstellung von Proteinen werden speziell konstruierte Vektoren (Expressionsvektoren) genutzt, die nach Ligation mit dem entsprechenden Gen und anschließender Transformation in die Wirtszellen das gewünschte Protein exprimieren. Diese Vektoren zeichnen sich dadurch aus, daß sie vor der multiple cloning site (*mcs*) einen starken transkriptionellen Promotor (z.B. *lac*, *tac* oder *trc*, Amann *et al.*, 1988) besitzen, welcher die Produktion großer Mengen von mRNA des in die *mcs* klonierten Gens veranlaßt. Downstream der *mcs* befinden sich transkriptionale Terminatoren, die den Abbruch der Transkription sicherstellen sollen. Ist auf dem Vektor zusätzlich das, für den *lac*-Repressor kodierende Gen *lacI^Q* vorhanden, so ist der Promotor in Verbindung mit dem *lac*-Operator kontrollierbar. Das entsprechende Gen wird erst nach Zugabe eines Induktors wie z.B. IPTG, meist nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase, transkribiert. Eine solche stringente Repression ist wichtig, wenn das produzierte Protein das Wachstum der transformierten Zellen beeinträchtigt. Um die *in vivo* Translation der produzierten mRNA in ein funktionelles Protein zu gewährleisten, besitzen Expressionsvektoren unmittelbar vor der *mcs* meist eine geeignete Ribosomen-Bindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz).

Der Zellaufschluß erfolgt mechanisch in mit Glasperlen gefüllten Ribo-Tubes, welche durch starke Bewegung im „HYBAID RiboLyser“ die Zellen zermahlen. Lösungen und Puffer siehe 1.3.6.

Expression in *C. glutamicum*

- 20 ml selektives CGXII-Medium werden mit einer Einzelkolonie von einer frischen ü/N inkubierten Plattenkultur angeimpft und ü/N bei 30 °C in einem Schüttler bei 150 rpm angezogen
- mit dieser Vorkultur werden 60 ml selektives CGXII-Medium mit einer o. D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft
- Expression erfolgt bei 30 °C im Schüttler bei 150 rpm
- in geeigneten Abständen werden Proben zur Aktivitäts- und Proteinbestimmung sowie zur Messung der optischen Dichte entnommen
- Kultur wird nach Erreichen der Spät-Stationärphase abgeerntet

Herstellung von *C. glutamicum* Gesamtprotein-Rohextrakten

- 20 ml Zellsuspension werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen
- Pellet in 10 ml H₂O dest. resuspendieren, und erneut 10 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- Überstand quantitativ abziehen und Pellet in 1 ml Aufschlußpuffer resuspendieren
- 1,2 ml Zellsuspension in ein Ribo-Tube überführen und 2 µl DNaseI (1 mg/ml) zugeben
- vortexen und in den RiboLyser einspannen
- Zellen zwei mal bei einer Geschwindigkeit von 6,5 für 30 s aufschließen, dazwischen 5 min auf Eis abkühlen lassen
- nach dem Zellaufschluß 5 min auf Eis abkühlen lassen
- Zelltrümmer und intakte Zellen in Biofuge 15 min bei 15000 rpm abzentrifugieren
- Extrakt in ein Eppi überführen und erneut 20 min zentrifugieren
- den klaren Extrakt in ein neues Eppi überführen und bei -20 °C lagern

Extraktion von *C. glutamicum* Zellwand-Proteinen

- 10 ml einer stationären *C. glutamicum* CGXII-Flüssigkultur werden bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen
- Pellet in 10 ml Waschpuffer resuspendieren und erneut abzentrifugieren
- Pellet in 1 ml Waschpuffer aufnehmen und in ein zuvor gewogenes Eppi überführen
- 5 min bei 15000 rpm zentrifugieren und Überstand quantitativ entfernen
- Gewicht des Pellets bestimmen und die Zellen in gleichem Volumen (w/v) Extraktionspuffer resuspendieren

- Zellsuspension 5 min kochen
- Zellen für 5 min bei 15000 rpm pelletieren
- Überstand in ein neues Eppi überführen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

4.1.2 Bestimmung des Proteingehalts

(BioRad Protein Assay)

Das „Dye-Reagent Concentrate“ von BioRad ist eine sensitive Lösung zur spektrophotometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach der Lowry Methode. Das System basiert auf der Reaktion von Proteinen mit in der Lösung enthaltenen Cu^{2+} -Ionen in alkalischem Milieu. Dabei wird das Kupfer zu Cu^{1+} reduziert, welches dann mit einem Nachweisreagenz einen blauen Farbkomplex bildet. Diese Blaufärbung ist abhängig von der Proteinkonzentration und kompatibel zu ionischen und nichtionischen Detergenzien. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Eichgerade bestimmt.

- Probe in Aufschlußpuffer geeignet verdünnen
- 800 μl dieser Verdünnung mit 200 μl „Dye-Reagent Concentrate“ in einer Küvette mischen
- 5 min bei RT inkubieren
- Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595\text{ nm}$ gegen einen Leerwert (Aufschlußpuffer statt Probe) messen
- für die Eichgerade eine BSA-Konzentrationsreihe mit 1, 5, 10, 15, 20 und 25 μg BSA/ml H_2O dest. ansetzen (Dreifachbestimmung)
- Absorption messen und eine Eichgerade durch Auftragen der Absorption gegen die Proteinkonzentration erstellen
- Bestimmung des Proteingehalts der verdünnten Probe durch Ablesen an der Eichgerade

4.1.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

(nach Laemmli, 1970; modifiziert)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Die größenabhängige Wanderung der Proteine im elektrischen Feld wird dadurch ermöglicht, daß das im Puffer und Polyacrylamidgel enthaltene SDS in konstantem Verhältnis an die Proteine bindet. Dadurch erhalten die Proteine eine gleichartige negative Ladung pro Masseinheit (1,4 g SDS pro g Protein), wodurch die Eigenladung des Proteins unerheblich wird. Zusätzlich führt das anionische Detergenz SDS zur Auflösung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Die länglichen, negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung der Proteinkomplexe erfolgt umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts. Das diskontinuierliche System nach Laemmli bewirkt eine Konzentrierung an der Übergangsstelle zwischen Sammel- und Trenngel, wodurch gut definierte Banden entstehen. Zudem wird die Aggregation und Präzipitation der Proben während des Eintritts in die Gelmatrix verhindert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts unbekannter Proteine werden zusätzlich Eich- oder Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen.

Die Porengröße der Gele wird durch das Verhältnis der Konzentration an Acrylamid zum quervernetzenden N-N'-Methylenbisacrylamid bestimmt. Um kleine Proteine aufzutrennen, werden Gele mit hohem Acrylamid-Anteil benutzt. Lösungen und Puffer siehe 1.3.7.

Die Angaben in der Tabelle über die Zusammensetzung der Gele beziehen sich auf die unter 1.3.7 aufgeführten Lösungen, die angegebenen Volumina reichen für ein Gel.

Trenngel:

Acrylamid (%)	5 %	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %
Trennbereich	50-180 kDa	30-120 kDa	18-75 kDa	15-60 kDa	15-45 kDa
Stammlösung	1,0 ml	1,5 ml	2,0 ml	2,5 ml	3,0 ml
4xTrenngelpuffer.	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml
H ₂ O dest	3,8 ml	3,3 ml	2,8 ml	2,3 ml	1,8 ml
TEMED (10 %)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
APS-Lösung	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Sammelgel:

Acrylamid (%)	5 %
Stammlösung	0,66 ml
4x Sammelgelpuffer	0,8 ml
H ₂ O dest.	2,5 ml
TEMED (10 %)	4 µl
APS-Lösung (10 %)	20 µl

Herstellung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen

- Glasplatten, Gummidichtung und Probenkämme mit H₂O dest. und Ethanol säubern
- Gelkammer zusammenbauen und senkrecht aufstellen
- Trenngel-Lösung der gewünschten Konzentration (siehe Tabelle) frisch ansetzen
- Gel mittels Spritze bis ca. 1 cm unter den oberen Rand der Gelkammer gießen
- zur Glättung der Oberfläche sofort mit wassergesättigtem n-Butanol überschichten
- mindestens 1 h auspolymerisieren lassen, dann das Butanol abgießen
- Sammelgel-Lösung frisch ansetzen, auf das Trenngel gießen
- Kamm einsetzen, Gel muß bis zum oberen Rand stehen, da es sich beim Polymerisieren zusammenzieht
- mindestens 30 min auspolymerisieren lassen
- Gel sofort verwenden oder bis zu 14 d bei 4 °C lagern

Probenvorbereitung und Gelerlauf

- Proben je nach Proteingehalt verdünnen und 6:1 mit 6fach Probenpuffer mischen
- Zugabe einiger Kristalle Saccharose zur Beschwerung der Probe
- Marker ebenfalls 6:1 mit Probenpuffer mischen
- Proben direkt vor dem Auftragen 1 min kochen, kurz abzentrifugieren und auf Eis lagern
- Gel mittels Klammern in die Apparatur einspannen
- insgesamt 250 ml Laufpuffer (1fach) in den vorderen und hinteren Pufferbehälter füllen
- Proben in die Geltaschen füllen
- Elektrophorese erfolgt bei 15-20 mA und ca. 160 V , bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hat (1,5-2 h)

4.1.4 Proteinfärbung im Gel

Im SDS-Gel aufgetrennte Proteine können durch Coomassie Blue gefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Es werden zwei Farbtypen verwendet, Coomassie Brilliant Blue R 250 und Coomassie Brilliant Blue G 250, wobei letzteres insbesondere kleine Proteine und Peptide anfärbt. Das Detektionslimit dieser Methode liegt bei 0,3-1 µg/Proteinbande. In einem Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine werden durch eine Methanol/Eisessig-Fixierlösung präzipitiert, bevor sie mit einer Coomassie Blue R 250/G 250-Lösung angefärbt werden. Da sich dabei das komplette Gel färbt, muß ein Entfärbeschritt durchgeführt werden, bevor die Proteinbanden sichtbar sind und das Gel dokumentiert werden kann.

- Gel vorsichtig von der Gelplatte in eine Schale mit Fixierlösung gleiten lassen, Gel muß gut mit der Lösung bedeckt sein

- 45 min unter Schütteln fixieren lassen
- Lösung vorsichtig abgießen und Coomassie-Färbelösung zugeben
- Gel 45 min unter Schütteln färben
- Lösung durch Schnell-Entfärber ersetzen
- ca. 1 h entfärben, die Lösung dabei mehrfach wechseln
- werden die Proteinbanden sichtbar, kann das Gel in normaler Entfärbe-Lösung ü/N komplett entfärbt werden
- Gel dokumentieren (Fotografieren oder einscannen)
- Gel in 15 % igem Glycerin lagern

4.2 Proteinsequenzierung mit MALDI-PSD

Zur Analyse immobilisierter Proteine wird häufig die MALDI-MS (Matrix assistierte Laser Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie) verwendet (Lottspeich, 1999). Dabei werden ganze präparierte Proteine oder enzymatisch verdaute Proteinfragmente in eine kristalline Matrix kleiner organischer Moleküle eingebettet, in der sie dann durch Laserbeschuss verdunstet und ionisiert werden. Dabei hat die Matrix die Aufgabe, die Proteimmoleküle zu separieren, das Laserlicht zu absorbieren und die Energie durch Relaxation in kurzer Zeit auf das Festkörperraster zu übertragen. Dadurch wird eine explosionsartige Auflösung eines kleinen Bereichs der Festkörperoberfläche und ein Übergang von Matrix und Proteinmolekülen in die Gasphase erreicht. Die entstandenen Protein-Ionen werden dann in einem Flugzeitanalysator beschleunigt und die genaue Flugzeit der Ionen von der Ionisierung bis zur Detektion gemessen. Da die Flugzeit bei einer gegebenen Beschleunigungsspannung und Flugstrecke nur von der Wurzel aus dem Masse/Ladungsverhältnis abhängig ist, kann über eine Eichung eine genaue Massenbestimmung der Analytmoleküle erfolgen. Identifizierung von Proteinen erfolgt durch MALDI-PSD (post source decay), wobei die Tatsache genutzt wird, dass Proteine und Peptide während des Fluges in der feldfreien Driftstrecke des TOF- (time of flight) Analysators spontan zerfallen (metastabiler Zerfall). Diese Fragment-Ionen lassen sich durch Umlenkfelder trennen und über Eichung mit Referenzverbindungen auch in ihrer Masse bestimmen. Die so erhaltenen Spektren werden on-line mit, in einer Datenbank enthaltenen Spektren verglichen, die aus theoretisch möglichen Peptiden *in silico* erstellt wurde. Die Software liefert dann über die Ähnlichkeit einen Identifizierungsvorschlag.

Probenvorbereitung

- SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wie oben beschrieben durchführen
- Eppis werden 3 mal mit 500 µl Trifluor-Essigsäure (TFA)/60 % CH₃CN gewaschen
- die zu untersuchende Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppi überführt und in kleine Stücke zerschnitten
- parallel wird eine Leerprobe, die kein Protein enthält, aus dem Gel geschnitten und immer gleich zur Probe behandelt
- Zugabe von 250 µl 50 % H₂O/ 50 % Acetonitril und Waschen für 5 min
- die Lösung wird durch Zentrifugation entfernt
- die Proben werden in 250 µl 50 % CH₃CN/ 50 mM NH₄HCO₃ für 30 min bei RT inkubiert
- die Lösung wird durch Zentrifugation entfernt
- die Proben werden in 250 µl 50 % CH₃CN/ 10 mM NH₄HCO₃ für 30 min bei RT inkubiert
- die Lösung wird durch Zentrifugation entfernt und die Gelstücke mit einer Speed-Vac vollständig getrocknet
- zu allen Proben werden 0,1 µg modifiziertes Trypsin (Promega) pro 15 mm³ Gel in 15 µl 10 mM NH₄HCO₃ gegeben
- 5- 10 min stehenlassen, damit das Enzym in die Gelstücke einwandern kann
- Zugabe von zusätzlichen 20 µl 10 mM NH₄HCO₃ ohne Enzym
- 24 h Inkubation bei 37 °C
- Lagerung der Proben bei 4 °C

Die MALDI-PSD-Läufe wurden bei der Firma Bruker (Bremen) durchgeführt.

4.3 Nachweis von Enzym-Aktivität

Der Nachweis von Enzymaktivität wurde für Cellulase als auch für Amylase auf Platten- und Flüssigkultur durchgeführt. Während der Plattentest eher zum schnellen Screenen großer Mengen an Bakterien-Stämmen dient, wird mit dem Test in Flüssigkultur die Enzymaktivität quantitativ bestimmt.

4.3.1 Platten-Tests

Cellulase-Aktivitätsnachweis mit Kongo-Rot

(nach Kluepfel, 1988)

Der Cellulase-Aktivitätstest beruht auf der direkten Wechselwirkung des Farbstoffs Kongo-Rot mit β -1,4-Glukanen. Werden diese im Festmedium durch die Cellulase abgebaut, sind sie nicht mehr dauerhaft anfärbbar, d. h., nach Waschung mit NaCl entstehen klare Höfe um die Kolonien herum.

- Anzucht der Bakterienstämme auf Cellulose-haltigen Agarplatten
- Überschichtung der Platten mit 10 ml 0,1 %iger, wässriger Kongo-Rot-Lösung
- 20 min Inkubation, anschließend wird die Färbelösung dekantiert
- Überschichtung mit 5 M NaCl fixiert die angefärbten Bereiche und wäscht den Farbstoff aus den Zonen, in denen er nicht an β -1,4-Glukane binden konnte, aus
- angefärbte Platte dokumentieren

Amylase-Aktivitätsnachweis mit Lugolscher Lösung

Der Amylase-Aktivitätstest beruht auf der Eigenschaft von Jod-Jodkali-Molekülen, sich in den Amylose-Anteil der Stärke einzulagern. Da dazu eine gewisse Länge des Amylose-Moleküls erforderlich ist, wird, durch Amylase degradierte Stärke nicht mehr durch die Lugolsche Lösung gefärbt. Der Amylopektin-Anteil der Stärke, der durch Amylase nicht abgebaut wird, wird mit dieser Nachweismethode auch nicht erfaßt. Da die Amylose nicht komplett abgebaut, sondern lediglich mehrfach unterbrochen werden muß, um nicht mehr anfärbbar zu sein, ist diese Nachweismethode extrem empfindlich.

- Anzucht der Bakterienstämme auf Stärke-haltigen Agarplatten
- Überschichtung der Platten mit ca. 10 ml Lugolscher Lösung
- 2-5 min Inkubation, anschließend wird die Färbelösung dekantiert
- Dokumentation der gefärbten Platten

Nachweis anderer Exoenzyme

Die Aktivität der Enzyme Metalloprotease, Lysozym und Chitinase wurde durch Zugabe der nicht vollständig löslichen Substrate Milchpulver, lyophilisierten *Micrococcus lysodeicticus*-Zellen bzw. kolloidalem Chitin zum Festmedium nachgewiesen. Bei Enzymaktivität zeigen sich klare Höfe um die Kolonien herum.

4.3.2 Enzym-Aktivität im Kulturüberstand

(nach Miller, 1959)

Sowohl die Cellulase- als auch die Amylase-Aktivität in Kulturüberständen wurde colorimetrisch durch Messung der freigesetzten, reduzierenden Zuckern nach der Dinitrosalicylsäure-Methode quantitativ bestimmt. Dinitrosalicylsäure dient sowohl als Stopp- als auch als Nachweis-Reagenz, da es nach Reaktion mit reduzierenden Zuckern bei Erhitzung zu einem Farbumschlag von Gelb nach Rot kommt. Lösungen und Puffer siehe 1.3.9.

Testansatz:

- 500 µl 1 % Cellulose oder Stärke in Probenpuffer
- 500 µl Kulturüberstand in geeigneter Verdünnung mit Probenpuffer

Leerwert:

- 500 µl Dinitrosalicylsäure-Reagenz
- 500 µl Probenpuffer

Kontrolle:

- 500 µl Kulturüberstand in geeigneter Verdünnung mit Probenpuffer
- 500 µl Probenpuffer

Durchführung:

- Inkubation des Ansatzes für einen geeigneten Zeitraum bei 37 °C in einem Wasserbad
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 ml Dinitrosalicylsäure-Reagenz
- 5 min Inkubation auf Eis
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, um unlösliche Bestandteile zu entfernen
- 1 ml des klaren Überstandes wird in ein neues PE-Röhrchen überführt und 5 min gekocht
- Verdünnung des Ansatzes mit 5 ml H₂O dest.
- photometrische Bestimmung der Extinktion bei 546 nm gegen den Leerwert und den Kontrollwert

Die Volumenaktivität U definiert sich in diesem System als:

$$U = \mu\text{mol reduzierende Zucheräquivalente /ml x min}$$

Als Standard diene eine Eichkurve mit 0-2 mg Glukose pro Testansatz.

D Ergebnisse

1) Analyse der *sec*-Gene aus *Corynebacterium glutamicum*

Die Komponenten des Protein-Exportsystems von *C. glutamicum* sind bis heute noch nicht alle bekannt und analysiert. Eine vollständige Analyse dieses „General Secretary Pathway“ (GSP) wäre dabei für das Verständnis der Exportvorgänge und auch für die Entwicklung gentechnisch modifizierter Protein-Produktionsstämme von großem Nutzen. Die essentiellen Hauptbestandteile des GSP, *secA* (Kobayashi *et al.*, 1999), *secY* (Kobayashi *et al.*, 1994) und *secE* (Wehmeier, 1999), wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen isoliert. Das nicht-essentielle Gen *secG* ist seit 1998 bekannt (GenBank D14162). Die ebenfalls nicht essentiellen Gene *secD* und *secF* waren noch unbekannt, obwohl die hohe Konservierung des GSP innerhalb der Bakterien ihr Vorhandensein nahelegte (Siefert *et al.*, 1997). Aufgrund ihrer Funktion innerhalb des GSP üben sie einen sehr starken Einfluß auf die Rate des Proteinexports aus, was sie zu geeigneten Manipulationsobjekten bei der Untersuchung des Proteinexports in *C. glutamicum* macht (Duong & Wickner, 1997a).

1.1) Isolierung und Analyse von *secD* und *secF* aus *Corynebacterium glutamicum*

Die Isolierung der neuen Gene *secD* und *secF* wurde zunächst mit einer heterologen PCR versucht, wobei die Primer-Sequenzen von den homologen Genen aus *Mycobacterium tuberculosis* abgeleitet wurden. Da dieser Versuch fehlschlug und die Gene auch im Rahmen des Genom-Sequenzierprojekts bisher nicht identifiziert werden konnten (B. Bathe, pers. Mitteilung), wurde die konservierte, chromosomale Anordnung der *sec*-Gene zur Isolierung genutzt. In *M. tuberculosis* liegen *secD* und *secF* wie in Abbildung D-1 gezeigt, stromaufwärts von *dciAE*, einem für einen Dipeptidtransporter kodierenden Gen (Cole *et al.*, 1998). Die durch *ruvC*, *A* und *B* kodierten Proteine sind für die Ausbildung der Holliday-Junktions während der homologen Rekombination verantwortlich. PE-PGRS ist eine gerichtete, repetitive Sequenz, *fadD9* kodiert für eine Acyl-CoA-Synthetase und *gabT* für eine 4-Aminobutyrat-Aminotransferase (Cole *et al.*, 1998).

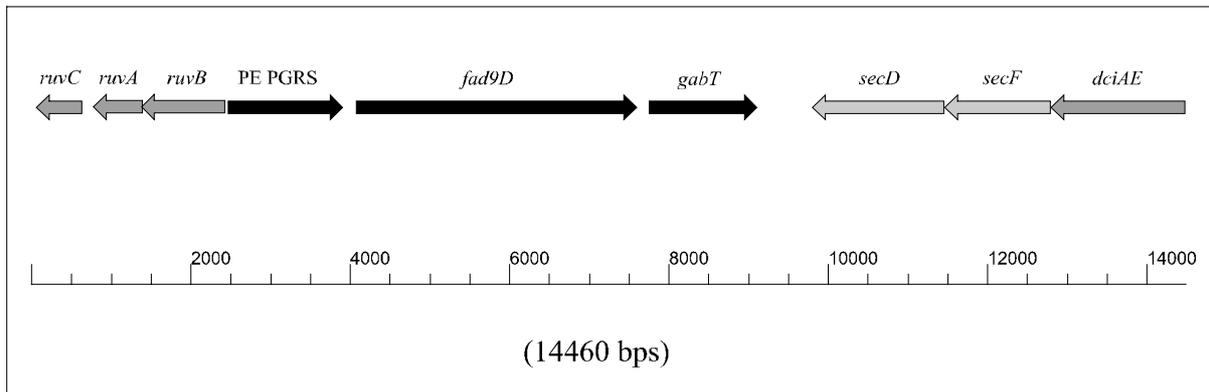


Abbildung D-1: Schematische Darstellung der *secDF*-Genregion in *Mycobacterium tuberculosis*.

Von *dciAE* aus *C. glutamicum* lag ein Fragment vor, das ursprünglich zur Isolierung des *rel*-Gens genutzt wurde (Wehmeier *et al.*, 1998). Dieses Fragment wurde nun zur Isolierung von *secD* und *secF* mittels der Plasmid-Rescue-Technik eingesetzt.

1.1.1) Isolierung von *secD* und *secF* durch Plasmid-Rescue

Die Plasmid-Rescue-Technik beruht darauf, daß ein nicht replizierendes Plasmid über homologe Rekombination in das Chromosom des Zielorganismus integriert und durch passende Restriktion zusammen mit Fragmenten chromosomaler DNA wieder ausgeschnitten wird. Zur Isolierung der *secDF*-Region (siehe Abbildung D-2) wurde das oben beschriebene *dciAE*-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III aus dem Vektor pLW60 in den *E. coli*-Vektor pCR2.1 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mittels Elektroporation nach *C. glutamicum* transferiert. Da es nicht in der Lage ist, in *C. glutamicum* zu replizieren, kann der Organismus nur auf Kanamycin-haltigem Medium wachsen, wenn das Plasmid durch homologe Rekombination über *dciAE* in das Chromosom integriert wurde. Die GesamtdNA des resultierenden Stammes *C. glutamicum* IAE wurde isoliert und mit einzelnen oder verschiedenen Kombinationen von Restriktionsenzymen gespalten, wobei der Vektor pCR2.1 intakt und mit einem stromaufwärts des *dciAE*-Gens gelegenen DNA-Fragment verbunden blieb. Nach Ligation der Fragmente und Elektroporation der Ligationsansätze replizieren in *E. coli* je nach verwendeten Restriktionsenzymen unterschiedlich große Plasmide, bestehend aus pCR2.1 und chromosomalen Fragmenten unterschiedlicher Länge (siehe Tabelle D-1).

Verwendete Restriktionsenzyme	Länge des chromosomalen Fragments
<i>EcoRV/NruI</i>	0,5 kb
<i>XhoI</i>	2,6 kb
<i>XbaI</i>	5,5 kb
<i>NsiI</i>	7,5 kb
<i>EcoRV/SspI</i>	9,8 kb

Tabelle D-1: Je nach verwendeten Restriktionsenzymen variiert die Länge des chromosomalen Fragments zwischen 0,5 und 9,8 kb.

Der Vektor mit dem größten chromosomalen Insert, pRRES, wurde zur weiteren Analyse eingesetzt.

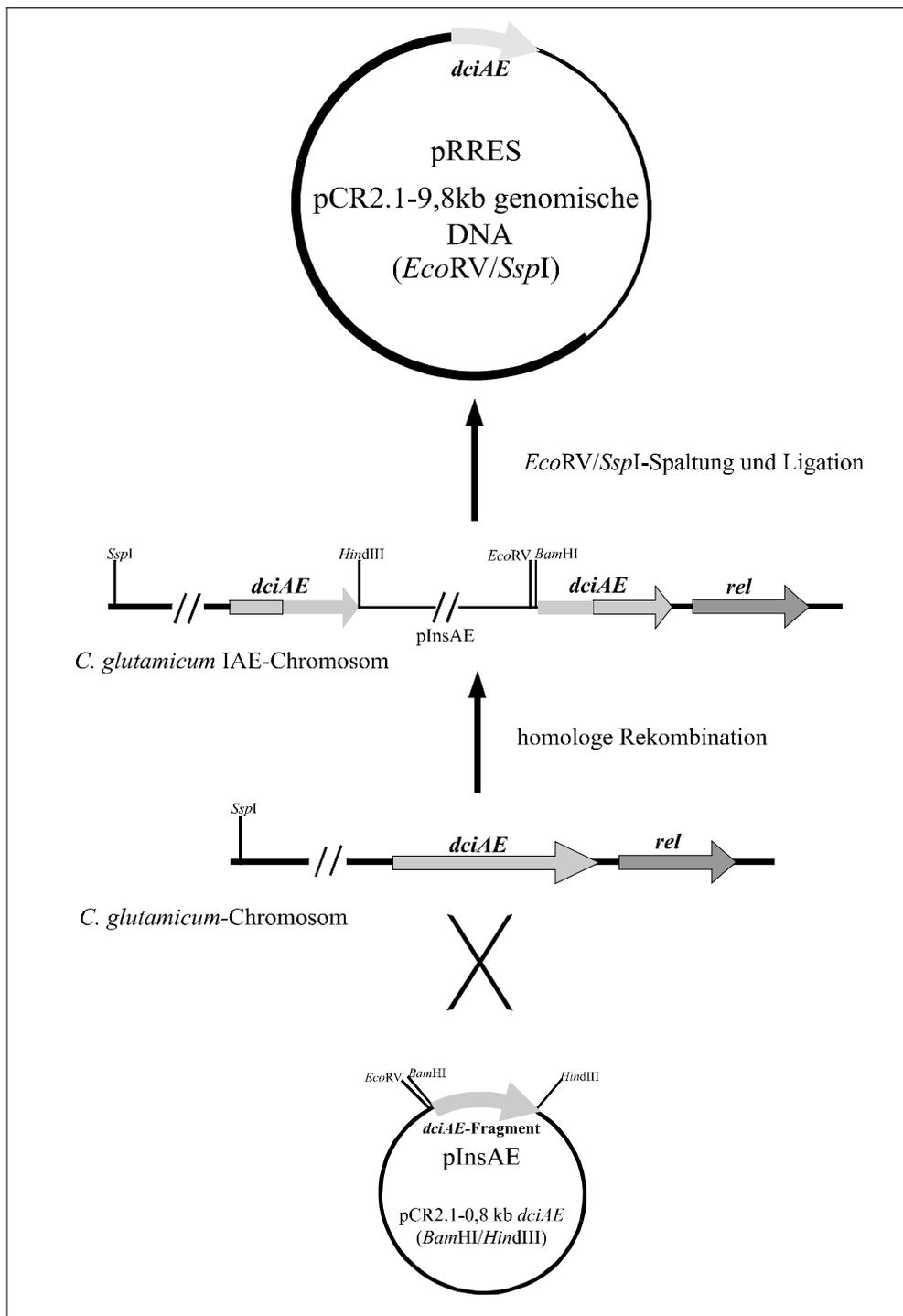


Abbildung D-2: Schematische Darstellung des Plasmid-Rescues eines 9,8 kb großen chromosomalen Fragments aus *C. glutamicum*. Der Vektor pInsAE wird über homologe Rekombination in das *C. glutamicum*-Chromosom integriert und durch Restriktion mit den Enzymen *EcoRV* und *SspI* mit samt einem 9,8 kb großen chromosomalen Fragment wieder ausgeschnitten und ligiert.

1.1.2) Komplett-Sequenzierung und Analyse der 9,8 kb-Region

Das genomische, 9,8 kb große Insert von pRRES wurde mittels „Primer-Walking“ vollständig doppelsträngig sequenziert. Dazu wurden anhand der Sequenzdaten bereits durchgeführter Sequenzierungen jeweils die Primer für die nächste Sequenzierung abgeleitet. Die Sequenzierungen sind durch die IIT-Biotech GmbH (Bielefeld) durchgeführt worden. Die einzelnen Sequenzen wurden zu einem kontinuierlichen DNA-Strang zusammengefügt und einer Kodierbereichsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung D-3 dargestellt. Die potentiellen Kodierbereiche (ORF) wurden mit dem Staden-Programm XNIP bestimmt, wobei der Computeranalyse eine *C. glutamicum* Codon-Präferenzliste (Kalinowski, 1990) zugrunde lag.

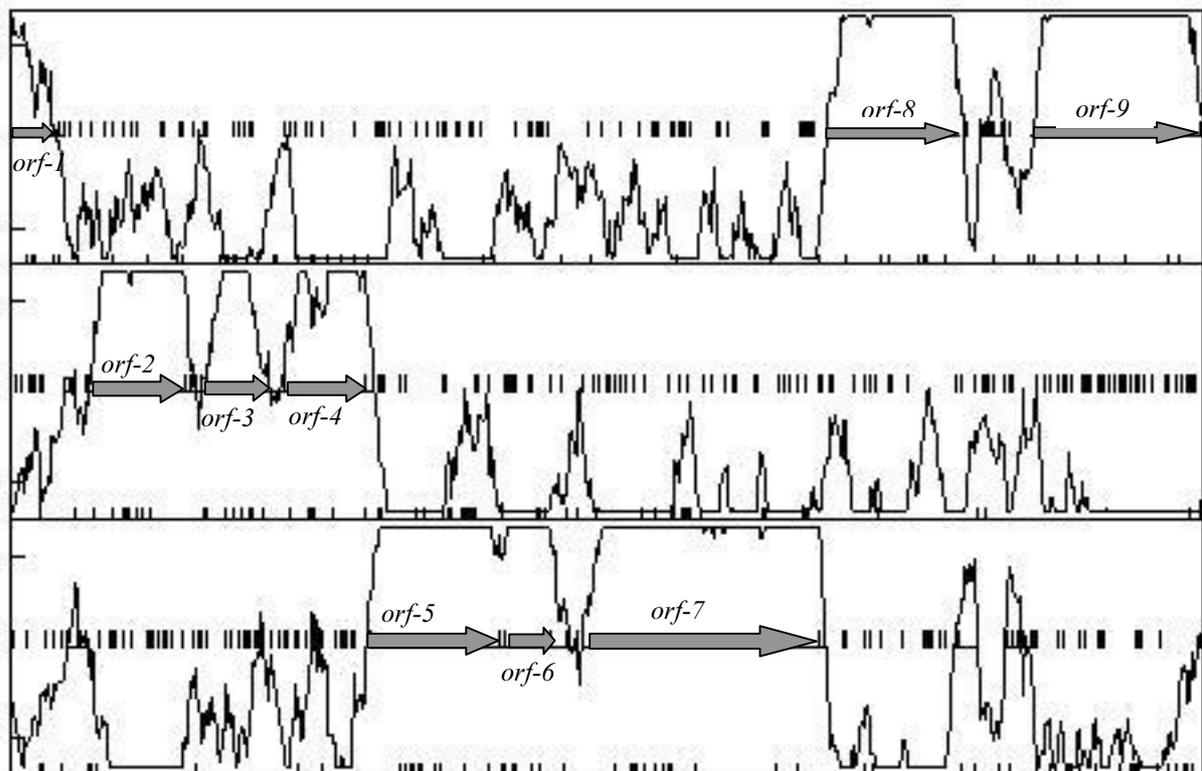


Abbildung D-3: Kodierbereichsanalyse des 9,8 kb-Rescues (nach Staden, 1986). Startcodons sind als senkrechte Striche auf der Grundlinie, Stoppcodons in der Mitte des jeweiligen Rasters dargestellt. Bereiche hoher Kodierwahrscheinlichkeit liegen oberhalb der Mittellinie. Die Region weist neun potentielle offene Leseraster (ORF, open reading frame) in gleicher Leserichtung auf dem Plusstrang auf. Lage und Orientierung der ORFs sind durch graue Pfeile angegeben.

Um die potentiellen ORFs, die alle in gleicher Leserichtung auf dem Plusstrang liegen, zu identifizieren, wurde mit den Blast-Programmen (Altschul *et al.*, 1990; 1997) Homologievergleiche mit bereits sequenzierten Genen in der GenBank-Datenbank durchgeführt. Die ORFs sind in Tabelle D-2 genauer charakterisiert. ORF-1 weist Homologie zu der Acyl-CoA-Transferase *tesB2* und ORF-2 zu *yfcA*, einem hypothetischen Protein mit Ähnlichkeit zu bakteriellen Strukturproteinen, auf. Bei den ORFs 3 bis 5 handelt es sich um das *ruv*-Cluster, bestehend aus den Genen *ruvC*, *ruvA* und *ruvB*, die während der homologen Rekombination für die Ausbildung der Holliday-Junctions sind (West *et al.*, 1997). ORF-7 wurde als *secD* und ORF-8 als *secF* erkannt, ORF-9 als *dciAE*. Lediglich zu ORF-6 konnte kein Gen mit signifikanter Homologie gefunden werden.

Die Startcodons der identifizierten Gene wurden anhand der Homologiedaten und dem Vorhandensein einer potentiellen Ribosomen-Bindestelle (RBS) bestimmt. Abbildung D-4 zeigt eine Restriktionskarte der sequenzierten Genregion. Die vollständige DNA-Sequenz der Region und die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der entsprechenden Proteine ist im Anhang dargestellt.

Damit waren *secD* und *secF* aus dem Chromosom isoliert und standen für weitere Analysen zur Verfügung.

ORF	Länge (AS)	Homologe Gene aus <i>M. tuberculosis</i> (Cole <i>et al.</i> , 1998)	e-Value
ORF-1	133	<i>tesB2</i> (part.), Acyl-CoA-Transferase	$7e^{-31}$
ORF-2	251	<i>yfcA</i> , hypothetisches bakterielles Strukturprotein	$6e^{-104}$
ORF-3	221	<i>ruvC</i> , „Holliday-Junktion“-Resolvase	$2e^{-54}$
ORF-4	208	<i>ruvA</i> , „Holliday-Junktion“-DNA Helicase	$7e^{-19}$
ORF-5	364	<i>ruvB</i> , „Holliday-Junktion“-DNA Helicase	$8e^{-125}$
ORF-6	121	keine Homologie	
ORF-7	637	<i>secD</i> , Proteinexport-Membranprotein	$2e^{-99}$
ORF-8	403	<i>secF</i> , Proteinexport-Membranprotein	$2e^{-86}$
ORF-9	518	<i>dciAE</i> , Dipeptidtransporter	$1e^{-35}$

Tabelle D-2: Identifizierung der ORFs des „Plasmid-Rescues“. Der „e-Value“ ist das Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um ein anderes als das genannte Gen handelt.

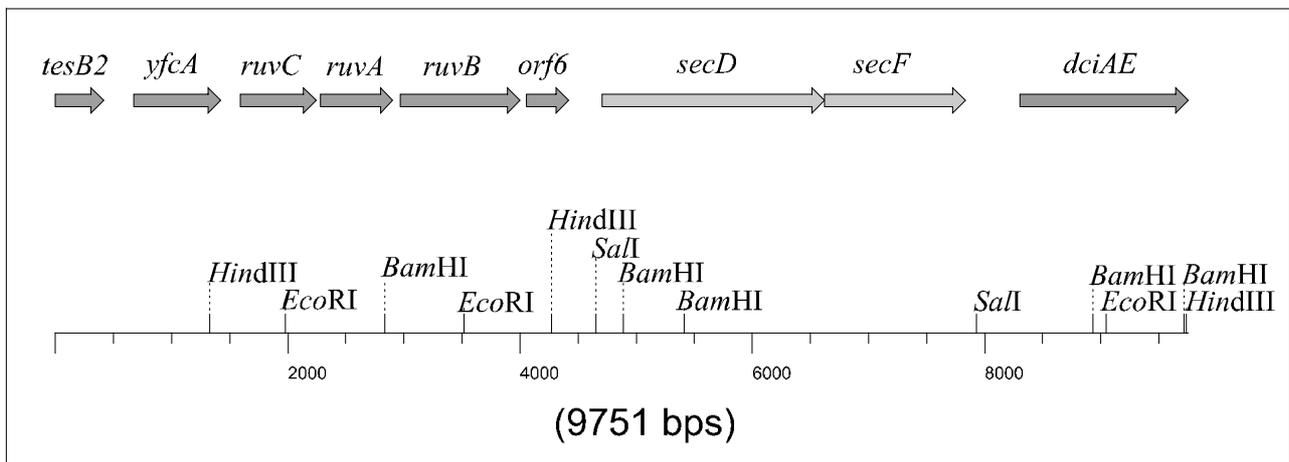


Abbildung D-4: Restriktionskarte der 9,8 kb-Region und der in ihr enthaltenen Gene.

1.1.3) Analyse von *secD*

Nachdem *secD* isoliert war, begann die Analyse des Gens und der abgeleiteten Proteinsequenz. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung D-5 dargestellt.

Das *secD*-Gen aus *C. glutamicum* wird aus 1911 Basenpaaren gebildet. Homologie-Vergleiche und eine potentielle Ribosomen-Bindestelle AAGGA lassen vermuten, daß das Gen mit dem seltenen Start-Codon TTG beginnt.

Das Gen spezifiziert ein Protein aus 637 Aminosäuren und weist eine kalkulierte molekulare Masse von 67689 Dalton auf. Der theoretische, isoelektrische Punkt pI liegt bei 4,52. Die Analyse der Aminosäure-Sequenz des SecD-Proteins mit dem Computerprogramm HMMTOP (Tusnády & Simon, 1998) ergab, daß das Protein sechs Transmembran-Domänen in ungleichmäßiger Verteilung aufweist. Folge dieser Aufteilung ist, daß mehr als Hälfte des Proteins, nämlich 371 Aminosäure-Reste, als großer, extracytoplasmatischer „Loop“ vorliegen. Ein Alignment des *C. glutamicum* SecD-Proteins mit dem homologen Protein aus *M. tuberculosis* mit Hilfe des CLUSTAL-W-Programms (Myers & Miller, 1988) zeigte eine Ähnlichkeit von 61 % und eine Identität von 41 % zwischen den beiden Proteinen (Abbildung D-6). Diese Homologie ist jedoch nicht gleichmäßig über das gesamte Protein verteilt, der C-terminale Anteil des Proteins, der fünf der sechs Transmembran-Domänen trägt, ist deutlich besser konserviert als der extracytoplasmatische „Loop“, zudem ist das Protein gegenüber dem mycobakteriellen SecD-Protein C-terminal verlängert. Weiterführende Computeranalysen der Aminosäure-Sequenz zeigten sechs konservierte Bereiche, die in allen

	I	D1	
CgSecD	MARQKKSAA SAWER WPKRAIALFVLI VVG VYALVLLTGD RSAT PKLGD LQGG TRVTL---VPQGDPTQDQLNQARTIL		77
MtSecD	----MASSA-PVHPARYLSVFLVMLIGIYLLVFFTGDKHTA PKLGD LQGGTRVTLTARTPDGSAPSREALAQAI		74
	D2		
CgSecD	ENRVNGMGVSGASV VADGN TLVITVPGENTAQAQSLGQTSQLLFRPVGQAGMPDMTTLMPELEEMANRWVEYGVITEEQ		157
MtSecD	S RVNGLG VSGSEV VVDGD NLVITVPGNDGSEARNLGTARLYIRPVLNS-MPAQPAEEPPAPSAEPQPPGQPAAPP		153
CgSecD	NASLEEMNTAVASTT-AVEGEEATEPEPVTVSATPMDEPANSIEATQRRQEITDMLRTD---RQSTDPTVQIAASSL--M		234
MtSecD	AQSGAPASPQPGAQPRYPQDPAPSPNP-TSPASPPAPPAPAEAPATDPRKDLAERIAQEKKLRQSTNQYMQMVALQFQAT		232
CgSecD	QCTTDEMDPLAGTDDPRLPLVACDPAVGGVYVLDPAPLLNGETDEENGARLTGNEIDTNRPIITGGFNAQSGQMEISFAFK		314
MtSecD	RCESD--DILAGNDPKLPLVTCSTDHKTAYLLAPS-IIISGDQ-IQNAT--SG--MDQ-RGI--GY-----VVDLQFK		294
		D3	
CgSecD	SGDGEESATWSSSLTSQYLQQQIAITLDSQVISA PVIQSAT PVGSATSITGD--FTQTEAQDLANNLRYGALPLSFAGEN		392
MtSecD	-G---PAANIWADYTAAHIGTQTAF TLD SQVVSAPQIQEAIPGGRTQISGGDPPFTAATARQLANVLYGSLPLSF--EP		368
	D4	II	III
CgSecD	GERGGTTTVPSSLGAASLKAGLIAGIVGIALVALFVFAYYRVFGFVSLFTLFAAGVLVYGLLVLLGRWIGYS LDLAGIA		472
MtSecD	SE----AOTVSATLGLSSLRAGMIAGAI GLLLV LYSLLYRVLGLLTALSLVASGSMVFALLVLLGRYINYTL LDLAGIA		444
	IV	D5	V
CgSecD	GLIIIGIGTTADSFVV FYERIKDE IREGSRFRSAVPRAWESAKR TIVTGNM VTLGAI VIYLL LAVGEVKGFAFTLGLTTFV		552
MtSecD	GLIIIGIGTTADSFVV FFERIKDE IREGSRFRSAVPRGWARARK TIVSGNA VTF LAAAV LYFLAIGOVKGFAFTLGLTTIL		524
	VI		
CgSecD	DLVVTFLITAPLVILASRNPF FAK SSVNGMGRVMKLVERRANGELDEPEYLKKIHAKNAAADKASTDNSSTDNSEAPGT		632
MtSecD	DLVVVFLVTWPLVYLASKSLLAKPAYNGLGAVQQVARERRAMARTGRG-----		573
CgSecD	DTNQEEEK		637
MtSecD	-----		573

Abbildung D-6: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von SecD von *C. glutamicum* und *M. tuberculosis*. Identische Aminosäuren (*) und konservative Austausche (:) sind gekennzeichnet. Die konservierten Regionen D1-D6 sind gerahmt. Die Transmembrandomänen aller Proteine wurden durch das HMMTOP-Programm (Tusnády & Simon, 1998) bestimmt.

1.1.4) Analyse von *secF*

Nach der Analyse von *secD* wurde in gleicher Weise das Gen *secF* und das daraus abgeleitete Protein untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung D-7 dargestellt.

Das Gen *secF* aus *C. glutamicum* besteht aus 1209 Basenpaaren, beginnt fünf Basen nach dem Stoppcodon von *secD* und seine wahrscheinliche Ribosomen-Bindestelle AGGAG ist Teil des 3'-Endes von *secD*. Die Distanz zwischen dem *secD*-Stoppcodon TAG und dem *secF*-Startcodon ATG beträgt zwei Nukleotide.

Mit 403 Aminosäure-Resten weist das SecF-Protein eine berechnete Masse von 43663 Dalton auf, der theoretische isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei 5,07. Die Struktur des SecF-

Proteins spiegelt die des SecD-Proteins wieder. Es besitzt ebenfalls sechs Transmembran-Domänen und einen extracytoplasmatischen „Loop“, der mit 95 Aminosäure-Resten aber nur ein Viertel des Proteins ausmacht. Verglichen mit SecF aus *M. tuberculosis* ist das Protein zu 43 % identisch und zeigt insgesamt eine Ähnlichkeit von 60% (Abbildung D-8). Wie bei SecD erstreckt sich diese Ähnlichkeit aber nicht über das ganze Protein, auch hier ist der extracytoplasmatische Loop weniger konserviert als der Transmembran-Domänen-tragende Teil des Proteins. Wie in Abbildung D-8 zu sehen, ist SecF aus *C. glutamicum* gegenüber SecF aus *M. tuberculosis* N-terminal verkürzt.



Abbildung D-7: DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäure-Sequenz von *secF* aus *C. glutamicum*. RBS und Startcodon sind in Blau gekennzeichnet, Transmembran-Domänen in Gelb. Die in allen SecF-Proteinen zu findenden, konservierten Regionen F1-4 sind rot markiert. Die beiden potentiellen SecY-Interaktionsstellen sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.

1.2) Analyse von *secA*, *secY*, *secE* und *secG* und umliegender DNA-Regionen

Um alle *sec*-Gene aus *C. glutamicum* untersuchen zu können, mußten auch die bereits bekannten Gene *secA*, *secY*, *secG* und *secE* samt umliegender Regionen isoliert werden. Dies erfolgte nicht nur, um den „General Secretory Pathway“ in allen Hauptkomponenten zu analysieren, sondern auch, um Aussagen über chromosomale Anordnung und Vergesellschaftung mit anderen Genen treffen zu können. Da alle vier Gene als Sequenz in Datenbanken vorlagen, ließen sie sich mittels PCR mit chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* isolieren.

1.2.1) Isolierung und Analyse von *secA* und *secY* und benachbarter Regionen

Von den beiden essentiellen *sec*-Genen *secA*, der eigentlichen Translokase, und *secY*, der Hauptkomponente der Membranpore, waren lediglich die kodierenden Bereiche der Sequenz veröffentlicht (Kobayashi *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1994). Um die vollständigen Gene und die benachbarten Regionen zu isolieren, mußten die entsprechenden Cosmide aus einer Cosmid-Bank (Bathe *et al.*, 1996) durch Koloniehybridisierung identifiziert werden. Dazu wurden von beiden Genen zunächst interne Fragmente mittels PCR hergestellt. Alle benötigten Primer ließen sich aus den bekannten Sequenzen herleiten. Durch die Primerpaare saf1 und saf2 sowie syf1 und syf2 lies sich ein 1,1 kb großes, internes *secA*-Fragment, beziehungsweise ein 0,8 kb großes, internes *secY*-Fragment amplifizieren. Beide Fragmente wurden jeweils in den Vektor pUC19 kloniert, zur Kontrolle ansequenziert und zur Verwendung als Hybridisierungsprobe mit Digoxigenin markiert.

Sowohl die *secA*-Sonde als auch die *secY*-Sonde wurden zur Koloniehybridisierung gegen eine *C. glutamicum*-Cosmidbank verwendet. Dazu wurden zunächst je 576 Einzelkolonien, die jeweils ein anderes Cosmid trugen, auf einer Nylon-Membran lysiert. Die DNA wurde fixiert und die Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Dadurch identifizierte, *secA* bzw. *secY*-tragende Cosmide wurden anschließend isoliert. Anhand der für beide Gene bekannten Sequenz wurden Restriktionsenzyme bestimmt, für die innerhalb der Gene keine Schnittstellen vorlagen. Restriktionsanalysen von *secA*- und *secY*-tragenden Cosmiden mit *EcoRI* und *HindIII* und anschließende Hybridisierungen ergaben ein ca. 4 kb großes DNA-Fragment, daß das vollständige *secA* enthielt und ein ca. 2,5 kb großes Fragment mit dem kompletten *secY*. Um die Gene zu isolieren, wurden die mit *EcoRI* und *HindIII* verdauten

Cosmide in einen gleichermaßen gespaltenen pUC19-Vektor subkloniert. Die resultierenden Subklone wurden auf Agarplatten gestochert und zur Identifizierung der *secA*- oder *secY*-tragenden pUC19-Derivate einer erneuten Koloniehybridisierung unterzogen. Das Insert signalgebender Kolonien wurde durch die IIT-Biotech GmbH (Bielefeld) vollständig sequenziert.

Die Auswertung der Sequenz von *secA* ergab eine völlige Identität zur bereits publizierten Sequenz (Kobayashi *et al.*, 1999). Das Gen kodiert mit 2538 Basenpaaren für ein Protein aus 743 Aminosäuren. Wie im Anhang dargestellt, zeigten Computeranalysen und Homologievergleiche der Aminosäure-Sequenz von SecA eine hochaffine ATP-Bindestelle I und eine niedrigaffine ATP-Bindestelle II. Zwischen den Bindestellen liegt die Region, die vermutlich für die Bindung an den Precursor des Präproteins verantwortlich ist. Die carboxyterminale Region des Proteins dient vermutlich der Dimerisierung mit einem anderen SecA-Protein und der Interaktion mit SecY.

Auch die *secY*-Sequenz zeigt völlige Identität zur publizierten Sequenz. Das 442 Aminosäuren umfassende Protein wird durch 1326 Basenpaare kodiert. Wie im Anhang abgebildet, weist SecY 10 Transmembran-Domänen auf, die regelmäßig über das Protein verteilt sind.

1.2.2) Isolierung und Analyse von *secE*, *secG* und benachbarten Regionen

Da für die beiden Gene *secE* (Wehmeier, 1999) und *secG* (GenBank D14162) nicht nur die Kodierbereiche sondern auch die benachbarten DNA-Regionen bekannt waren, konnten sie direkt durch PCR amplifiziert werden.

Mit den Primern ser1 und ser2 wurde ein 838 bp-Fragment, welches das vollständige *secE* enthält, generiert und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Eine Sequenzauswertung zeigte, daß das 333 AS-Protein nur eine einzige Transmembran-Domäne am C-Terminus aufweist. Der *secE*-Promotor wurde bereits früher als F37-Promotor beschrieben (Pátek *et al.*, 1996). Direkt auf den *secE*-Kodierbereich folgt ein Transkriptionsterminator.

Zur Isolierung von *secG* wurde wie bei der Isolierung von *secE* vorgegangen. Durch PCR mit den Primern sgr1 und sgr2 wurde ein 443 bp-Fragment, welches das vollständige *secG*-Gen enthielt, isoliert und in den Vektor pCR2.1 kloniert. Die Sequenzanalyse ergab, daß das SecG-Protein drei Transmembran-Domänen aufweist, die über 75% des 76 Aminosäuren

großen Proteins ausmachen. Die DNA- und die Aminosäure-Sequenz sind im Anhang dargestellt.

1.3) Chromosomale Anordnung der *sec*-Gene in *Corynebacterium glutamicum*

Da nun die Sequenzen aller *sec*-Gene aus *C. glutamicum* vorlagen, konnte ihre chromosomale Anordnung untersucht werden. Dazu wurden die einzelnen Sequenzen gegen die Sequenz des Genoms von *C. glutamicum* abgeglichen (B. Bathe, pers. Mitteilung). Abbildung D-9a zeigt die Verteilung der *sec*-Gene auf einer *SwaI*-Makrorestriktionskarte des *C. glutamicum*-Genoms (Bathe *et al.*, 1996). Wie sich zeigt, sind die *sec*-Gene nicht in einem Cluster angeordnet, sondern über das gesamte Genom verteilt.

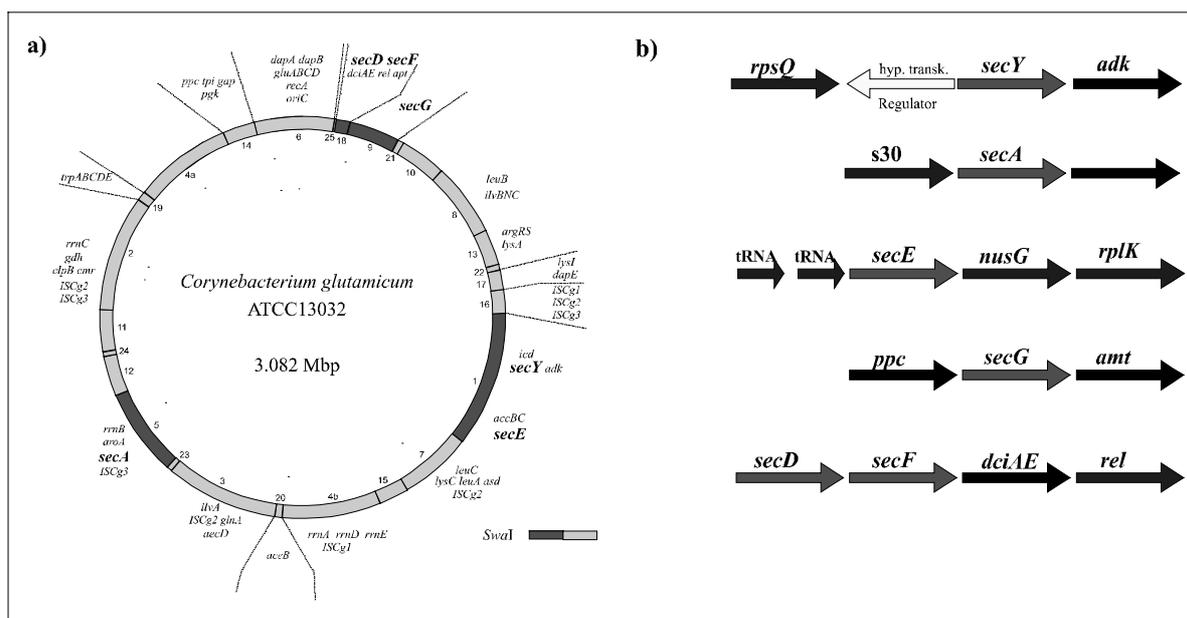


Abbildung D-9: Chromosomale Anordnung der *sec*-Gene in *Corynebacterium glutamicum*.

a) Kartierung der *sec*-Gene auf einem schematisch dargestellten *SwaI*-Restriktionsprofil des *C. glutamicum*-Genoms (Bathe *et al.*, 1996).

b) Schematische Darstellung der *sec*-Gene und benachbarter Gene aus *C. glutamicum*. Rote Pfeile entsprechen *sec*-Genen, blaue Pfeile Genen, die in Translations- und Transkriptionsprozessen involviert sind. Andersfarbige Pfeile entsprechen Genen, die zu keiner der beiden Funktionsklassen zugehörig sind.

Eine Analyse der umliegenden Regionen der *sec*-Gene (Abbildung D-9b) ergab, daß alle *sec*-Gene mit Ausnahme von *secG* mit Genen vergesellschaftet sind, die an Transkriptions- oder Translationsprozessen beteiligt sind. Stromaufwärts von *secY* liegt ein für ein ribosomales Protein kodierendes Gen *rpsQ*. Das vor *secA* gelegene Gen kodiert für ein ribosomales Protein der S 30-Familie, vor *secE* liegen zwei tRNAs, dahinter das an der Transkriptionstermination beteiligte Gen *nusG* und *rplK*, das für ein weiteres ribosomales Protein kodiert. Stromabwärts von *secD* und *secF* liegt *rel*, das für eine ppGpp(p)-Synthetase (Wehmeier *et al.*, 1998) kodiert, die zeitweilig mit dem Ribosom assoziiert ist. Lediglich *secG* ist nicht mit Genen der Translation oder Transkription assoziiert, sondern mit *ppc* und *amt*, kodierend für eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase und ein Ammoniumaufnahme-Protein.

Die Vergesellschaftung mit ribosomalen Proteinen ist zumindest für *secE* und *secY* innerhalb aller bisher untersuchten Bakterienspezies konserviert (Siefert *et al.*, 1997). Eine *C. glutamicum* spezifische Besonderheit stellt der hypothetische, transkriptionale Regulator stromaufwärts von *secY* dar. Er ist an dieser Position weder im taxonomisch nahestehenden *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) noch in den weniger nahe verwandten Bakterien *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) oder *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich *et al.*, 1996) zu finden. Zudem ist es das einzige, den *sec*-Genen direkt benachbarte Gen in *C. glutamicum*, das nicht in der gleichen Orientierung vorliegt.

2) Mutation und Überexpression von *sec*-Genen in *Corynebacterium glutamicum*

Die Analyse einer Genfunktion erfolgt zumeist durch Mutation und Überexpression des Gens. Durch die dabei auftretenden Phänotypen kann man im Idealfall auf die Funktion eines Gens schließen. Da es sich beim „General Secretory Pathway“ in *C. glutamicum* um ein komplexes System mit vielen Komponenten handelt, die sich zudem zum Teil noch gegenseitig für ihre Funktion bedingen, ist allerdings zu erwarten, dass sich eventuelle Phänotypen nicht unbedingt auf die Funktion eines einzelnen Gens zurückführen lassen. Zudem sind einige Bestandteile des „General Secretory Pathway“ als essentiell für das Überleben der Zelle beschrieben worden. Ein Ausschalten dieser Gene ist also letal und erbringt darüber hinaus keine weitere Information.

Da nach der Isolierung der neuen *sec*-Gene *secD* und *secF* und der Klonierung der bereits bekannten *sec*-Gene alle zentralen Komponenten des GSP aus *C. glutamicum* vorlagen, begann die Stammkonstruktion zur Überexpression und Mutation von *sec*-Genen. Anschließend wurden die Effekte dieser Manipulationen an Komponenten des GSP auf die Sekretion endogener *C. glutamicum*-Proteine untersucht.

2.1) Überexpression von *sec*-Genen

Zur Analyse des Effekts der Überexpression von *sec*-Genen wurden diese jeweils einzeln oder in verschiedenen Kombinationen auf Expressionsplasmide kloniert und nach *C. glutamicum* transferiert.

2.1.1) Überexpression von einzelnen *sec*-Genen

Zur Überexpression von einzelnen *sec*-Genen wurden zunächst promotorlose Amplifikate aller Gene mittels PCR erstellt. Die Primer wurden dabei so gewählt, daß das Amplifikat möglichst mit der Ribosomen-Bindestelle des Gens beginnt. Tabelle D-3 beschreibt die dabei erzeugten Produkte.

Gen	Primerpaar	Länge (bp)
<i>secA</i>	sa1/sa2	2742
<i>secY</i>	sy1/sy2	1510
<i>secE</i>	se1/se2	348
<i>secG</i>	sg1/sg2	355
<i>secD</i>	sd1/sd2	1998
<i>secF</i>	sf1/sf2	1376

Tabelle D-3: Amplifizierung aller *sec*-Gene. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, daß das PCR-Produkt möglichst nur den Kodierbereich des jeweiligen Gens und nie den dazu gehörenden Promotor enthält.

Alle so gewonnen PCR-Produkte wurden in den linearisierten Vektor pCR2.1 kloniert, der auf beiden Seiten der Klonierstelle für PCR-Produkte eine *EcoRI*-Schnittstelle aufweist. Da keines der PCR-Produkte eine interne *EcoRI*-Schnittstelle aufweist, ließen sich die *sec*-Gen tragenden Fragmente mit diesem Restriktionsenzym aus den resultierenden Vektoren isolieren und in den ebenfalls mit *EcoRI* verdauten Vektor pEC-XT99 (Kirchner, 1999) klonieren. Die Überprüfung der Orientierung der *sec*-Gene auf dem Plasmid erfolgte durch Kontrollspaltungen mit geeigneten Restriktionsenzymen. Die resultierenden Vektoren sind in Abbildung D-10 dargestellt. Das Plasmid pEC-XT99 ist ein Expressionsvektor, der in *E. coli* und *C. glutamicum* replizieren kann. Er vermittelt Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin und trägt vor der multiple cloning site den starken *trc*-Promotor (Amann *et al.*, 1988), der durch IPTG induziert werden kann.

Die neu konstruierten *sec*-Plasmide wurden nach *C. glutamicum* elektrotransferiert und ihr Wachstum im Minimalmedium CGXII unter Induktion mit IPTG überprüft. Als Kontrolle diente ein *C. glutamicum*-Stamm, der den Leervektor pEC-XT99 trug. Sie *sec*-Gene überexprimierenden Stämme unterscheiden sich in Bezug auf das Wachstum nicht signifikant vom Wildtyp. Die Generationszeit beträgt für alle Stämme ca. 135 (\pm 11) min., allerdings ist die lag-Phase der Stämme, die die Plasmide pSecA, pSecE, pSecG und pSecY tragen, um bis zu 6 h verlängert. Bei den Stämmen, die *secD* oder *secF* überexprimieren, tritt keine Verlängerung der lag-Phase auf.

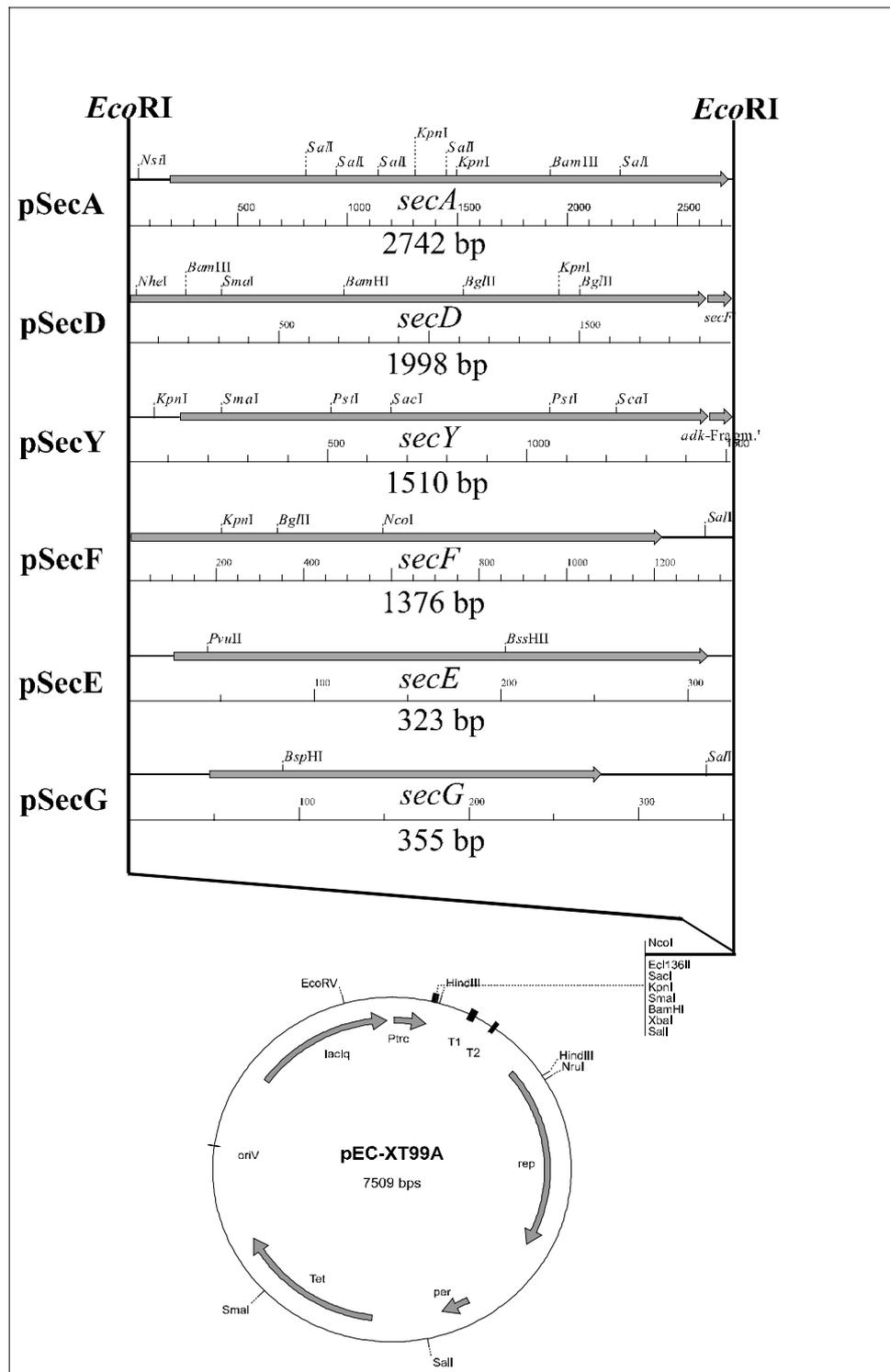


Abbildung D-10: Konstruktion von Plasmiden zur Überexpression einzelner *sec*-Gene. Die promotorlosen Gene wurden alle mittels *EcoRI* in den *E. coli*-*C. glutamicum* Shuttle Expressionsvektor pEC-XT99 kloniert. Abkürzungen: *lacIq*, Inhibitor des *trc*-Promotors; *per*, Kopienzahl-Kontrolle der Vektors; *P_{trc}*, *trc*-Promotor; *oriV*, vegetativer Replikationsursprung für *E. coli*; *rep*, Replikationsgen für *C. glutamicum*; *tet*, Tetracyclinresistenz; T1, T2, *rrnB*-ribosomale Terminatoren.

2.1.2) Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen

Um den Effekt der gleichzeitigen Überexpression mehrerer *sec*-Gene zu untersuchen, wurden exemplarisch die Kombinationen *secDF*, *secEDF* sowie *secYDF* jeweils auf ein Plasmid kloniert. Es wurden diese Kombinationen gewählt, weil die direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen in der Cytoplasmamembran beschrieben ist (Sagara *et al.*, 1994).

Zur Klonierung von Kombinationen von *sec*-Genen wurde zunächst das Plasmid pRRES mit dem Restriktionsenzym *SalI* gespalten. Ein daraus resultierendes, ca. 3 kb großes Fragment trägt das promotorlose *secD* und *secF*, welches noch über seinen eigenen Promotor verfügt. Das Fragment wurde aus einem Agarose-Gel isoliert und in den ebenfalls mit *SalI* linearisierten Vektor pEC-XK99 kloniert. Das Plasmid pEC-XK99 (Kirchner, 1999) ist wie pEC-XT99 ein *E. coli/C. glutamicum* Shuttle Expressionsvektor, vermittelt aber eine Kanamycin-Resistenz. Wie in Abbildung D-11 dargestellt, diente der neu konstruierte Vektor pSecDF als Ausgangspunkt für die Klonierung weiterer Kombinationen von *sec*-Genen. Dazu wurden die im vorigen Abschnitt beschriebenen, promotorlosen PCR-Amplifikate der Gene *secE* und *secY* jeweils mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* in den Vektor pSecDF kloniert.

Die neu konstruierten Plasmide wurden nach *C. glutamicum* elektroporiert und das Wachstum der daraus resultierenden Stämme im Minimalmedium CGXII überprüft. Als Kontrolle diente wiederum ein *C. glutamicum*-Stamm, der den Leervektor pEC-XK99 trug. Stämme, die Kombinationen von *sec*-Gene überexprimieren, unterscheiden sich in Bezug auf das Wachstum nicht signifikant vom Wildtyp. Die Generationszeit beträgt auch hier für alle Stämme ca. 135 (\pm 11) Minuten, die lag-Phase der Stämme *C. glutamicum* [pSecDF], [pSecEDF] und [pSecYDF] ist gegenüber dem Wildtyp um 4 h verlängert.

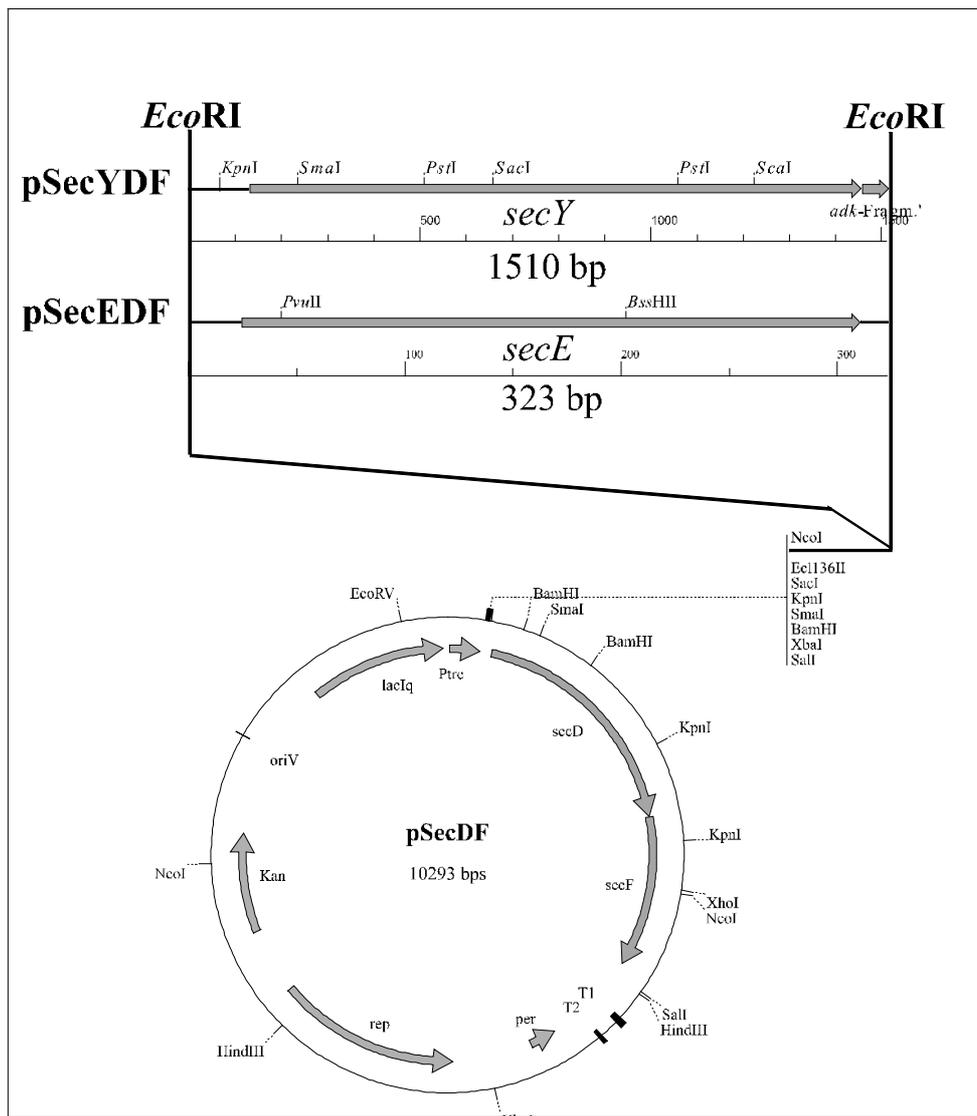


Abbildung D-11: Konstruktion von Plasmiden zur Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen. Die promotorlosen Gene wurden alle mittels *EcoRI* in den Vektor pSecDF kloniert. Abkürzungen: *kan*, Kanamycin-Resistenz; *lacIq*, Inhibitor des *trc*-Promotors; *per*, Kopienzahl-Kontrolle der Vektors; *P_{trc}*, *trc*-Promotor; *oriV*, vegetativer Replikationsursprung für *E. coli*; *rep*, Replikationsgen für *C. glutamicum*; T1, T2, *rrnB*-ribosomale Terminatoren.

2.2) Mutation von *sec*-Genen

Zur Erzeugung von *sec*-Mutationen in *C. glutamicum* wurde versucht, die jeweiligen Gene zu disruptieren. Dazu wurden zwei Methoden benutzt, die sich beide des Mechanismus der homologen Rekombination bedienen. Bei einer Integrationsmutagenese wird ein internes Fragment des entsprechenden Gens auf einen Vektor kloniert, der im Zielorganismus nicht

replizieren kann. Um auf antibiotikahaltigem Medium zu wachsen, muß die Zelle den Vektor durch ein „single crossover“ Ereignis in das Genom integrieren. Dies hat zur Folge, daß das Zielgen durch die Vektorsequenz unterbrochen und damit ausgeschaltet wird. Bei der „gene replacement“-Methode durch das *sacB*-System (Schäfer *et al.*, 1994b) wird zunächst das vollständige Gen kloniert, das durch eine Deletion oder eine Resistenzkassette unterbrochen wird. Nach Integration in das Genom liegen eine intakte und eine defekte Kopie des entsprechenden Gens vor. Bei Wachstum auf Saccharose wird der *sacB*-tragende Vektor unter Mitnahme einer Kopie des Zielgens wieder aus dem Chromosom entfernt. Durch Selektion auf die eingebrachte Resistenzkassette lassen sich die Stämme isolieren, die nur noch die defekte Kopie des Zielgens tragen.

2.2.1) Mutation von *secD* und *secF*

Die Gene *secD* und *secF* wurden durch eine Integrationsmutagenese ausgeschaltet. Dazu wurden jeweils interne Fragmente der Gene mittels PCR erzeugt und in den *E. coli*-Vektor pCR2.1 kloniert. Tabelle D-4 und Abbildung D-12 zeigt die verwendeten Primer, die Produktgröße und die Position im Gen an.

Gen (Gesamtlänge)	Primerpaar	Länge (bp)	Position
<i>secD</i> (1911nt)	sdf1/sdf2	609	nt 1200-1809
<i>secF</i> (1209nt)	sff1/sff2	603	nt 346-949

Tabelle D-4: Generierung interner Fragmente der Gene *secD* und *secF* mittels PCR. Abkürzungen: nt Nukleotid.

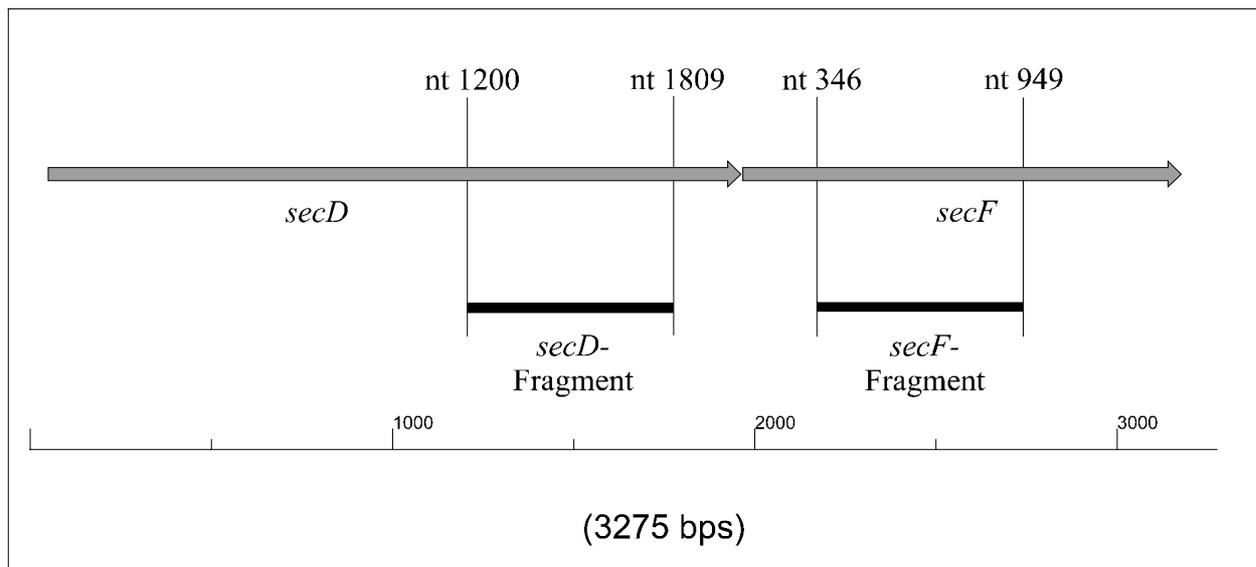


Abbildung D-12: Schematische Darstellung der Gene *secD* und *secF* sowie der Position und Länge der jeweiligen PCR-generierten, internen Fragmente

Wie in Abbildung D-13a schematisch dargestellt, wurden die resultierenden Plasmide pInsD und pInsF nach *C. glutamicum* elektroporiert, wo sie durch homologe Rekombination in das Genom integriert wurden. Die Unterbrechung der Gene *secD* beziehungsweise *secF* in den Stämmen *C. glutamicum* INTD und *C. glutamicum* INTF wurde durch Southern-Hybridisierung verifiziert (Abbildung D-13b). Sonden wurden durch DIG-PCR mit den in der Tabelle D-3 angegebenen Primern hergestellt. Bei Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* entstehen 2,0 kb und ein 4,6 kb großes Fragment für *C. glutamicum* INTD und ein 2,4 kb und ein 4,0 kb großes Fragment für *C. glutamicum* INTF. Der Vektoranteil wird in beiden Fällen komplett herausgespalten und ist in der Hybridisierung nicht sichtbar. Spaltet man die Gesamt-DNA von *C. glutamicum* INTD mit dem Enzym *SalI*, so entsteht ein Fragment, das die *secDF*-Region inklusive des Integrationsvektors enthält. Mit ca. 8,5 kb Größe ist es um 4,5 kb größer als das Wildtypfragment, was exakt der Größe des Integrationsvektors entspricht. Wird die Gesamt-DNA von *C. glutamicum* INTF mit *XbaI* verdaut, entstehen ein 7,3 kb großes Fragment, welches in etwa dem Wildtyp entspricht und ein 4,5 kb großes Fragment, das den Integrationsvektor darstellt.

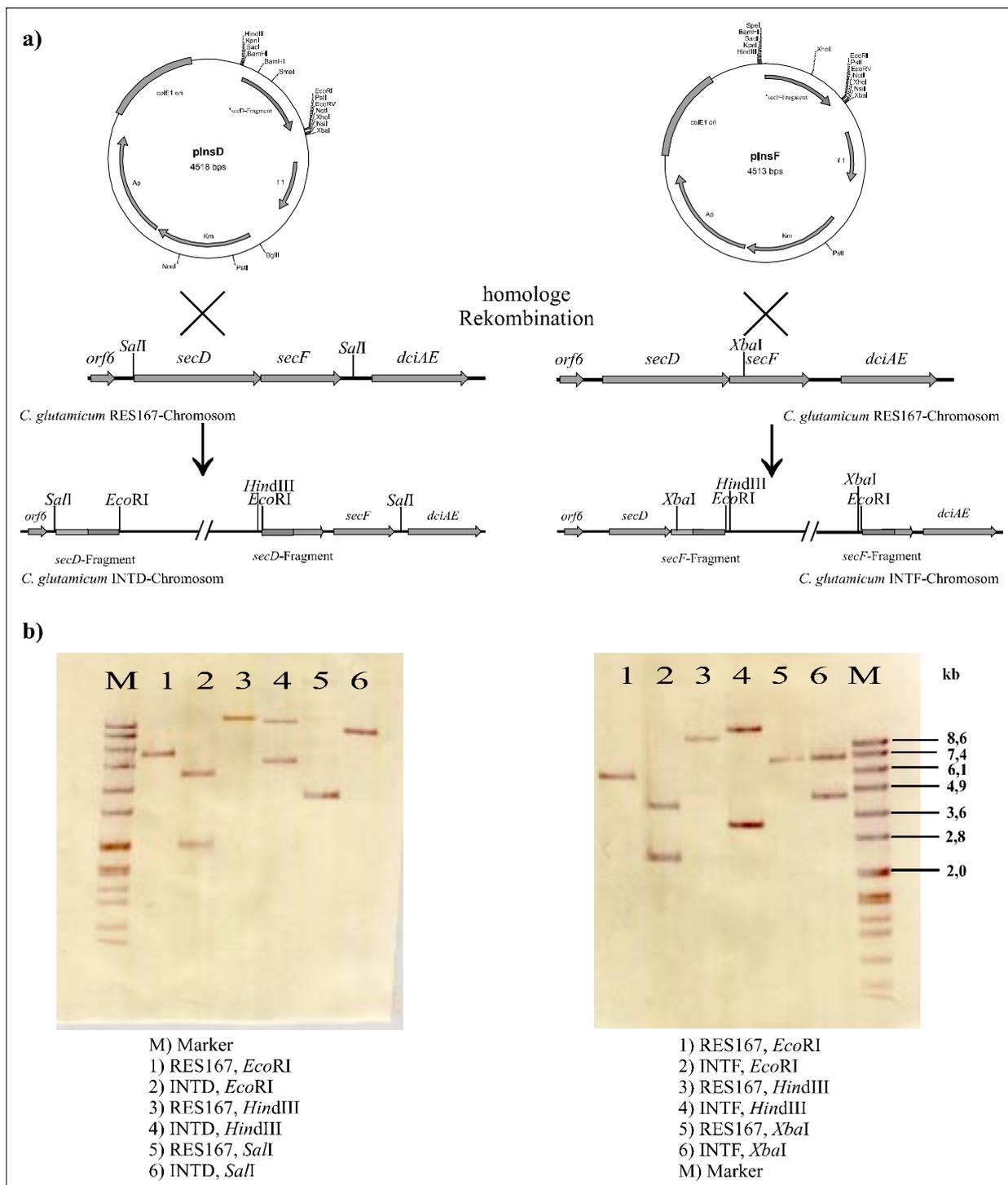


Abbildung D-13: Integrations-Mutagenese von *secD* und *secF*.

a) Schematische Darstellung der Integration der Vektoren pInsD und pInsF in das Chromosom von *C. glutamicum* durch homologe Rekombination.

b) Nachweis der Integration durch Southern-Hybridisierung mit Gesamt-DNA der Stämme *C. glutamicum* INTD, *C. glutamicum* INTF und *C. glutamicum* RES167 als Kontrolle.

Die Untersuchung des Wachstums in Flüssigkulturen des Minimalmedium CGXII zeigte für beide Mutanten eine um 6 h verlängerte lag-Phase gegenüber dem Wildtyp, die Generationszeit weicht mit $139 (\pm 8)$ Minuten aber nicht signifikant von *C. glutamicum* [pECXT99] ab. Lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die Zellen von *C. glutamicum* INTD und *C. glutamicum* INTF gegenüber den Zellen von *C. glutamicum* RES167 um das ca. Dreifache vergrößert sind, was etwa einer Verzehnfachung des Gesamtvolumens entspricht. Abbildung D-14 zeigt eine Mischkultur von *C. glutamicum* RES167 und *C. glutamicum* INTD, bei der der Größenunterschied deutlich sichtbar ist.

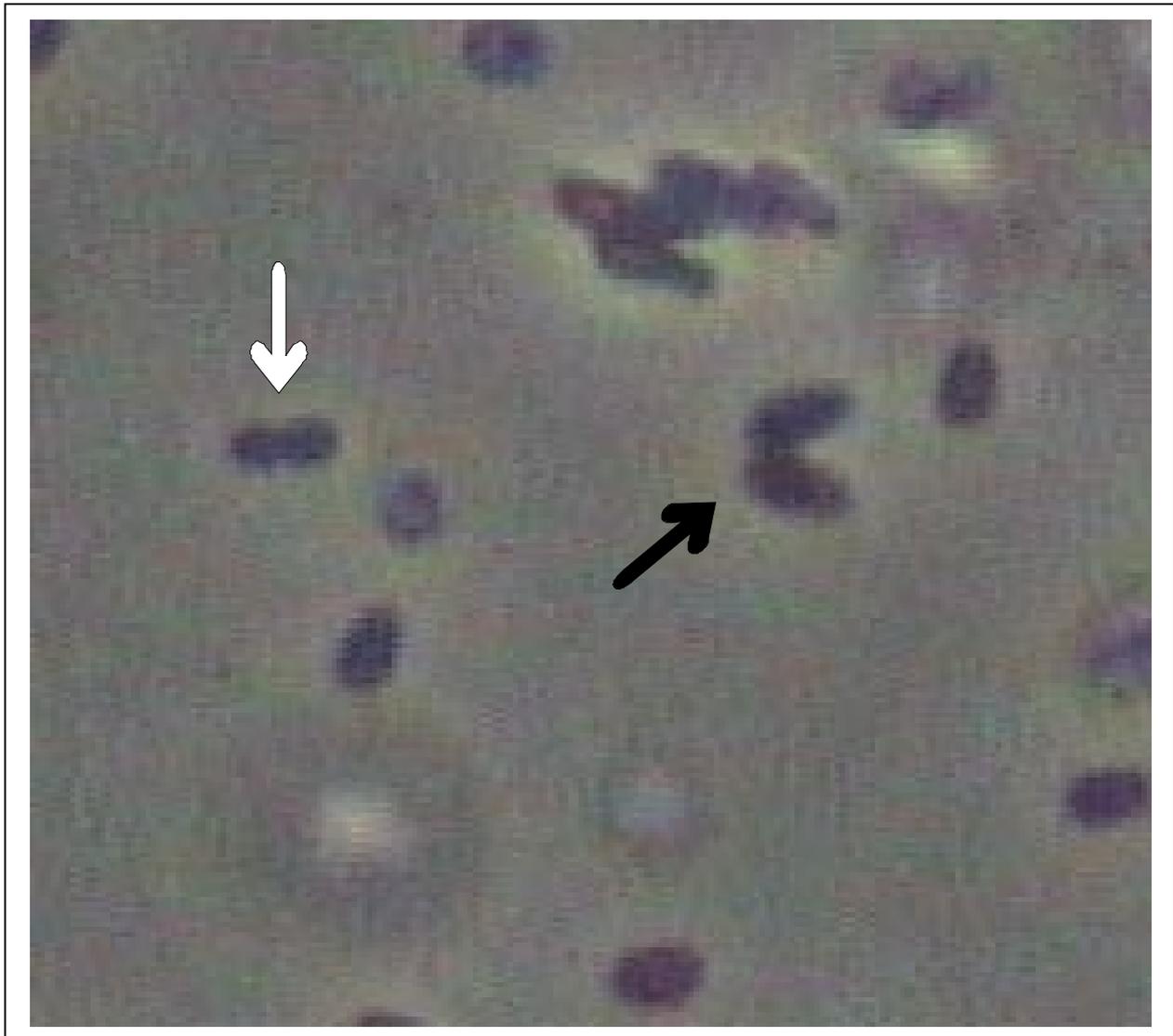


Abbildung D-14: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mischkultur der Stämme *C. glutamicum* RES167 und *C. glutamicum* INTD zur Verdeutlichung der Größenunterschiede. Die Vermischung erfolgte dabei auf dem Objektträger. Der schwarze Pfeil markiert dabei *C. glutamicum* INTD-Zellen, der weiße Pfeil *C. glutamicum* RES167-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß *secD* und *secF* zwar nicht essentiell sind, ihr Fehlen aber möglicherweise Störungen im Aufbau der Zellwand verursacht.

Komplementationexperimente durch Expression der Plasmide pSecD und pSecF in den *secD*- und *secF*-Mutanten *C. glutamicum* INTD und *C. glutamicum* INTF stellten den Phänotyp des Wildtypstamms wieder her. Da *C. glutamicum* INTD durch das plasmidkodierte *secD*-Gen vollständig komplementierbar ist, sind polare Effekte der *secD*-Mutation auf das *secF*-Gen ausgeschlossen. Daraus folgt, daß *secD* und *secF* vermutlich nicht in einem Operon organisiert sind.

2.2.2) Mutation von *secG*

Da *secG* zu klein ist, um an ihm eine Integrationsmutagenese durchzuführen, wurde es mittels „gene replacement“ durch eine Resistenzkassetten-tragende Kopie in Chromosom ersetzt. Dazu wurde mit den Primern sgr1 und sgr2, die aus dem GenBank-Eintrag (D14162) abgeleitet wurden, ein 1,3 kb großes chromosomales Fragment amplifiziert, bei dem *secG* genau zentral liegt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert, mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *XbaI* wieder reisoliert und erneut in den gleichermaßen gespaltenen Vektor pXK99A kloniert. Der resultierende Vektor wurde innerhalb von *secG* in der singulären *BspHI*-Schnittstelle gespalten und die überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Parallel dazu wurde das Plasmid pEC31 (Tauch, 1996) mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *HindIII* gespalten und ein 2,0 kb großes Fragment, welches die Chloramphenicol-Resistenzkassette *cmx* enthält, isoliert. Nachdem auch bei diesem Fragment eine Klenow-Behandlung durchgeführt wurde, konnte es mit dem linearisierten, *secG*-tragenden Vektor ligiert werden. Das resultierende Plasmid wurde aus *E. coli* reisoliert und ein 3,3 kb großes Fragment, das die Genanordnung *secG::cmx* enthielt, wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *HindIII* in den Vektor pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994b) kloniert. Dieses Plasmid, pInsG, wurde durch homologe Rekombination ins Chromosom von *C. glutamicum* integriert, so daß der resultierende Stamm die modifizierte und die Wildtyp-Genregion trägt (Abbildung D-15a). Beide Genregionen sind durch die Vektorsequenz getrennt. Dieser Stamm wurde in LB-Flüssigkultur unselektiv über Nacht inkubiert und auf LB-Agarplatten mit 10 % Saccharose ausplattiert. Bei Zellen, die auf diesem Medium wachsen können, hat ein zweites „crossover“ Ereignis stattgefunden, bei dem das Plasmid

wieder aus dem Chromosom entfernt wurde. Dabei wurde entweder die Wildtypsituation wieder hergestellt oder eine selektionierbare, Chloramphenicol-resistente *secG*-Mutante. Selektion auf Cm-haltigen Agarplatten ergab unter 500 getesteten Kolonien 499 mal den Wildtyp und 1 mal den *secG*-defekten Stamm *C. glutamicum* INTG. Zur Überprüfung des „gene replacements“ wurde die Gesamt-DNA des Stammes *C. glutamicum* INTG gegen eine *secG*-Sonde hybridisiert (Abbildung D-15b).

Bei der Kultivierung von *C. glutamicum* INTG in CGXII-Flüssigkulturen verhielt sich die *secG*-Mutante wie der Wildtyp *C. glutamicum* RES167. Auch eine Vergrößerung der Zellen wie bei den *secD*- und *secF*-Mutanten war nicht zu beobachten. Damit ist der Nachweis erbracht, dass *secG*, wie *secD* und *secF*, für das Überleben von *C. glutamicum* nicht essentiell ist.

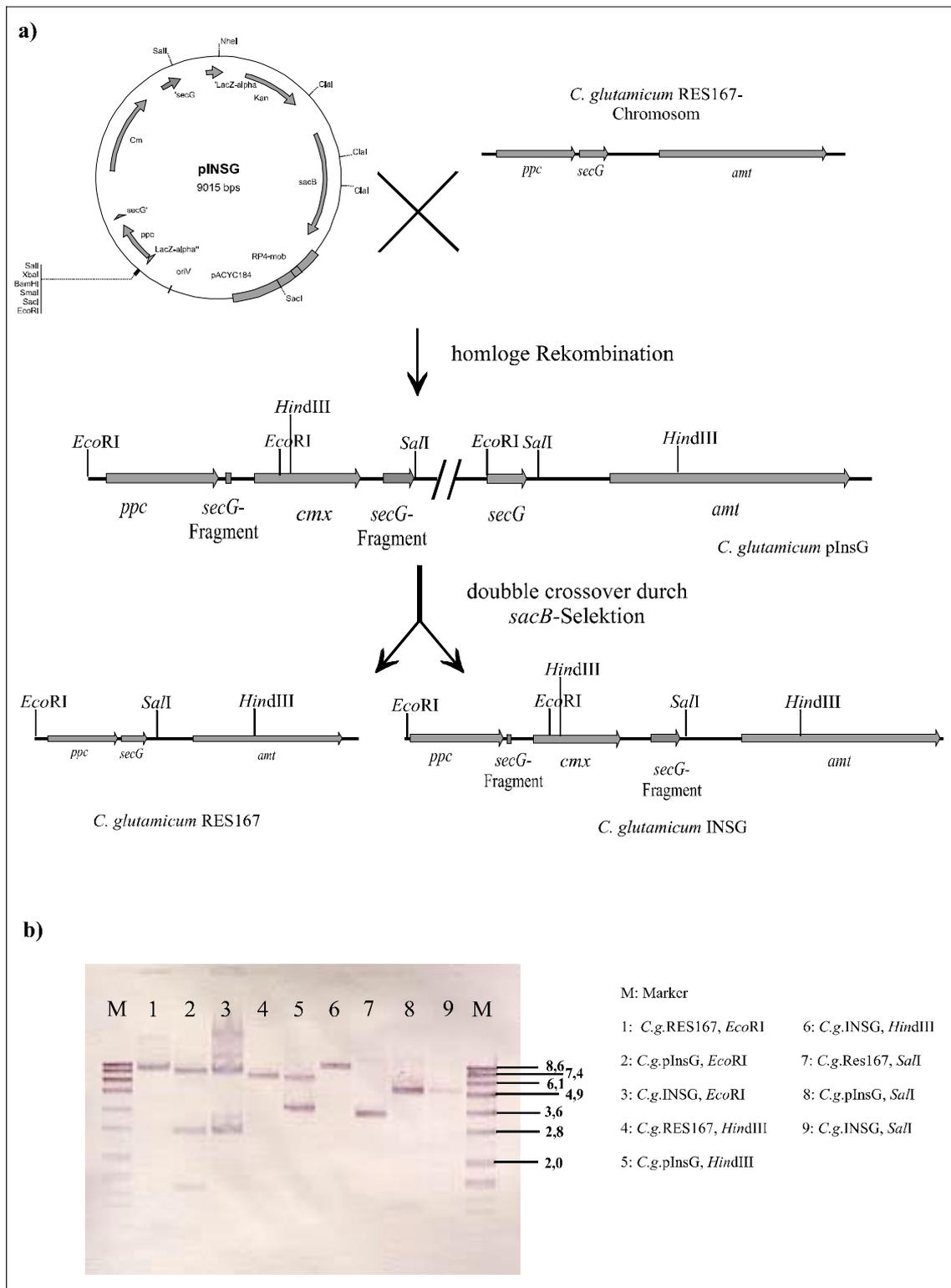


Abbildung D-15: Herstellung einer *C. glutamicum-secG*-Mutante. **a)** Schematische Darstellung des gene replacements von *secG* durch das pK18*mob**sacB*-System. **b)** Southern-Hybridisierung von Wildtyp und der *secG*-Mutante *C. glutamicum* INTG gegen eine *secG*-Sonde. Die Sonde wurde mittels DIG-PCR hergestellt, als Primer dienten sg1 und sg2.

2.2.3) Mutation von *secA*, *secY* und *secE*

Zur Erzeugung von Mutationen in *secA* und *secY* wurde versucht, die Gene zu disruptieren. Dazu wurden die in Abschnitt D 1.2.1 beschriebenen, internen PCR-Fragmente der Gene in den *E. coli*-Vektor pCR2.1 kloniert. Trotz mehrfacher Elektroporation der Plasmide nach *C. glutamicum* RES167 ließen sich keine rekombinanten Kolonien isolieren.

Da *secE* wie *secG* zu klein ist, um durch Integrationsmutagenese ausgeschaltet zu werden, wurde ein „gene replacement“ durchgeführt. Dazu wurde mit den Primern ser1 und ser2 ein 1,6 kb großes Fragment mit zentralem *secE* amplifiziert. Das Fragment wurde via pCR2.1 mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III in den Vektor pK18*mobsacB* kloniert. Der resultierende Vektor wurde an der singulären Schnittstelle für *Bss*HIII innerhalb von *secE* gespalten, mit Klenow-Polymerase behandelt und, wie in Abschnitt D 2.2.2 beschrieben, mit einer *cmx*-Genkassette ligiert. Der resultierende Vektor wurde in das *C. glutamicum*-Genom durch single crossover integriert, der sich durch Hybridisierung nachweisen ließ. Selektion auf ein zweites crossover-Ereignis durch Wachstum auf Saccharose ergab jedoch bei 1200 gestocherten Klonen, daß ausschließlich der Wildtyp wieder hergestellt wurde. Eine *secE*-Mutante konnte nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse weisen nach, daß *secA*, *secY* und *secE* in *C. glutamicum* essentiell sind, wie in allen anderen bisher untersuchten Organismen auch (Economou, 1999).

2.3) Effekt der Überexpression und Mutation von *sec*-Genen auf Zellwand-Proteine

Da die Stammkonstruktion zur Analyse des Effekts der *sec*-Mutation und Überexpression abgeschlossen war, wurden nun diese Effekte im näher untersucht. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sekretiert *C. glutamicum* zwar keine echten Exoproteine, aber dafür eine große Anzahl an Zellhüllproteinen (Joliff et al., 1992). Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, in wie weit sich die Überexpression oder Mutation von *sec*-Genen auf die Sekretion der corynebakteriellen Zellwandproteine auswirkt.

2.3.1) Analyse der Überexpression und Mutation von *sec*-Genen im SDS-PAGE

Zur Untersuchung des Effekts der Überexpression und Mutation von *sec*-Genen auf die Sekretion von Zellwandproteinen in *C. glutamicum* wurden alle Stämme, die einzelne oder Kombinationen von *sec*-Genen überexprimieren sowie die *sec*-mutierten Stämme *C. glutamicum* INTD, *C. glutamicum* INTF und *C. glutamicum* INTG in CGXII-Flüssigkultur angezogen. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet und die Zellwandproteine mit SDS extrahiert. Dazu wurden die Zellen jeweils in 1 ml Extraktionspuffer pro g Naßgewicht aufgenommen und gleiche Volumina der Extrakte auf ein 12 %iges SDS-PAGE aufgetragen. Wie Abbildung D-16a zeigt, unterscheiden sich die Stämme, die einzelne *sec*-Gene überexprimieren, nur geringfügig vom Wildtyp.

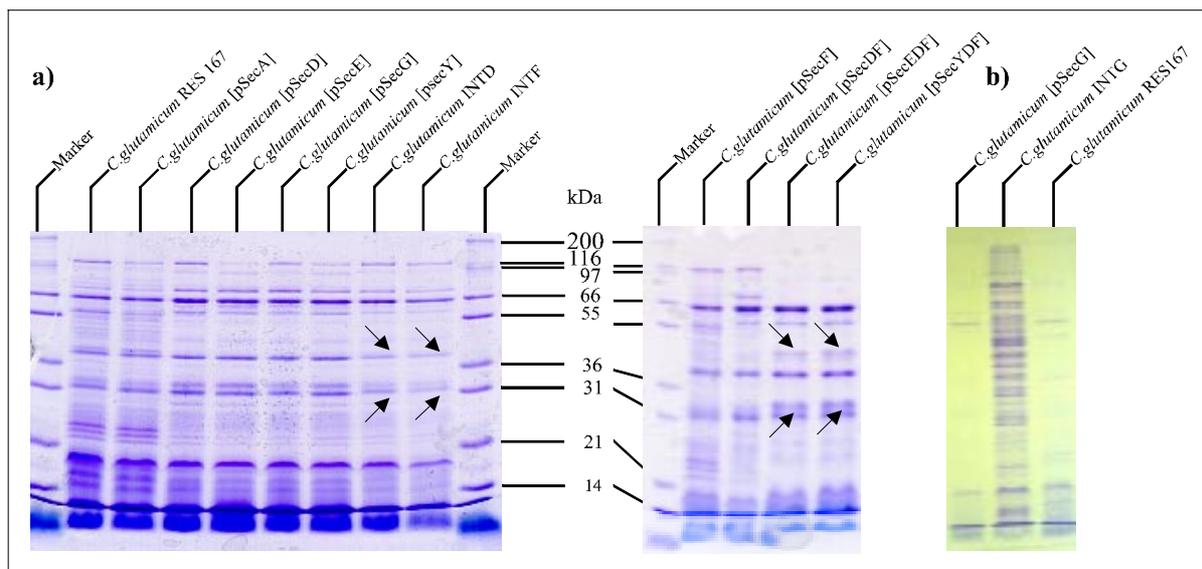


Abbildung D-16: a) SDS-PAGE der Zellwand-Proteine verschiedener Überexprimierer und –Mutanten von *sec*-Genen aus *C. glutamicum*. Aufgetragen wurden jeweils 12 µl Zellwand-Proteinextrakt, Unterschiede zwischen den Stämmen sind durch Pfeile markiert. Marker: Molekulargewichts-Marker XII.

b) SDS-PAGE der Zellwand-Proteine von Überexprimierern und Mutanten von *secG* aus *C. glutamicum* sowie des Kontrollstamms *C. glutamicum* RES167. Aufgetragen wurden jeweils 12 µl Zellwand-Proteinextrakt.

Während die Kontrolle und *C. glutamicum* [pSecA] in bezug auf die Zellwandproteine völlig identisch sind, zeigen die *secD*, *secE*, *secG* oder *secF* exprimierenden Stämme eine allenfalls

geringfügige Verstärkung einer Proteinbande bei 66 kDa. Durch MALDI-PSD-Analysen (K. Niehaus, pers. Mitteilung) konnte das Protein als PS1, eine der Hauptkomponenten der Zellwand-Proteine (Joliff *et al.*, 1992) identifiziert werden. Die Überexpression einzelner *sec*-Gene scheint also keinen oder lediglich einen marginalen Effekt auf die Proteinsekretion auszuüben.

Während sich die Integrationsmutanten *C. glutamicum* INTD und *C. glutamicum* INTF in bezug auf PS1 nicht vom Wildtyp unterscheiden, sind eine 39 kDa und eine 31 kDa-Bande deutlich unterrepräsentiert. Wie PS1 ist das 39 kDa-Protein homolog zum Antigen 85 Komplex aus *Mycobacterium* (Belisle *et al.*, 1997; Salim *et al.*, 1997; S. Brand, pers. Mitteilung). Die Verschiebung des Zellwand-Proteinmusters in den *secD*- und *secF*-Mutanten zeigt, dass Mutationen in den nicht essentiellen *sec*-Genen zu Störungen im Aufbau der Zellwand führen. Ein weiterer Hinweis darauf ist die hohe Empfindlichkeit der *secG*-Mutante gegenüber Detergenzien. Behandelt man den Stamm *C. glutamicum* INTG bei der Extraktion der Zellwand-Proteine wie alle anderen Stämme, so lysieren die Mutanten vollständig (Abbildung D16-b). Die Stabilität der Zellwand dieser Mutanten ist also gegenüber dem Wildtyp verringert.

Abbildung D-16a zeigt ebenfalls die Zellwandproteine von Stämmen, die Kombinationen von *sec*-Genen überexprimieren. Das Proteinmuster des Stamms *C. glutamicum* [pSecDF] unterscheidet sich im SDS-PAGE kaum von dem des Wildtyps. Während die PS1 repräsentierende Bande auch hier in allen Stämmen mehr oder weniger unbeeinflusst bleibt, treten bei *C. glutamicum* [pSecEDF] und *C. glutamicum* [pSecYDF] eine zusätzliche Bande bei 49 kDa, und weitere zwischen 38 und 32 kDa auf. Die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen scheint die Sekretion endogener Proteine in *C. glutamicum* also zu steigern.

3) Konstruktion eines Reportersystems zur Untersuchung der Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum*

Im vorigen Abschnitts wurde der Effekt der Überexpression und Mutation von Komponenten des „General Secretory Pathways“ in *C. glutamicum* auf die Sekretion homologer Proteine untersucht. Obwohl sich mehrere Effekte beobachten ließen, waren sie mangels enzymatischer Aktivität der sekretierten Proteine nicht exakt zu quantifizieren. Aus diesem Grund mußte ein Reportersystem der Proteinsekretion in *C. glutamicum* auf der Grundlage der Sekretion eines heterologen Exoenzyms konstruiert werden. Anforderungen an dieses System waren eine stabile und vollständige Sekretion des heterologen Enzyms in das Kulturmedium, die korrekte Prozessierung des Exoproteins durch *C. glutamicum* und eine zuverlässige und schnelle Nachweismethode der enzymatischen Aktivität außerhalb der Zelle, sowohl auf Festmedium wie auch in Flüssigmedium.

3.1) Verschiedene heterologe Exoenzyme als Reportersysteme

Das erste Reportersystem der Proteinsekretion in *C. glutamicum* wurde auf der Basis einer Endo-Cellulase aus *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Meletzus *et al.*, 1993) konstruiert. Cellulasen (1,4- β -Glucan-Glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.4) hydrolysieren β -1,4-glycosidische Bindungen mehrfach an zufälligen Stellen innerhalb des linearen Cellulose-Moleküls (Béguin & Aubert, 1992). Die dadurch verursachte Kettenverkürzung und die Zunahme reduzierender Enden lassen sich durch Kongo-Rot-Färbung und Dinitrosalicylsäure-Reaktion nachweisen. Da native, kristalline Cellulase unlöslich ist, wurde nur Carboxymethyl-Cellulase als Substrat verwendet.

Weiterhin auf ihre Tauglichkeit als Reportersysteme untersucht wurden:

- Metalloprotease A (E.C. 3.4.24.31) aus *Streptomyces coelicolor* „Müller“ (Damann & Wohleben, 1992); zerlegt Peptide unter Einbeziehung eines metallischen Kofaktors.
- Lysozym (E.C. 3.2.17) aus *S. coelicolor* (Damann, 1992); Hydrolysiert die β 1-4-Vebindungen zwischen N-Acetyl-D-Glukosaminen und N-Acetyl-Muraminsäure im Peptidoglykan von Bakterienzellen.
- Chitinase C (E.C. 3.2.1.14) aus *S. coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996); Hydrolysiert die β 1-4-Vebindungen zwischen N-Acetyl-D-Glukosaminen des Chitins.

- Citinase A (E.C. 3.2.1.14) aus *Serratia marcescens* (Jones *et al.*, 1986); Hydrolysiert die β 1-4-Verbindungen zwischen N-Acetyl-D-Glukosaminen des Chitins.

3.1.1) Konstruktion von, auf heterologen Exoproteinen basierenden Reportersystemen

Zur Expression der heterologen Exoenzyme mußten *E. coli*-*C. glutamicum* Shuttle-Vektoren konstruiert werden. Das PCR-Produkt des CellulaseA-Gens *celA* aus dem Plasmid pDM201-*celA* (Meletzus *et al.*, 1992) wurde dazu mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* isoliert und in das gleichermaßen gespaltene *E. coli*-Plasmid pEC31 kloniert. In dem daraus resultierenden Plasmid pCel10 (4,5 kb) steht *celA* unter der Kontrolle des *cmx*-Promotors aus *Corynebacterium striatum* (Tauch *et al.*, 1998). Auch die Ribosomen-Bindungsstelle des Cm-Resistenzgens wird genutzt. Um einen Vektor zu erzeugen, der sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* repliziert, wurde pCel10 durch das Restriktionsenzym *SalI* gespalten und mit dem ebenfalls *SalI*-linearisierten *C. glutamicum*-Vektor pCV22 fusioniert. Das Resultat war ein 9,1 kb großer Vektor mit einer Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz und Cellulase-Aktivität sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli*. Die resultierenden Plasmide sind im Anhang abgebildet.

In gleicher Weise wurden die Gene *mprA* (Metalloprotease; Damann & Wohleben, 1992), *cel* (Lysozym; Redenbach *et al.*, 1996), *chiC* (ChitinaseC; Redenbach *et al.*, 1996) und *chiA* (ChitinaseA; Jones *et al.*, 1986) kloniert.

3.1.2) Auswertung der Enzymaktivität in *E. coli* und *C. glutamicum*

Die Cellulase-Aktivität des Stamms *C. glutamicum* [pCel20] wurde sowohl in Fest- als auch in Flüssigkultur bestimmt. Zur Analyse der Cellulase-Aktivität auf Festmedien wurde *C. glutamicum* [pCel20] auf Minimalmedium mit 1% Carboxymethyl-Cellulose als Enzymsubstrat angeimpft und drei Tage inkubiert. Die Aktivität der anderen Enzyme wurde lediglich auf Festmedien bestimmt. Als Substrate dienten dabei jeweils 1% Milchpulver für die Metalloprotease, abgetötete Zellen von *Micrococcus lysodeicticus* für Lysozym und kolloidales Chitin für beide Chitinasen. Die Überprüfung der Aktivitäten erfolgte durch Auswertung der Lysehöfe um die Kolonien herum. Nach Elektroporation des *mprA* tragenden

Plasmids nach *C. glutamicum* ließen sich nie transformierte Kolonien beobachten. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung sind in Tabelle D-5 zusammengefaßt.

Protein	Ursprungs-Organismus	aktiv in <i>E. coli</i>	aktiv in <i>C. glutamicum</i>
Cellulase A	<i>Clavibacter michiganensis</i>	±	± (3,8 mU*)
Metallo-Protease A	<i>Streptomyces coelicolor</i>	++	keine Transformanten
Lysozym	<i>Streptomyces coelicolor</i>	+	-
Chitinase A	<i>Serratia marcescenz</i>	+	-
Chitinase C	<i>Streptomyces coelicolor</i>	+	-

Tabelle D-5: Aktivität verschiedener heterologer Exoenzyme in *E. coli* und *C. glutamicum*.

- = keine Aktivität

+ = erkennbare Lysehöfe

++ = große Lysehöfe

* = Volumenaktivität: U = µmol reduzierende Zucker pro ml Kulturüberstand und min.

Obwohl alle heterologen Exoenzyme in *E. coli* aktiv sind, zeigt nur die Cellulase eine Aktivität in *C. glutamicum*. Zwar läßt sich die Cellulase-Produktion durch Zugabe geringer Mengen Chloramphenicol steigern, vermutlich durch eine Aktivierung des *cmx*-Promotors, aber selbst mit der maximalen Volumenaktivität von 3,8 mU ist sie noch zu gering, um ein geeignetes Reportersystem der Proteinsekretion zu sein.

3.2) α -Amylase als Reportersystem

Da die Sekretion von Cellulase A sich nicht als geeignetes Reportersystem der Proteinsekretion in *C. glutamicum* erwiesen hatte, wurde ein weiteres System auf der Basis einer α -Amylase aus *Streptomyces griseus* IMRU 3570 (Vigal *et al.*, 1991) konstruiert. Von dieser α -Amylase war bekannt, daß sie in *C. glutamicum* zu exprimieren ist und richtig prozessiert wird (Cadenas *et al.*, 1992).

Das durch das *amy*-Gen kodierte Enzym α -Amylase (E.C.3.2.1.1, α -(1-4)-Glucan-4-Glucano-Hydrolase) spaltet den spiraligen, unverzweigten Amylose-Anteil der Stärke durch Hydrolyse

der α -(1-4)-Bindungen und produziert so ein Gemisch aus Glucose und freier Maltose (Lehninger, 1987). Der verzweigt-kettige Amylopektin-Anteil der Stärke wird nicht angegriffen. Stärkeabbau läßt sich durch Lugolsche Lösung und durch Dinitrosalicylsäure-Reaktion nachweisen.

3.2.1) Konstruktion von, auf α -Amylase basierenden Reportersystemen

Zur Expression der heterologen Amylase in *C. glutamicum* wurden verschiedene Systeme konstruiert, um Aussagen über das Sekretionsverhalten der unterschiedlichen *sec*-Mutanten und –Überexprimierer treffen zu können. Zur Untersuchung der *sec*-Mutanten wurde ein replikatives, plasmidkodierte System benötigt. Die Analyse des Effekts der Überexpression von *sec*-Genen auf die Sekretion erforderte zwei verschiedene integrative Systeme, um jeweils gegen verschiedene Resistenzen selektionieren zu können.

Zur Konstruktion eines replikativen Expressionssystems wurde der Vektor pULMJ95 (Cadenas *et al.* 1996) mit dem Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung eines DNA-Fragments von 2100 bp Länge, das ein promotorloses *amy*-Gen enthält. Gleichzeitig wurde der Expressionsvektor pEC-XT99A mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten. Nach Ligation des *amy*-Gen-tragenden DNA-Fragments mit dem Vektor pEC-XT99A wurde der resultierende Vektor pAmy, in dem das *amy*-Gen unter der Kontrolle des *trc*-Promotors steht, in verschiedene *C. glutamicum*-Stämme elektrotransferiert. Das Plasmid pAmy diente zur Untersuchung der Proteinsekretion im Wildtyp und den *sec*-Gen-defekten Stämmen.

Zur Untersuchung der *C. glutamicum*-Stämme, die einzelne *sec*-Gene überexprimieren, wurde ein Testsystem entwickelt, bei dem das *amy*-Gen in das Chromosom vom *C. glutamicum* integriert ist. Dieses System basiert auf dem *E. coli*-Expressionsvektor pXK99A. Dazu wurde das *amy*-Gen wie oben beschrieben aus dem Vektor pULMJ95 (Cadenas *et al.* 1996) isoliert. Der Vektor pXK99A (Kirchner, 1999) wurde ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *XbaI* und *EcoRI* gespalten. Nach Ligation des *amy*-Gen-tragenden DNA-Fragments in den Vektor wurde das resultierende Plasmide nach *E. coli* elektroporiert. Das Plasmid pXK99A-*amy* trägt das *amy*-Gen unter Kontrolle des *trc*-Promotors. Der Vektor wurde reisoliert und mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *HindIII* gespalten. Das Plasmid

pLW60 (Wehmeier *et al.*, 1998) wurde ebenfalls mit durch *Xba*I und *Hind*III enzymatisch gespalten und ein resultierendes, ca. 800 Basenpaare großes Fragment des *dciAE*-Gens aus *C. glutamicum* RES167 (Wehmeier *et al.*, 1998) isoliert. Das *dciAE*-Fragment wurde in das gespaltene Plasmid pXK99A-*amy* kloniert. Der resultierende Vektor wurde als pIAmy1 bezeichnet und mittels Elektroporation nach *C. glutamicum* transferiert. Da das Plasmid in *C. glutamicum* nicht zur Replikation im Stande ist, können die Zellen nur wachsen, wenn der Vektor durch homologe Rekombination in das Chromosom von *C. glutamicum* integriert wird. Der so erzeugte *C. glutamicum*-Stamm wurden als *C. glutamicum* IAmy1 bezeichnet.

Zur Untersuchung der *C. glutamicum*-Stämme, die Kombinationen von *sec*-Genen überexprimieren, wurde ein weiteres Testsystem konstruiert, bei dem das *amy*-Gen ebenfalls in das Chromosom vom *C. glutamicum* integriert ist, das allerdings auf dem *E. coli*-Expressionsvektor pXT99A basiert. Dazu wurde das *amy*-Gen wie oben beschrieben aus dem Vektor pULMJ95 (Cadenas *et al.* 1996) isoliert. Der Vektor pXT99A wurde mit dem Restriktionsenzym *Xba*I vollständig und mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI partiell gespalten. Nach Ligation mit dem *amy*-Gen-tragenden DNA-Fragment wurde das resultierende Plasmid nach *E. coli* elektroporiert. Der Vektor pXT99A-*amy* trägt das *amy*-Gen unter Kontrolle des *trc*-Promotors. Das Plasmid wurde reisoliert und wie oben beschrieben gespalten und mit dem ca. 800 Basenpaar großes Fragment des *dciAE*-Gens aus *C. glutamicum* RES167 (Wehmeier *et al.*, 1998) ligiert. Der resultierende Vektor wurde als pIAmy2 bezeichnet und mittels Elektroporation nach *C. glutamicum* transferiert. Da er in *C. glutamicum* nicht replizieren kann, können die Zellen nur wachsen, wenn der Vektor durch homologe Rekombination in das Chromosom von *C. glutamicum* integriert wird. Der konstruierte *C. glutamicum*-Stamm wurde als *C. glutamicum* IAmy2 bezeichnet.

Die Integrationsereignisse wurde durch Southern-Hybridisierung überprüft. Als Sonde diente das 0,8 kb große *dciAE*-Fragment aus dem Vektor pLW60. Die Auswertung des Restriktionsverdaus der Gesamt-DNA der Stämme *C. glutamicum* IAmy1 und *C. glutamicum* IAmy2 mit *Eco*RI ergab die erwarteten Banden bei 3,3 kb und 8,2 kb für *C. glutamicum* IAmy1 und 3,5kb und 2,8 kb für *C. glutamicum* IAmy2. Da gleich behandelte Gesamt-DNA des Wildtyps nur eine Bande bei 2,8 kb zeigt, ist damit die Integration der Vektoren in das Zielgen *dciAE* nachgewiesen.

Die Stämme *C. glutamicum* IAmy1 und IAmy2 unterscheiden sich lediglich durch die Antibiotika-Resistenz, die durch das integrierte Plasmid vermittelt wird, von einander. Damit

standen Reportersysteme zur Verfügung, die daß gesamte Spektrum der *sec*-Mutation und Überexpression abdecken.

3.2.2) Untersuchung der α -Amylase-Aktivität in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen

Nachdem die verschiedenen, auf Amylase-Sekretion basierenden Reportersysteme konstruiert waren, wurden sie auf ihre Eignung in Bezug auf die Untersuchung des „General Secretary Pathway“ getestet. Dazu wurden die Stämme *C. glutamicum* RES167[pAmy], *C. glutamicum* IAmy1 und *C. glutamicum* IAmy2 sowohl auf Fest- als auch auf Flüssigmedium inkubiert, welches 1 % lösliche Stärke als Enzymsubstrat enthielt. Abbildung D-17 zeigt die Amylase-Aktivität beider Reportersysteme. Der Aktivitätsnachweis mit Lugolscher Lösung auf Festmedien zeigt, daß Amylase in allen Reportersystemen sekretiert wird. Die Kontrolle *C. glutamicum* RES167 weist dagegen keinerlei Aktivität auf. Zudem ist der Lysehof um *C. glutamicum* [pAmy]-Kolonien größer als der um *C. glutamicum* IAmy2-Kolonien (Abbildung D-17). Durch das replikative System, bei dem viele Kopien des *amy*-Gens innerhalb der Zelle vorliegen, wird also mehr Amylase produziert und sekretiert als durch das integrative System, das nur eine einzige, chromosomale Kopie vorliegt.

Um die beobachteten Effekte genau zu quantifizieren, wurde die Volumenaktivität im Kulturüberstand von Flüssigkulturen der verschiedenen Stämme bestimmt. Dabei wurden die Beobachtungen des Plattentests bestätigt (Abbildung D-17b). Während für den Wildtyp *C. glutamicum* RES167 keine Amylase-Aktivität zu beobachten ist, zeigt der plasmidtragende Stamm *C. glutamicum* [pAmy] mit 372 mU eine fast 8-fach höhere Aktivität als die Stämme, die eine chromosomale Kopie des *amy*-Gens tragen. Die Aktivität der Stämme *C. glutamicum* IAmy1 und IAmy2 ist mit 45 mU gleich. In keinem der konstruierten Stämme lies sich eine intrazelluläre Amylase-Aktivität nachweisen.

Amylase stellt also ein geeignetes Reportersystem der Proteinsekretion in *C. glutamicum* dar, da sie einfach und quantitativ nachzuweisen ist und in hinreichend großen Mengen produziert und sekretiert wird.

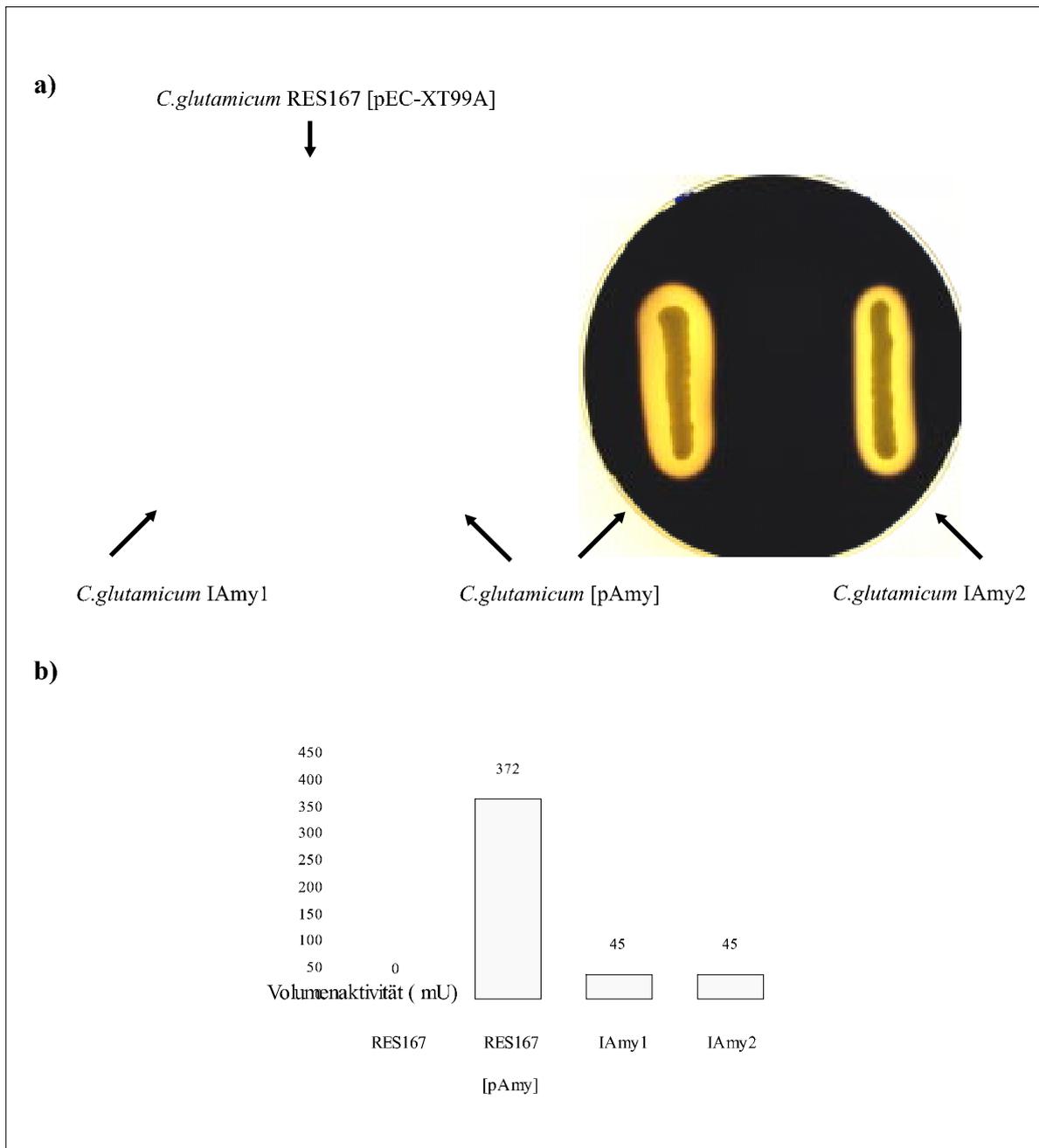


Abbildung D-17: Amylase-Aktivität in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen.

a) Verschiedene *C. glutamicum*-Stämme auf TYPS-Agarplatten nach 24h Inkubation und Anfärbung mit Lugolscher Lösung.

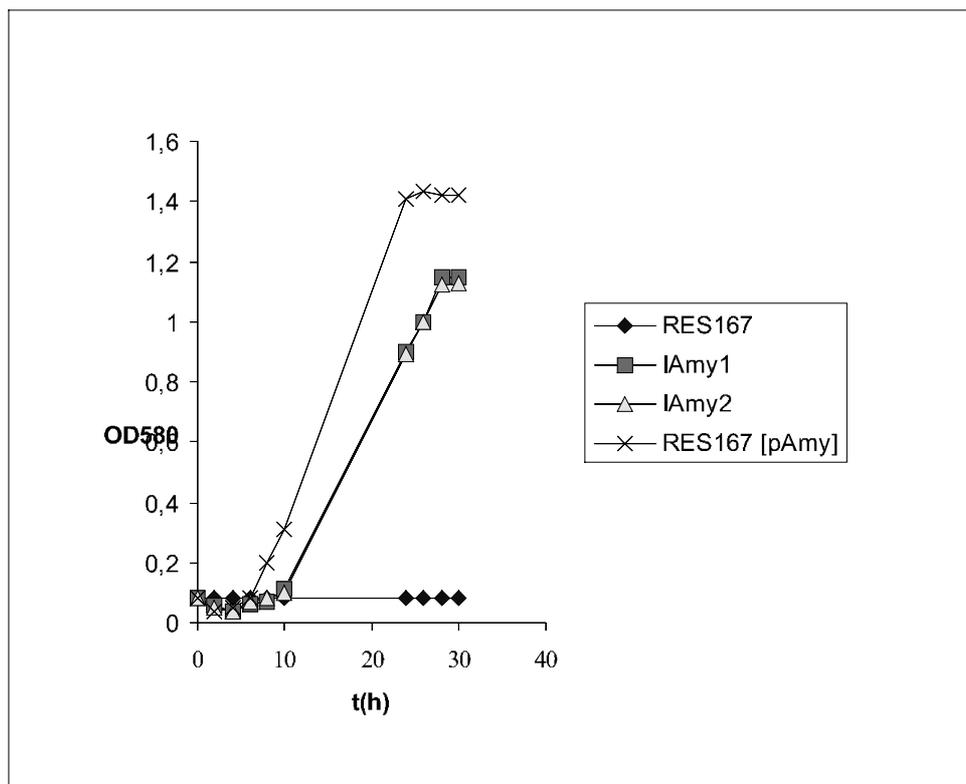
b) Quantitative Bestimmung der Amylase-Aktivität in den Kulturüberständen von TYPS-Flüssigkulturen verschiedener *C. glutamicum*-Stämme bei einer optischen Dichte von 4,5. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Dinitrosalicylsäure-Methode (Miller, 1956).

mU = μmol reduzierender Zucker/(ml x min).

3.2.3) Wachstum von *C. glutamicum* auf Stärke

Das Enzym α -Amylase zerlegt den Amylose-Anteil des komplexen, polymeren Kohlehydrats in kürzere Bruchstücke, hauptsächlich Maltose und Glucose (Lehninger, 1987). Während Stärke durch *C. glutamicum* nicht metabolisiert werden kann, sind sowohl Maltose als auch Glucose geeignete Kohlenstoffquellen für das Bakterium (Vahjen *et al.*, 1995). Aus diesem Grund sollten Amylase-produzierende *C. glutamicum*-Stämme in der Lage sein, mit Stärke als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dazu wurden *C. glutamicum* [pAmy], *C. glutamicum* IAmy1, *C. glutamicum* IAmy2 sowie *C. glutamicum* RES167 als Kontrolle in Flüssig-Minimalmedium (Katsumata *et al.*, 1984) angeimpft, das als einzige Kohlenstoffquelle 1 % lösliche Stärke enthielt. Abbildung D-18 zeigt, daß der Wildtyp *C. glutamicum* RES167 nicht in der Lage ist, allein mit Stärke zu wachsen. Die Amylase-sekretierenden Stämme sind dagegen befähigt, das komplexe Polymer abzubauen und zum Wachstum zu nutzen.

Abbildung D-18: Wachstum von verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen in Flüssig-



Minimalmedium (Katsumata *et al.*, 1984) mit Stärke als einziger Kohlenstoffquelle.

Der Stamm *C. glutamicum* [pAmy], der eine deutlich höhere Amylase-Produktion aufweist als die Stämme *C. glutamicum* IAmy1 und IAmy2, bei denen jeweils nur eine chromosomale

Kopie des *amy*-Gens vorliegt, zeigt bei Anzucht mit Stärke als einziger C-Quelle das schnellste Wachstum. Daraus folgt, daß das Wachstum mit Stärke proportional zur Sekretion der heterologen Amylase ist, da die Menge metabolisierbarer Zucker durch die Amylase erhöht wird.

4) Analyse von *Corynebacterium glutamicum* *sec*-Mutanten und Überexprimierern im heterologen Reportersystem

Mit der Expression des heterologen Exoenzyms α -Amylase aus *Streptomyces griseus* IMRU 3570 war ein geeignetes Reportersystem der Proteinsekretion von *C. glutamicum* konstruiert worden. Mit diesem System sollte nun untersucht werden, in wie weit Manipulationen an Komponenten des „General Secretary Pathways“ die Sekretion des heterologen Enzyms beeinflussen. Dabei wurde der Effekt der Überexpression von *sec*-Genen auf die Amylase-Sekretion in Stämmen untersucht, bei denen das *amy*-Gen in das Chromosom integriert wurde. Die Auswirkungen der *sec*-Mutationen wurde in Stämmen analysiert, in denen die Amylase durch ein Plasmid kodiert wird.

4.1) Amylase-Sekretion der *sec*-Mutanten

Zur Analyse des Effekts der Mutation von *sec*-Genen auf die Proteinsekretion wurde der Export der heterologen Amylase in diesen Stämmen untersucht. Dazu wurde das Plasmid pAmy in die Stämme *C. glutamicum* INTD, *C. glutamicum* INTF und *C. glutamicum* INTG elektroporiert und die Amylase-Aktivität der resultierenden Stämme bestimmt.

4.1.1) Amylase-Sekretion der *secG*-, *secD*- und *secF*-Mutanten

Impft man die definierte Menge von jeweils $1,7 \times 10^6$ Zellen der verschiedenen Stämme auf einer stärkehaltigen Agarplatte an und inkubiert sie für 48 h, so zeigt die Anfärbung mit Lugolscher Lösung einen deutlichen Unterschied in der Amylase-Sekretion. Abbildung D-19a zeigt, daß der als Negativkontrolle aufgetragene Wildtyp erwartungsgemäß keine Amylase-Aktivität aufweist. Die Aktivität der beiden, als Positivkontrolle aufgetragenen Stämme *C. glutamicum* [pAmy] und *C. glutamicum* IAmy2 ist gut sichtbar und scheint gleich groß. Der Lysehof um die *secG*-Mutante *C. glutamicum* INTG [pAmy] ist jedoch erheblich kleiner als der der Positivkontrollen. Den deutlichsten Effekt zeigen jedoch die Kolonien der *secD*- und *secF*-Mutanten *C. glutamicum* INTD [pAmy] und *C. glutamicum* INTF [pAmy]. Wie beim Wildtyp ist bei ihnen keinerlei Amylase-Sekretion zu detektieren.

Zur quantitativen Analyse dieser Phänomene wurde die Amylase-Aktivität aller Stämme im Kulturüberstand von TYPS-Flüssigkulturen bei einer optischen Dichte von 4,5 nach ca. 56 h Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung D-19b dargestellt und entsprechen den Beobachtungen des Plattentests. Auch mit der Dinitrosalicylsäure-Methode läßt sich für den Wildtyp keine Aktivität nachweisen. Der Stamm *C. glutamicum* [pAmy] zeigt mit 372 mU eine fast 8-fach höhere Aktivität als der Stamm *C. glutamicum* IAmy2 mit 45 mU. Das die Kolonien beider Stämme beim Plattentest nahezu gleich aussehen, beruht wahrscheinlich auf Diffusionseffekten des sekretierten Proteins in der Agar-Matrix. Der Stamm *C. glutamicum* INTG [pAmy] weist mit 80 mU Amylase-Aktivität in Kulturüberstand nur noch 21,5 % der Aktivität des Stamms *C. glutamicum* [pAmy] auf. Wie bei dem Aktivitätsnachweis auf Agarplatte ist auch im Kulturüberstand oder in Zellaufschlüssen der Stämme *C. glutamicum* INTD [pAmy] und *C. glutamicum* INTF [pAmy] keine Aktivität zu detektieren.

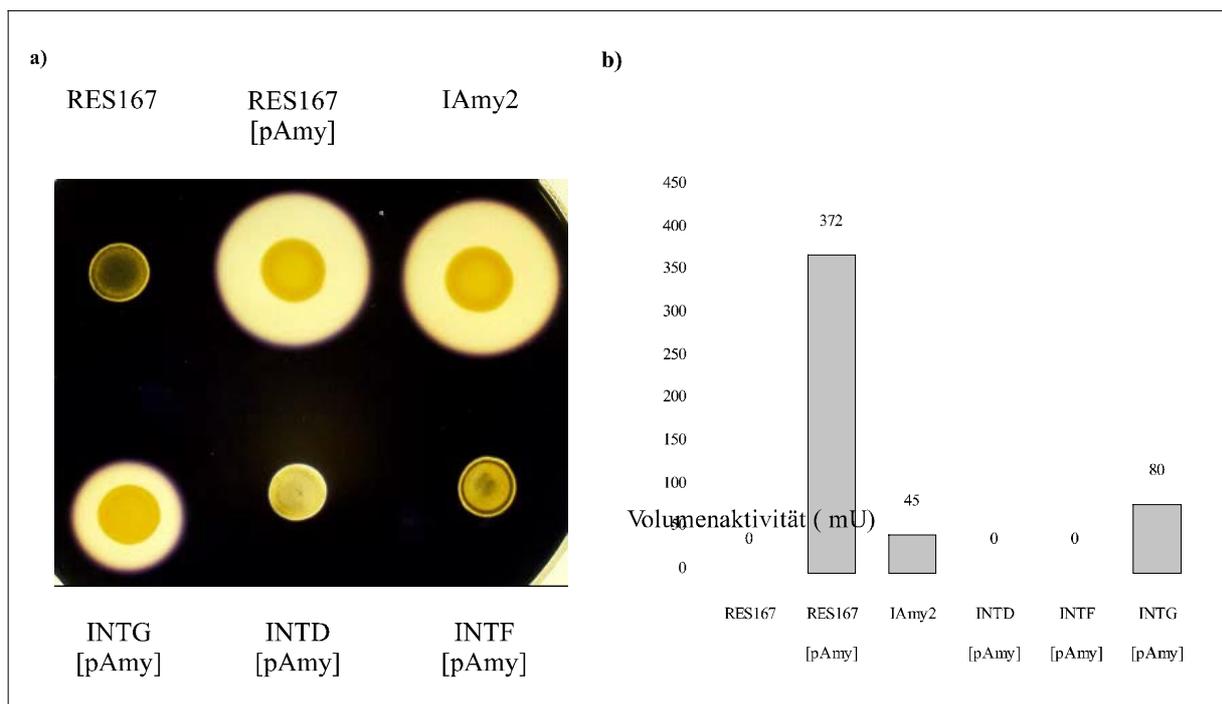


Abbildung D-19: Amylase-Aktivität in verschiedenen *sec*-Mutanten von *C. glutamicum*.

a) Verschiedene *C. glutamicum*-Stämme auf TYPS-Agarplatten nach 48 h Inkubation und Anfärbung mit Lugolscher Lösung.

b) Quantitative Bestimmung der Amylase-Aktivität in den Kulturüberständen von TYPS-Flüssigkulturen verschiedener *C. glutamicum*-Stämme bei einer optischen Dichte von 4,5. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Dinitrosalicylsäure-Methode (Miller, 1956).

mU = μmol reduzierender Zucker/(ml x min).

Zur Klärung der Frage, ob die beobachteten Effekte die Sekretion von Proteinen im Allgemeinen oder nur die der heterologen Amylase betreffen, wurde der Proteingehalt der Kulturüberstände bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle D-6 dargestellt.

Stamm	µg Protein/ml Kulturüberstand
<i>C. glutamicum</i> RES167	6,2 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> [pAmy]	9,3 (± 0,8)
<i>C. glutamicum</i> IAmy2	6,2 (± 0,4)
<i>C. glutamicum</i> INTG	4,5 (± 0,6)
<i>C. glutamicum</i> INTG [pAmy]	5,2 (± 0,6)
<i>C. glutamicum</i> INTD	6,3 (± 0,6)
<i>C. glutamicum</i> INTD [pAmy]	6,2 (± 0,6)
<i>C. glutamicum</i> INTF	6,0 (± 0,6)
<i>C. glutamicum</i> INTF [pAmy]	6,0 (± 0,5)

Tabelle D-6: Proteingehalt des Kulturüberstandes verschiedener *C. glutamicum*-Stämme, die in TYPS-Medium bis zu einer optischen Dichte von 4,5 inkubiert wurden.

Die *secD*- und *secF*-Mutanten sekretieren zwar weniger Protein als der Stamm *C. glutamicum* [pAmy] aber ebensoviel wie der Wildtyp. Die *secG*-Mutante dagegen exportiert trotz Amylase-Sekretion weniger Protein als der Wildtyp. Daraus läßt sich schließen, daß der Effekt der *secG*-Mutation den Proteinexport insgesamt betrifft. Die *secD*- und *secF*-Mutation betrifft dagegen im wesentlichen die Sekretion des heterologen Proteins. Da eine der Aufgaben des SecD/SecF-Komplexes innerhalb des „General Secretory Pathways“ die Erkennung imperfekter Signalsequenzen ist, die Amylase aber noch ihre eigene, aus *Streptomyces* stammende Signalsequenz besitzt, wird das heterologe Präprotein in den *secD*- und *secF*-Mutanten vermutlich nicht als zum Export bestimmt erkannt und deshalb auch nicht sekretiert.

4.2) Amylase-Sekretion der *sec*-überexprimierenden Stämme

Zur Analyse des Effekts der Überexpression von *sec*-Genen auf die Proteinsekretion wurde der Export der heterologen Amylase in diesen Stämmen untersucht. Dazu wurden die Plasmide, die einzelne *sec*-Gene tragen, in den Stamm *C. glutamicum* IAmy1 elektrotransferiert. Plasmide, die Kombinationen von *sec*-Genen tragen, wurden in dem Stamm *C. glutamicum* IAmy2 elektroporiert. Anschließend wurde die Amylase-Aktivität der resultierenden Stämme bestimmt.

4.2.1) Überexpression von einzelnen *sec*-Genen

Die Plasmide pSecA, pSecD, pSecE, pSecF, pSecG und pSecY wurden jeweils in den Stamm *C. glutamicum* IAmy1 elektrotransferiert und die Amylaseaktivität der resultierenden Stämme gemessen. Dazu wurden die einzelnen Stämme in TYPS-Flüssigmedium inkubiert und die Amylase-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt (Tabelle D-7). Um eine Verzerrung der Messung durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten zu vermeiden, wurden alle Messungen durchgeführt, wenn die Kulturen eine optische Dichte von 2,5 erreicht hatten. Wie sich zeigt, weicht die Amylase-Aktivität der getesteten Stämme nicht signifikant von der Aktivität des Stammes *C. glutamicum* IAmy1 ab.

Stamm	Amylase-Aktivität im Kulturüberstand (mU*)	µg Protein/ml Kulturüberstand
<i>C. glutamicum</i> IAmy1	45 (± 5)	6,2 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> IAmy1 [pSecA]	41 (± 5)	6,4 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> IAmy1 [pSecD]	45 (± 5)	6,2 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> IAmy1 [pSecE]	45 (± 5)	6,1 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> IAmy1 [pSecF]	46 (± 5)	6,3 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> IAmy1 [pSecG]	45 (± 5)	6,2 (± 0,5)
<i>C. glutamicum</i> IAmy1 [pSecY]	47 (± 5)	6,7 (± 0,5)

Tabelle D-7: Amylase-Aktivität und Proteingehalt des Kulturüberstandes verschiedener *C. glutamicum*-Stämme, die in TYPS-Medium bis zu einer optischen Dichte von 2,5 inkubiert wurden.* = Volumenaktivität U = μmol reduzierende Zucker / (ml x min)

Die Bestimmung des Proteingehalts des Kulturüberstandes der jeweiligen Stämme zeigt, dass der beobachtete Effekt nicht nur die Sekretion der heterologen Amylase betrifft. Auch die Sekretion der corynebakteriellen Proteine durch Stämme, die einzelne *sec*-Gene überexpressieren, weicht nicht von dem Stamm *C. glutamicum* IAmy1 ab.

Daraus folgt, daß die Überexpression von einzelnen Bestandteilen des „General Secretary Pathway“ keinen meßbaren Effekt auf die Sekretion von Proteinen ausübt.

4.2.2) Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen

Um den Effekt der Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen auf die Proteinsekretion zu messen, wurden die Plasmide pSecDF, pSecEDF und pSecYDF nach *C. glutamicum* IAmy2 elektroporiert. Anschließend wurden die einzelnen Stämme wiederum in TYPS-Flüssigmedium inkubiert und die Amylase-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt. Alle Messungen wurden durchgeführt, nachdem die Kulturen eine optische Dichte von 2,5 erreicht hatten, um eine Verzerrung der Messung durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten zu vermeiden. Im Gegensatz zu den Stämmen, die nur einzelne *sec*-Gene überexpressieren, wird die Amylase-Aktivität der getesteten Stämme signifikant gegenüber der Aktivität des Stammes *C. glutamicum* IAmy2 gesteigert. Während die gemeinsame Überexpression von *secD* und *secF* die Sekretion der Amylase um den Faktor 1,6 steigert, bewirkt die gleichzeitige Überexpression von *secE*, *secD* und *secF* eine Steigerung um den Faktor 2,2 und die von *secY*, *secD* und *secF* sogar eine von 2,6.

Die Bestimmung des Proteingehalts des Kulturüberstandes der getesteten Stämme (Abbildung D-20) zeigt, daß auch der Proteingehalt im Kulturüberstand signifikant zunimmt, und zwar im gleichen Maße wie die Amylaseaktivität. Der beobachtete Steigerungseffekt ist aber nicht nur durch die Sekretion der heterologen Amylase bedingt, da der Proteingehalt im Kulturüberstand von *C. glutamicum* IAmy2 [pSecYDF] mit 15,5 µg/ml mehr als doppelt so hoch ist, als der des Stammes *C. glutamicum* [pAmy], welcher die achtfache Menge an Amylase sekretiert (siehe Abschnitt D 3.2.2).

Zusammen mit den aus den SDS-Gelen gewonnenen Daten (siehe Abschnitt D 2.3.1) ergibt sich daraus, daß eine gleichzeitige Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen die Sekretion von homologen und heterologen Exoproteinen steigert.

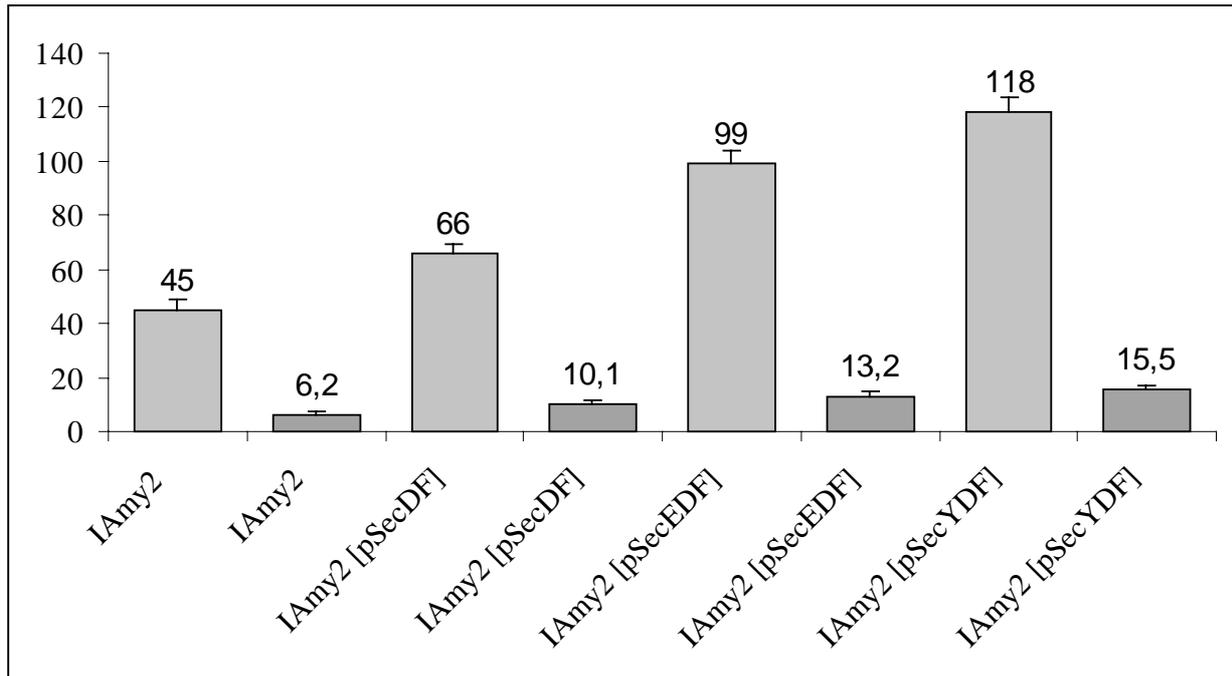


Abbildung D-20: Amylase-Aktivität und Proteingehalt des Kulturüberstandes verschiedener *C. glutamicum* I Amy2-Stämme. Alle Kulturen wurden in TYPS-Flüssigmedium bis zu einer optischen Dichte von 2,5 angezogen. Die Enzymaktivität (gelb) ist in mU angegeben (Volumenaktivität $U = \mu\text{mol}$ reduzierende Zucker pro ml und min), der Proteingehalt (blau) in μg pro ml.

4.2.3) Wachstum von verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen auf Stärke

Wie in Abschnitt D 3.2.3 gezeigt, sind Amylase-produzierende *C. glutamicum*-Stämme in der Lage, mit Stärke als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Ausgehend von den Ergebnissen des vorigen Abschnitts stellt sich die Frage, ob die Steigerung der Amylase-Sekretion direkt zu einem schnelleren Wachstum auf Stärke führt. Dazu wurden die Stämme *C. glutamicum* I Amy2, *C. glutamicum* I Amy2 [pSecDF], *C. glutamicum* I Amy2 [pSecEDF], *C. glutamicum* I Amy2 [pSecYDF] sowie *C. glutamicum* RES167 als Kontrolle in Flüssig-Minimalmedium (Katsumata *et al.*, 1984) angeimpft, das als einzige Kohlenstoffquelle 1 % lösliche Stärke enthält. Abbildung D-21 zeigt, daß das Wachstum der Amylase-sekretierenden Stämme mit der Rate der Amylase-Sekretion beschleunigt wird.

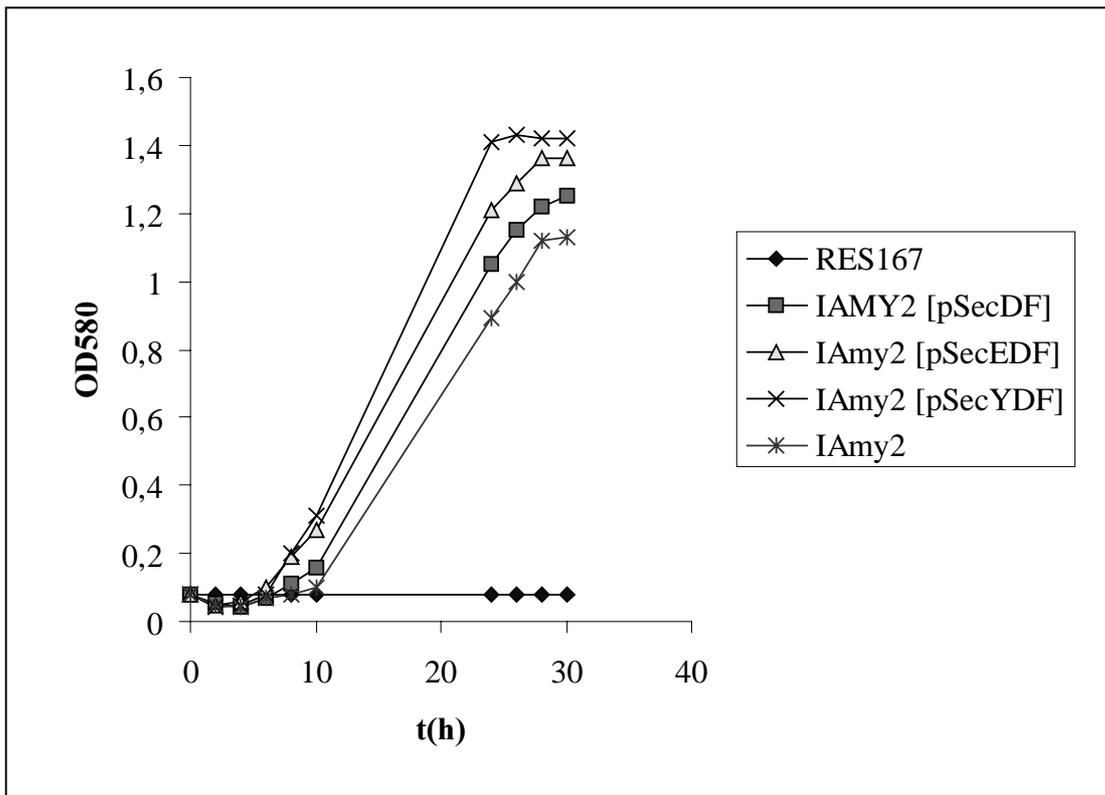


Abbildung D-21: Wachstum von verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen in Flüssig-Minimalmedium (Katsumata *et al.*, 1984) mit Stärke als einziger Kohlenstoffquelle.

Der beobachtete Wachstumsvorteil ist proportional zur Rate de Amylase-Sekretion, das heißt, der Stamm mit der höchsten Sekretionsrate wächst auch am schnellsten. Unter den gewählten Bedingungen sind die übersekretierenden Stämme also in der Lage, diese Übersekretion in einen direkten Wachstumsvorteil umzusetzen.

E Diskussion

1) Die neuen Gene *secD* und *secF* aus *Corynebacterium glutamicum* liegen stromabwärts von der *dciAE*-Region.

Die Gene *secD* und *secF* wurden mittels „Plasmid-Rescue“-Technik aus dem Chromosom von *C. glutamicum* isoliert. Das chromosomale 9,8 kb-Fragment trug acht vollständige und einen partiellen ORF in gleicher Leserichtung, denen bis auf ORF-6 durch Blast-Homologievergleich (Altschul *et al.*, 1997) eine Funktion zugeordnet werden konnte. Wie in allen bisher untersuchten Eubakterien sind *secD* und *secF* direkt benachbart (Sievert *et al.*, 1997; siehe Abbildung E-1).

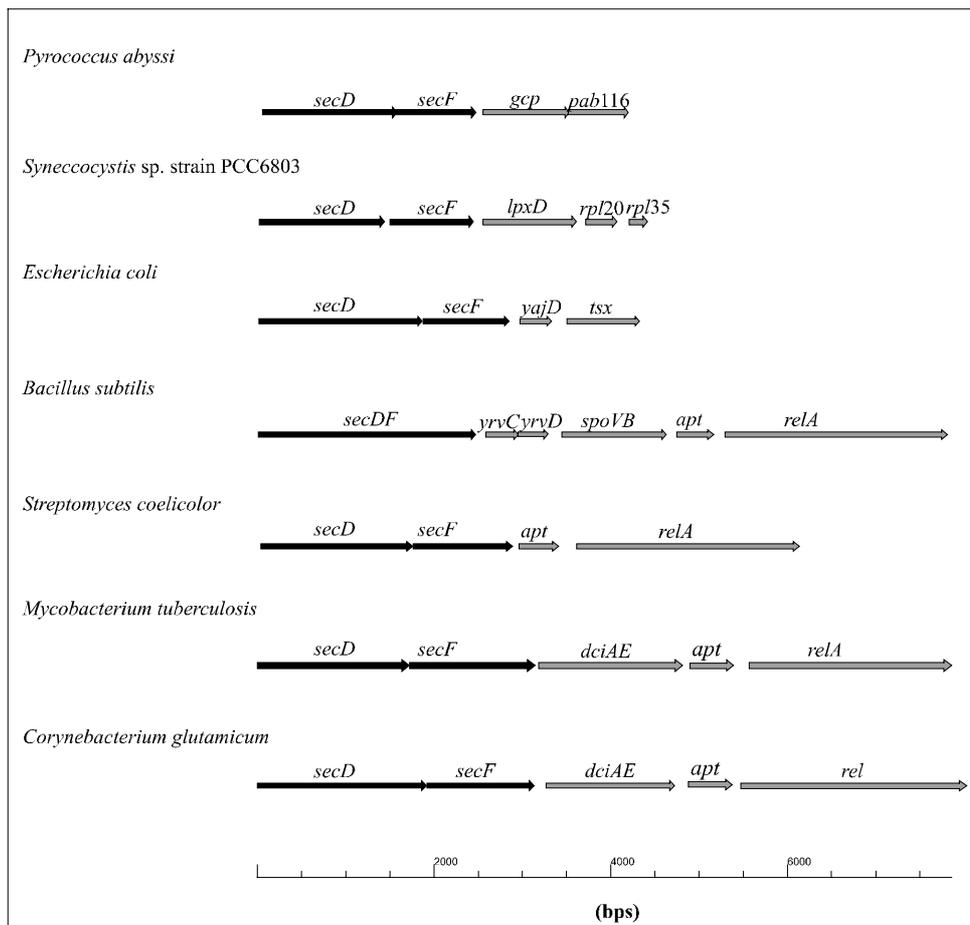


Abbildung E-1: Schematische, maßstabgerechte Darstellung der *secDF*-Regionen aus verschiedenen Bakterien.

In Archaeobakterien sind *secD* und *secF* nur in einigen Spezies wie *Pyrococcus abyssi* (Heilig, R., 1999; GenBank AJ 248288) benachbart. Die Ähnlichkeit der *secDF*-Region aus *C. glutamicum* zu der aus verschiedenen Bakterien steigt mit zunehmender Verwandtschaft. Die Region aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko *et al.*, 1995) oder dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997) weist bis auf die Anordnung von *secD* und *secF* keine Ähnlichkeit zu der aus *C. glutamicum* auf (siehe Abbildung E-1). Der Vergleich der Region in Gram-positiven Bakterien zeigt eine ähnliche Anordnung in *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997) und *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996) und eine identische in dem nahe verwandten Stamm *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998).

Weiterführende Computeranalysen der Aminosäure-Sequenz des SecD-Proteins mit HMMTOP (Tusnády & Simon, 1998) zeigten, daß mit 371 Aminosäure-Resten mehr als die Hälfte des Proteins als großer, extracytoplasmatischer „Loop“ vorliegen. Der Rest des Proteins bildet sechs Transmembrandomänen in unregelmäßiger Verteilung, ein Membrandurchgang liegt carboxyterminal vor dem „Loop“, die anderen fünf dahinter. SecD weist sechs konservierte Bereiche auf, die in allen bisher untersuchten SecD-Proteinen vorhanden sind und deren Funktion bislang unbekannt ist (Bolhuis *et al.*, 1999a).

Die Struktur des SecF-Proteins entspricht in Anzahl und Verteilung der Transmembrandomänen völlig der des SecD-Proteins, der extracytoplasmatische „Loop“ macht mit 95 AS aber nur knapp ein Viertel des Proteins aus. Diese Struktur ist typisch für die SecD- und SecF-Proteine und tritt auch auf, wenn die beiden Proteine zu einem einzigen verschmolzen sind (Bolhuis *et al.*, 1999a; Abbildung E-2).

SecF trägt vier konservierte Regionen, von denen die Region F4 essentiell für die Funktion ist (Bolhuis *et al.*, 1999a). Die Analyse der Proteinsequenz mit dem Computerprogramm FingerPRINTscan (Attwood *et al.*, 1999) identifizierte darüber hinaus zwei Regionen, die hohe Homologie zu den, für SecY charakteristischen Motiven I und VI aufweisen. Da die zweite Region die essentielle F4-Region vollständig einschließt, handelt es sich möglicherweise um Interaktionsstellen mit SecY.

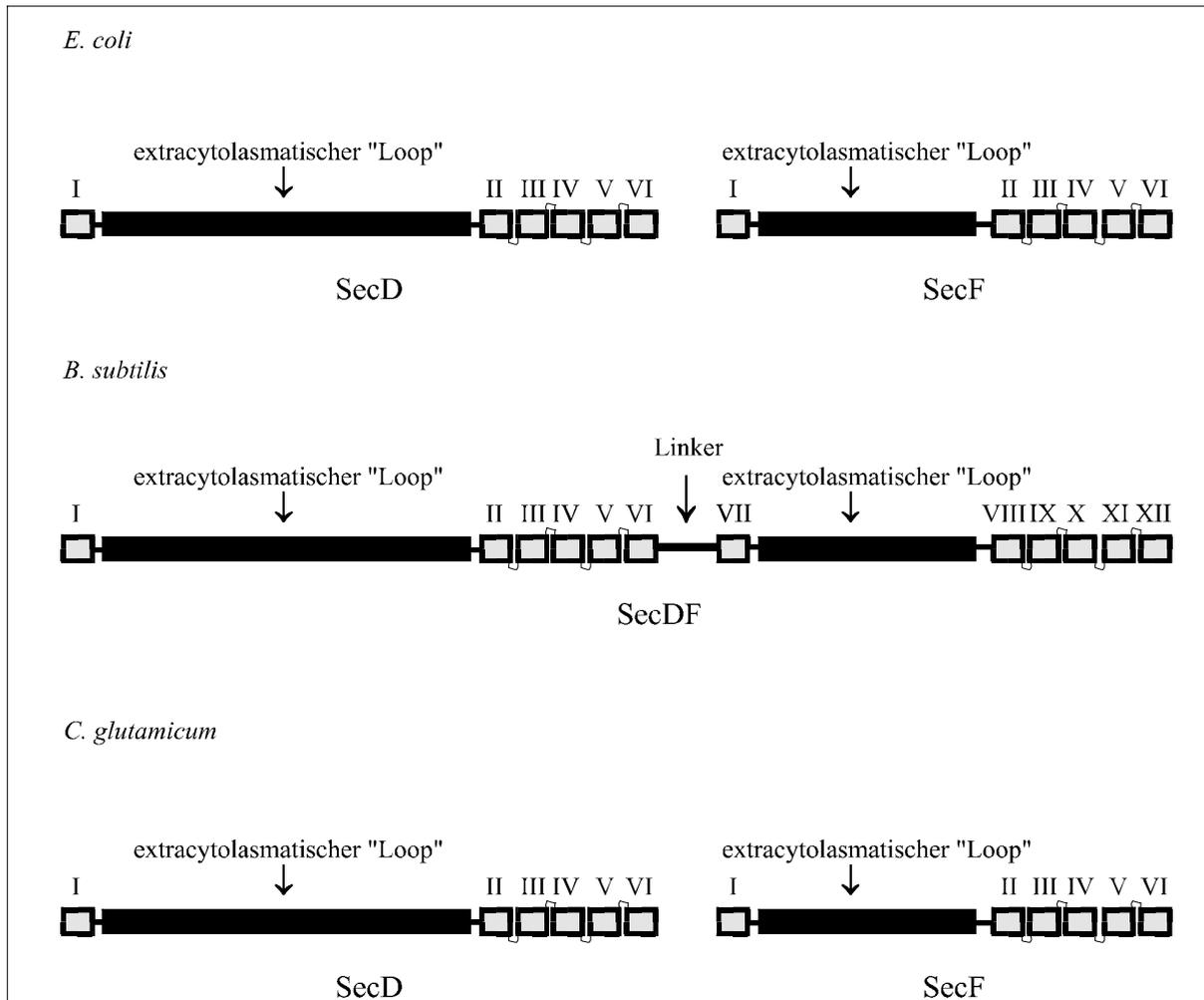


Abbildung E-2: Schematische Darstellung der Proteine SecD und SecF aus *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997) und *C. glutamicum* sowie des SecDF-Proteins aus *B. subtilis* (Bolhuis *et al.*, 1999a). Die extracytoplasmatischen „Loops“ sind als schwarze Kästen dargestellt, die als graue Kästen dargestellten Transmembrandomänen sind in römischen Ziffern nummeriert. Alle Proteine weisen die gleiche Struktur auf. Das zu einem einzigen Protein verschmolzene SecDF aus *B. subtilis* zeigt darüber hinaus einen Linker, der die SecD- und die SecF-Untereinheit verbindet (Bolhuis *et al.*, 1999a).

Beide Proteine, SecD und SecF, sind innerhalb der Bakterien gut konserviert (Sievert *et al.*, 1997), zeigen aber ihre höchste Homologie zu den jeweiligen Pendanten aus *Mycobacterium tuberculosis*. Die Homologien erstrecken sich aber nicht in gleichem Maße über die gesamte Länge der Proteine. Die extracytoplasmatischen „Loops“ sind weniger konserviert als die Teile der Proteine, die Transmembran-Domänen tragen. Die größte Variabilität zeigt sich im Amino-Terminus von SecF und dem Carboxy-Terminus von SecD. Während SecD aus *C. glutamicum* im Vergleich zu SecD aus *M. tuberculosis* an dieser Stelle verlängert ist, ist SecF verkürzt. Diese Variabilität reicht innerhalb der Bakterien soweit, daß in manchen Spezies wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus carnosus* (Bolhuis *et al.*, 1999a; Kappes & Frendl,

2000) beide Proteine an dieser Stelle zu einem einzigen verschmelzen (siehe Abbildung E-2). Auch die Regionen D1-6 und F1-4 sind unterschiedlich gut konserviert, am stärksten ist die Ähnlichkeit für die Regionen D1 und F1 ausgeprägt. Die Consensus-Sequenz für D1 ist **G(L/I)DLRGG** (Bolhuis *et al.*, 1999a), die entsprechende Sequenz aus *Corynebacterium* **GIDLQGG**. Für F1 ist die Consensus-Sequenz **G(L/I)DF(A/T)GG** und die Aminosäuresequenz aus *C. glutamicum* **GIDFKGG**.

Die Struktur der Proteine SecD und SecF ist in allen bisher untersuchten Bakterien prinzipiell gleich (Economou, 1999). Sie weisen alle jeweils sechs Transmembrandurchgänge pro Protein auf, sowie einen großen extracytoplasmatischen „Loop“ für SecD und einen kleineren für SecF. Wenn die beiden Proteine als ein einzelnes SecDF-Protein vorliegen, wie es beispielsweise in *B. subtilis* der Fall ist, zeigt das Protein zwölf Membrandurchgänge, zwei „Loops“ und zehn konservierte Regionen (Bolhuis *et al.*, 1999a).

Die durch die neu isolierten Gene *secD* und *secF* aus *C. glutamicum* kodierten Proteine weisen also alle typischen Charakteristika der SecD- und SecF-Proteine auf.

2) Einige *sec*-Gene sind in ihrer chromosomalen Anordnung konserviert.

Zur Analyse der chromosomalen Anordnung der *sec*-Gene wurden auch die übrigen Gene *secA*, *secE*, *secG* und *secY* mit samt umliegender Regionen mittels PCR isoliert. Das innerhalb der Bakterien hoch konservierte *secA* (Kobayashi *et al.*, 1999) zeigt den typischen Aufbau aus zwei ATP-Bindestellen unterschiedlicher Affinität (Mitchell & Oliver, 1993), einer Signalsequenz-bindenden Region (Kimura *et al.*, 1991) sowie eine Dimerisierungs- und SecY-Interaktionsregion (Manting *et al.*, 1997). Das ebenfalls hoch konservierte SecY (Kobayashi *et al.*, 1994) zeigt zehn Membrandurchgänge, wie in allen bisher beschriebenen Fällen (Tschauer *et al.*, 1992; Bhattacharyya & Das, 1997). Während das kleine Protein SecE aus *E. coli* drei Transmembran-Domänen aufweist (Schatz *et al.*, 1989), zeigt die Computer-gestützte Auswertung der Aminosäuresequenz von SecE aus *C. glutamicum* lediglich einen Membrandurchgang. Die Auswertung der Sequenz des kleinsten Sec-Protein SecG aus *C. glutamicum* zeigt drei Transmembran-Domänen, im Gegensatz zu dem aus *E. coli*, welches zwei aufweist (Nishiyama *et al.*, 1994). Die Proteine SecE und SecG sind in ihrer Struktur also vermutlich weniger konserviert als SecA und SecY.

Ordnet man die *sec*-Gene auf einer chromosomalen Karte von *C. glutamicum* an (Bathe *et al.*, 1996), so zeigt sich, daß sie nicht in einem Cluster angeordnet, sondern über das Chromosom verteilt sind. Allerdings liegen alle *sec*-Gene mit Ausnahme von *secG* in gleicher Leserichtung und enger räumlicher Nähe zu Genen, die im weiteren Sinne in Translations- und Transkriptions-Prozesse involviert sind. Dabei handelt es sich im wesentlichen um die Gene ribosomaler Proteine wie *rpsQ* oder *rplK*, aber auch um tRNAs oder um Gene wie *nusG*, das in Assoziation mit den Ribosomen an der Transkriptionstermination von rRNA beteiligt ist (siehe Abbildung E-3). Die Vergesellschaftung von *secE* mit *nusG*, von *secY* mit Genen ribosomaler Proteine (Abb. E-3) ist in Bakterien hoch konserviert (Sievert *et al.*, 1997). Die Vergesellschaftung von *secD* und *secF* mit *rel*, einem zeitweilig am Ribosom assoziierten Protein (Abb. E-1) ist nur in Gram-positiven mit hohem GC-Gehalt konserviert.

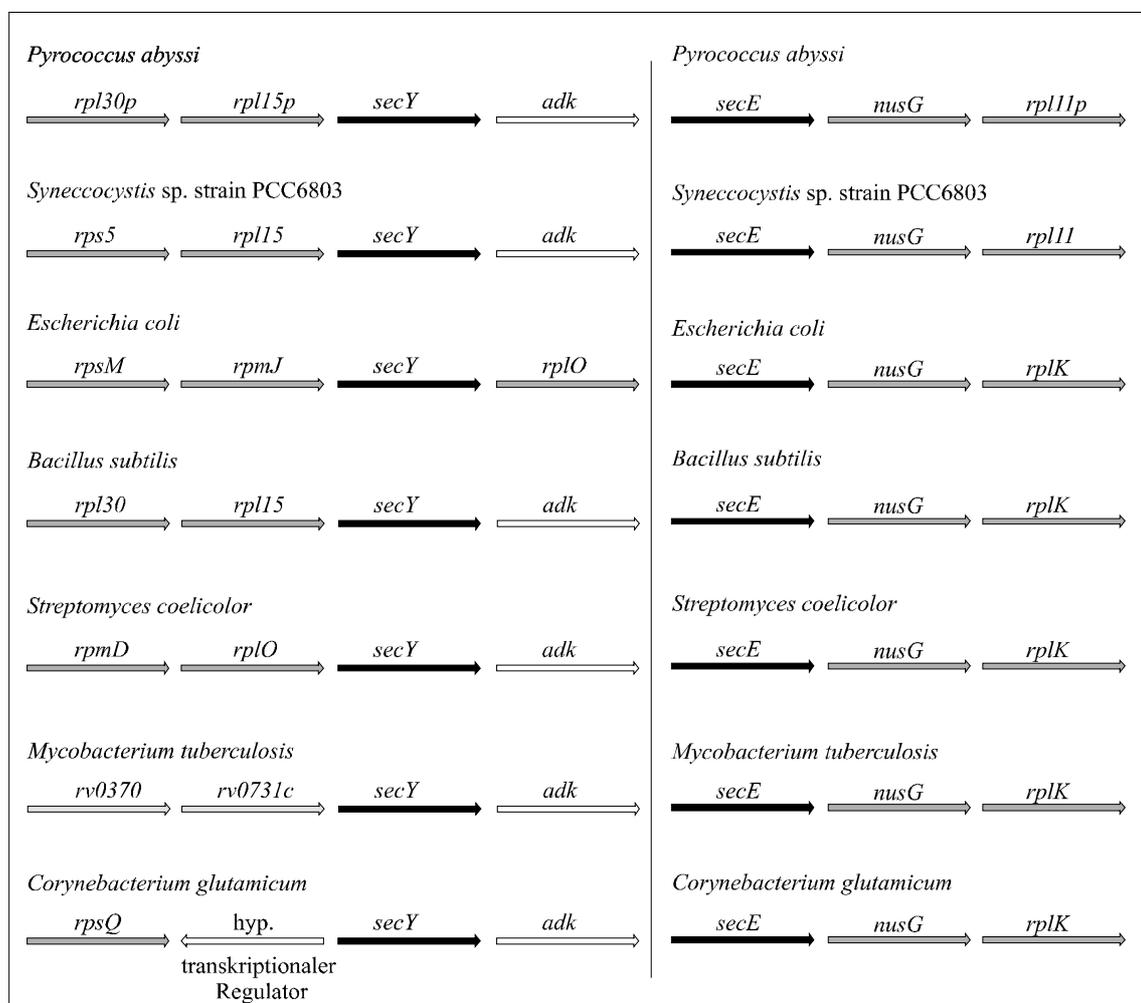


Abbildung E-3: Schematische Darstellung der chromosomalen Anordnung der Gene *secY* und *secE* in verschiedenen Organismen; *sec*-Gene sind in schwarz, Gene der Translation und Transkription in grau und andere Gene in weiß dargestellt.

Das Gen *rplK* ist äquivalent zu *rpl11*, beide Gene kodieren für das ribosomale Protein L11.

Die konservierte Anordnung der Gene *secY* und *secE* ist sowohl in Archaeobakterien wie *Pyrococcus abyssi* (Heilig, R. 1999) und Cyanobakterien wie *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1995) als auch in Gram-negativen Bakterien wie *E.coli* (Blattner *et al.*, 1997) und Gram-Positiven wie *S. coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996) und *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) zu beobachten. Eine *C. glutamicum*-spezifische Ausnahme stellt der hypothetische, transkriptionale Regulator stromaufwärts und in entgegengesetzter Leserichtung von *secY* dar, der sich sonst in keinem Bakterium an dieser Stelle finden läßt.

Die Gene *secA* und *secG* sind in ihrer chromosomalen Anordnung deutlich weniger konserviert.

3) Mutationen im „General Secretary Pathway“ bewirken Störungen im Aufbau der Zellhülle.

Zur weiteren Funktionsanalyse der *sec*-Gene in *C. glutamicum* wurden Mutationen in die Komponenten des GSP eingefügt. Die Gene *secA*, *secY* und *secE* erwiesen sich dabei als essentiell für das Überleben der Zellen, wie in allen anderen bisher untersuchten Bakterien auch (Economou, 1999). Von den weniger zentralen Bestandteilen der Translokationsmaschinerie ließen sich dagegen sehr wohl Mutanten herstellen. Von *secD* und *secF* wurden mittels interner Fragmente Insertionsmutanten erzeugt, *secG* wurde im Chromosom gegen eine disruptierte Kopie ausgetauscht.

Erste lichtmikroskopische Beobachtungen zeigten, daß die Zellen sowohl des *secD*-defekten Stammes *C. glutamicum* INTD als auch der *secF*-Mutante *C. glutamicum* INTF gegenüber dem Wildtyp deutlich vergrößert sind. Sie sind etwa dreimal so lang, was ca. einer Verzehnfachung des Volumens entspricht. Während ein solcher Effekt in *secD*- und *secF*-Mutanten von *E. coli* nicht auftritt (Pogliano & Beckwith, 1994a), zeigen *secDF*-defekte Stämme von *B. subtilis* filamentöses Wachstum (Bolhuis *et al.*, 1999a). Dies spricht für einen, durch *secD*- oder *secF*-Mutation ausgelösten Teilungsdefekt. Die *secG*-Mutante *C. glutamicum* INTG zeigte keinerlei morphologische Auffälligkeiten. Behandelt man die Zellen von *C. glutamicum* INTG zur Extraktion der Zellwandproteine auf gleiche Weise wie alle anderen Stämme, so lysieren die Zellen sofort. Diese unüblich hohe Empfindlichkeit der

Zellen gegenüber Detergenzien ist ein weiterer Hinweis auf eine Störung im Aufbau der Zellhülle, die hier in einer geringeren Stabilität resultiert.

Die Analyse der Zellwandproteine der Stämme *C. glutamicum* INTD und INTF im SDS-PAGE ergab, dass zwei Proteine, ein 39 kDa Protein mit Homologie zum mykobakteriellen Antigen85-Komplex und ein 32 kDa Protein unbekannter Funktion, gegenüber dem Wildtyp deutlich unterrepräsentiert sind. Die Sekretion des PS1-Proteins ist durch die Mutation nicht betroffen. Mutationen innerhalb des GSP betreffen also nicht alle sekretierten Proteine auf die gleiche Weise.

Daß das PS1-Protein durch die Manipulation an Komponenten des GSP unbeeinflusst bleibt, liegt möglicherweise wiederum an der guten Anpassung von PS1 an den Proteinexport. Eine der Hauptfunktionen des SecDF-Komplexes liegt in der Verstärkung des Exports von Proteinen mit suboptimaler Signalsequenz (Pogliano & Beckwith, 1994a). Die Signalsequenz von PS1 ist aber für die Proteinsekretion in *C. glutamicum* gut geeignet (Joliff *et al.*, 1993a,b), weshalb Mutationen in *secD* oder *secF* allenfalls marginale Effekte auf die PS1-Sekretion ausüben dürften.

Die Mutation in *secD* oder *secF* führt also zu Störungen im Aufbau der Zellwand, da einige ihrer Proteinkomponenten offenbar nicht mehr in ausreichender Menge sekretiert werden. Diese Störungen verursachen vermutlich auch den Teilungsdefekt, auf dem wahrscheinlich die Volumenvergrößerung beruht. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das unterschiedliche Verhalten der sekretierten Proteine bei Mutation von *secD* oder *secF* liegt in einer weiteren Funktion des SecDF-Komplexes, nämlich der Steigerung des „proton motive force“ betriebenen Exports (Arkowitz & Wickner, 1994). Da Exoproteine für ihre Translokation in unterschiedlichem Maße auf den elektrochemischen Gradienten angewiesen sind (Arkowitz & Wickner, 1994), ist es möglich, daß bestimmte Proteine von *C. glutamicum* nach Wegfall von SecDF nur noch in geringerem Maße sekretiert werden, während andere unbeeinflusst bleiben.

Die Tatsache, daß *secD*- und *secF*-Mutanten unabhängig voneinander den exakt gleichen Phänotyp aufweisen, ist ein starker Hinweis darauf, daß beide Proteine innerhalb des GSP obligat miteinander interagieren, wie es auch für *E. coli* vermutet wird (Pogliano & Beckwith, 1994a).

Die Effekte aller Mutationen ließen sich durch Komplementationen mit Plasmid-kodierten Kopien der jeweiligen Gene vollständig wieder aufheben. Da der Stamm *C. glutamicum* INTD nach Komplementation mit einem intakten *secD* den Phänotyp des Wildtyps wieder

herstellt, sind polare Effekte der *secD*-Mutation auf *secF* ausgeschlossen (siehe Abbildung E-4).

Im Gegensatz zu *E. coli* (Pogliano & Beckwith, 1994b) sind *secD* und *secF* in *C. glutamicum* also vermutlich nicht als Operon strukturiert.

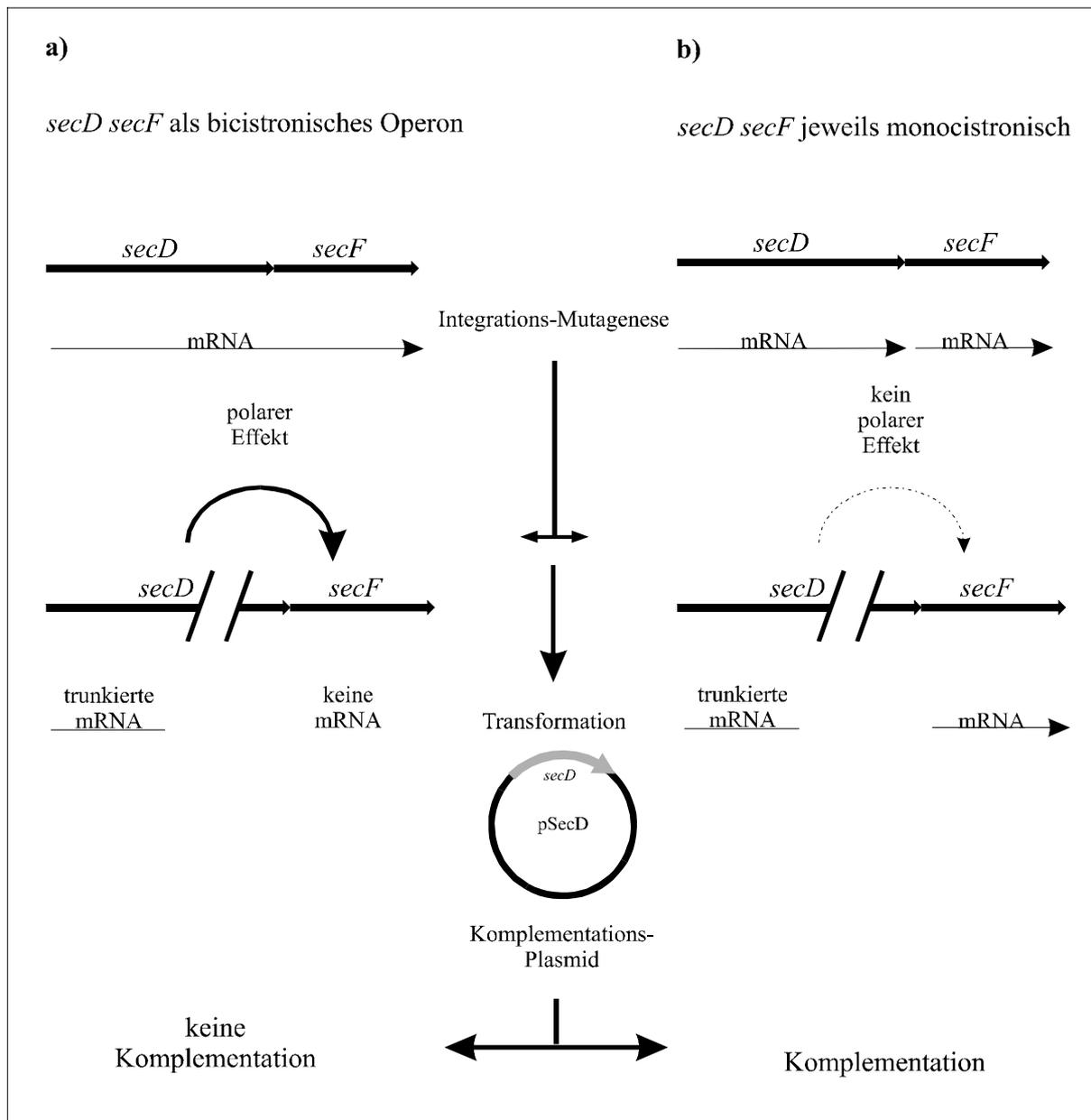


Abbildung E-4: Schematische Darstellung der möglichen Organisation von *secD* und *secF*.

- a)** Die Gene *secD* und *secF* liegen als Operon vor. In diesem Falle hätte eine Insertionsmutation in *secD* einen polaren Effekt auf das stromabwärts gelegene *secF*. Eine Komplementation durch ein Plasmid-kodiertes *secD* allein wäre nicht möglich.
- b)** Die Gene *secD* und *secF* liegen nicht als Operon vor. Eine Insertionsmutagenese in *secD* hätte in diesem Fall keinen Effekt auf *secF* und die Mutante ließe sich allein durch *secD* komplementieren.

4) Die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen steigert die Sekretion von Zellhüllproteinen.

Zur Analyse des Effekts der Überexpression von *sec*-Genen wurden diese einzeln oder in verschiedenen Kombinationen als promotorlose PCR-Amplifikate in Expressionvektoren kloniert und in *C. glutamicum* exprimiert. Die Effekte dieser Überexpression wurden in Bezug auf die Sekretion endogener Zellwandproteine, welche die Hauptmenge der sekretierten Proteine ausmachen (Peyret *et al.*, 1993), untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Proteinsekretion von Stämmen, die einzelne *sec*-Gene überexprimieren, nicht signifikant von der des Wildtyps abweicht. Dies beruht vermutlich auf dem Faktum, daß bestimmte Komponenten des GSP bei alleiniger Überproduktion instabil sind. Stabile Überproduktion von SecY erfordert in *E. coli* zum Beispiel die gleichzeitige Überexpression von SecE (Matsuyama *et al.*, 1990). Andere, weniger zentrale Komponenten wie SecD, SecF oder SecG benötigen in *E. coli* obligat die anderen Bestandteile des GSP, um ihre Funktion auszuüben (den Blaauwen & Driessen, 1996). SecA ist in *E. coli* schon unter Normalbedingungen in ca. zehnfacher Menge im Vergleich zu den SecYEG-Komplexen vorhanden (Driessen *et al.*, 1995). Da SecA unter anderem die Bildung der Translokationskomplexe zu initiieren scheint (Manting *et al.*, 2000), wird die SecA-Funktion letzten Endes auch durch die Menge an SecYEG limitiert. Daraus folgt, daß die Überproduktion von SecA allein nur wenig Auswirkung *in vivo* auf die Proteinsekretion zeigt.

Werden Kombinationen von *sec*-Genen überexprimiert, so scheint sich die Sekretion einzelner Proteine zu steigern. In den Stämmen *C. glutamicum* [pSecEDF] und [pSecYDF] werden bestimmte, bisher nicht identifizierte Proteine in größerem Maße sekretiert, ein als PS1 determiniertes Zellwandprotein scheint dagegen unbeeinflusst zu bleiben. Der Steigerungseffekt korreliert mit den in *E. coli* gemachten Beobachtungen, daß überproduziertes SecF stabilisierend auf überproduziertes SecD und SecY wirkt (Sagara *et al.*, 1994). Zusätzlich steigert die Überexpression von *secF* die Expression von chromosomalem *secY* (Sagara *et al.*, 1994). Es wurden also parallel Komponenten des GSP überexprimiert, die sich funktionell ergänzen und die sich gegenseitig stabilisieren, was sehr wohl zu einer Erhöhung der Anzahl der Translokationskomplexe in der Cytoplasmamembran geführt haben kann. Die Stabilisierung ist in Abbildung E-5 schematisch dargestellt.

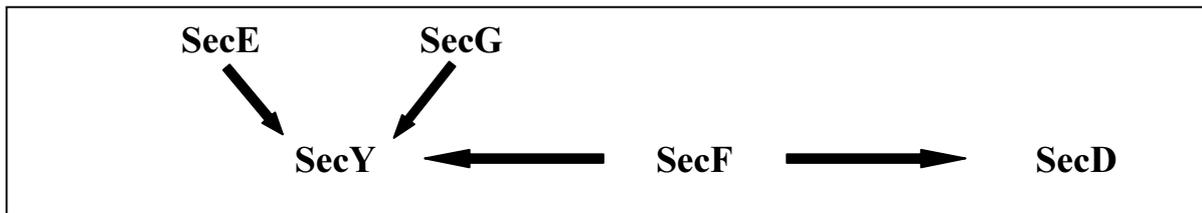


Abbildung E-5: Schematische Darstellung der Stabilisierung von SecY durch SecE, SecG und SecF und der Stabilisierung von SecD durch SecF (nach Sagara *et al.*, 1994).

Daß die Sekretion von PS1 unbeeinflusst von der Überexpression der *sec*-Gene zu bleiben scheint, beruht möglicherweise darauf, daß der Export dieser Hauptkomponente der Zellwandproteine (Joliff *et al.*, 1992) bereits optimal ist. Das hieße, daß die Syntheserate von PS1 und Proteinexportrate aufeinander abgestimmt sind. Eine Erhöhung der Exportkapazität bliebe in diesem Fall mangels zu exportierendem PS1-Protein folgenlos.

5) α -Amylase ist ein geeignetes Reportersystem der Proteinsekretion in *C. glutamicum*.

In den vorangegangenen Analysen der Effekte der Überexpression und Mutation von Bestandteilen des GSP ließen sich zwar Auswirkungen auf die Sekretion endogener Proteine beobachten, jedoch nicht genau quantifizieren. Eine Quantifizierung der Proteinsekretion durch Bestimmung des Proteingehalts im Kulturmedium ist ebenfalls sehr ungenau, da *C. glutamicum* seine endogenen Exoproteine ausschließlich in die Zellwand einbaut und nicht direkt in das umgebende Medium sekretiert (Peyret *et al.*, 1993). Bei den gemessenen Proteinkonzentrationen handelt es sich also um Proteine, die sich aus der Zellwand herausgelöst haben, was zwar Rückschlüsse auf die Proteinsekretion im Allgemeinen erlaubt, einer exakten Quantifizierung aber durch Faktoren wie die Stabilität der Zellwand entgegen steht.

Da *C. glutamicum* ATCC 13032 keine eigenen Proteine mit enzymatischer Aktivität direkt in das umgebende Medium sekretiert, mußte ein Reportersystem auf der Basis eines heterologen Exoenzyms konstruiert werden, das mehreren Anforderungen gerecht wurde: Erstens mußte

das heterologe Protein stabil und vollständig in das umgebende Medium sekretiert werden, zweitens mußte das Präprotein durch *C. glutamicum* korrekt prozessiert werden und drittens sollte ein zuverlässiger Nachweis für die Aktivität des heterologen Proteins existieren.

Dazu wurden mehrere heterologe Exoenzyme, nämlich Cellulase A aus *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Meletzus et al., 1993), Metalloprotease A und Lysozym, beide aus *Streptomyces coelicolor* „Müller“ (Dammann & Wohlleben, 1992; Dammann, 1992) sowie Chitinase C aus *S. coelicolor* (Redenbach et al., 1996) und Chitinase A aus *Serratia marcescens* (Jones et al., 1986) auf ihre Eignung als Reporter der Proteinsekretion in *C. glutamicum* überprüft. Obwohl alle Exoenzyme in *E. coli* sekretiert wurden, zeigte nur die Cellulase A eine geringfügige Aktivität in *C. glutamicum*, alle anderen Proteine wurden nicht sekretiert oder erwiesen sich als letal für *C. glutamicum*. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, daß die heterologen Präproteine kein oder nur ein sehr schlechtes Substrat für die corynebakteriellen Signalpeptidasen darstellen und deshalb inkorrekt oder gar nicht prozessiert wurden. In *Bacillus* zumindest ist die Substratspezifität der verschiedenen Signalpeptidasen vom Typ I eine der Ursachen dafür, daß die Sekretion heterologer Proteine häufig nur in sehr geringen Raten erfolgt (Bron et al., 1998). Eine andere Möglichkeit ist, daß die heterologen Gene nicht in *C. glutamicum* exprimiert wurden.

Da auch die Cellulase-Aktivität mit maximal 3,8 mU zu gering war, um ein sinnvolles Reportersystem der Proteinsekretion darzustellen, wurden mehrere, auf α -Amylase aus *Streptomyces griseus* (Vigal et al., 1991) basierende Systeme auf ihre Eignung untersucht. Von dieser α -Amylase war bekannt, daß ihre Signalsequenz in *C. glutamicum* korrekt prozessiert wird (Cadenas et al., 1992). Um alle *sec*-Mutanten und Überproduzierer zu erfassen, wurden ein replikatives, plasmidkodierte und zwei integrative, chromosomal kodierte Systeme konstruiert. In allen Systemen ließ sich die α -Amylase-Aktivität sehr gut mit verschiedenen Tests nachweisen, sowohl auf Fest- als auch in Flüssigmedium. Bedingt durch die Kopienzahl war die Aktivität der chromosomal kodierten Systeme mit 45 mU fast achtfach niedriger als die des Plasmid-kodierten Systems mit 372 mU. Dennoch stellen alle Systeme geeignete Reporter der Sekretion heterologer Proteine in *C. glutamicum* dar.

Ein Nebeneffekt der Sekretion der heterologen α -Amylase in *C. glutamicum* war die neue Fähigkeit der Amylase-sekretierenden Stämme, mit Stärke als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die α -Amylase zerlegt dabei die für *C. glutamicum* nicht nutzbare C-Quelle Stärke in die gut metabolisierbaren Bestandteile Glukose und Maltose (Vahjen et al., 1995). Das Wachstum von *C. glutamicum* mit Stärke ist dabei direkt abhängig von der Rate der Amylase-Sekretion, das heißt, der Stamm mit der höchsten Amylasesekretion *C. glutamicum* [pAMY]

wächst schneller als die Stämme, die weniger sekretieren, also *C. glutamicum* IAmy1 und IAmy2. Der Wildtypstamm wächst überhaupt nicht auf Stärke als einziger C-Quelle.

6) Mutationen innerhalb des „General Secretary Pathway“ reduzieren die Sekretion des heterologen Reporter-Proteins.

Da mit der heterologen α -Amylase ein Reportersystem der Proteinsekretion zur Verfügung stand, wurde damit die Proteinsekretion in den *sec*-Mutanten untersucht. Dazu wurde das Plasmid pAmy in die Stämme *C. glutamicum* INTD, *C. glutamicum* INTF sowie in *C. glutamicum* INTG transferiert und die Amylasesekretion quantifiziert. Ergebnis war, daß für die *secD*- beziehungsweise *secF*-defekten Stämme *C. glutamicum* INTD und INTF weder auf Festmedium noch im Kulturüberstand oder im Zellaufschluß Amylase-Aktivität zu detektieren war. Eine Überprüfung des Proteingehalts des Kulturüberstands der *sec*-Mutanten ergab jedoch in etwa die gleiche Proteinmenge, die beim Wildtyp zu beobachten ist, und zwar unabhängig davon, ob die Stämme das Plasmid pAmy trugen oder nicht. Der beobachtete Effekt betrifft also vermutlich ausschließlich die Sekretion des heterologen Proteins, obwohl die Möglichkeit besteht, daß die *secD*- und *secF*-Mutanten generell weniger Protein sekretieren, dieses aber auf Grund des gestörten Zellwandaufbaus leichter in das Kulturmedium austritt. Angesichts des völligen Fehlens von Amylase-Aktivität ist dies jedoch wenig wahrscheinlich.

Wie zuvor beschrieben, ist die Verstärkung des Exports von Proteinen mit suboptimaler Signalsequenz eine der Hauptfunktionen von SecD und SecF (Pogliano & Beckwith, 1994a). Da das α -Amylase-Präprotein noch seine eigene, aus *Streptomyces* stammende Signalsequenz trägt, die nicht an *C. glutamicum* angepaßt ist, wird sie bei Fehlen von funktionellen SecDF-Komplexen möglicherweise nicht mehr als zum Export bestimmt erkannt. Eine weitere Funktion von SecDF ist die Freisetzung von reifem Protein von der Membran (Matsuyama *et al.*, 1993). Wäre dies auch in *C. glutamicum* der Fall, hätte sich die reife Amylase beim mechanischen Aufschluß der Zellen von der Membran ablösen müssen und die Aktivität wäre im Zellausfluß nachweisbar gewesen. Da eine Aktivität aber nicht nachweisbar war, übt SecDF diese Funktion in *C. glutamicum* wie in *B. subtilis* nicht aus (Bolhuis *et al.*, 1999a) oder die Amylase erreicht aus den oben genannten Gründen gar nicht erst die Außenseite der

Membran. Das auch intrazellulär keinerlei Aktivität zu detektieren war, liegt vermutlich daran, daß das Amylase-Präprotein im ungefalteten und unprozessierten Zustand nicht aktiv ist. Nicht sekretiertes Protein wird darüber hinaus zum Beispiel in *B. subtilis* wieder abgebaut (Nagarajan 1993).

Die Analyse der *secG*-Mutante *C. glutamicum* INTG [pAmy] in Bezug auf die Amylase-Sekretion zeigte eine deutliche Verminderung der Amylase-Aktivität auf ca. 20 % der Aktivität des Stammes *C. glutamicum* [pAmy]. Die Untersuchung des Gesamtproteingehalts in Kulturüberständen ergab, daß in *secG*-defekten Stämmen, verglichen mit allen anderen *C. glutamicum* Stämmen, die niedrigste Proteinmenge vorlag, gleichgültig, ob Amylase sekretiert wurde oder nicht. Der Export endogener Proteine in *secG*-Mutanten könnte sogar noch niedriger sein, da auch *C. glutamicum* INTG Störungen im Zellhüllaufbau zeigt. Unabhängig davon gilt, daß der Export endogener und heterologer Proteine in *secG*-Mutanten vermindert ist. Die *secG*-Mutation wirkt sich im Gegensatz zur *secD*- oder *secF*-Mutation also generell auf die Proteinsekretion aus.

Die Funktion des nicht-essentiellen Proteins SecG innerhalb des GSP liegt in der Stimulation der Funktion von SecA (Duong & Wickner, 1997a). Dies erfolgt durch eine topologische Inversion, die an die zyklische De- und Reinsertion von SecA in die Cytoplasmamembran während der Proteintranslokation gekoppelt ist (Nishiyama *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998). Auch in *E. coli* führt eine *secG*-Mutation zu Exportdefekten (Nishiyama *et al.*, 1996) deren Stärke allerdings abhängig ist von der Art der Mutation und dem Stamm, in dem sie durchgeführt wurde (Flower *et al.*, 2000). Üblicherweise äußert sich eine *secG*-Mutation in *E. coli* jedoch nur in sehr milden Effekten auf den Proteinexport (Flower *et al.*, 2000), keinesfalls in einer fast 80-prozentigen Senkung der Exportrate, wie sie für die Amylase-Sekretion in *C. glutamicum* INTG zu beobachten ist. Ob dieser Effekt spezifisch für *C. glutamicum* ist oder auf der heterologen Natur der α -Amylase beruht, läßt sich nicht unterscheiden, da die Proteinbestimmung im Kulturüberstand von *C. glutamicum* INTG aus den oben genannten Gründen nicht aussagekräftig genug ist.

7) Die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen steigert die Proteinsekretion.

Zur Analyse des Effekts der Überexpression von *sec*-Genen auf die Proteinsekretion wurde der Export der α -Amylase in den überexprimierenden Stämmen untersucht. Dazu wurden die Plasmide, die einzelne *sec*-Gene tragen, in den Stamm *C. glutamicum* IAmy1 und Plasmide, die Kombinationen von *sec*-Genen tragen in den Stamm *C. glutamicum* IAmy2 transferiert. Beide Stämme unterscheiden sich lediglich durch ihre Antibiotika-Resistenz.

In den Stämmen, die einzelne *sec*-Gene überexprimieren, weicht weder die gemessene Amylase-Aktivität noch der Proteingehalt im Kulturüberstand signifikant von dem, für *C. glutamicum* IAmy1 bestimmten Wert ab. Die Überexpression von einzelnen Komponenten des GSP übt also keinen meßbaren Einfluß auf die Sekretion von Proteinen aus. Diese Daten korrelieren mit den Beobachtungen, die für die Sekretion der endogenen Zellhüllproteine gemacht wurden. Auch in den SDS-PAGEs war keine signifikante Veränderung bei Überexpression einzelner *sec*-Gene erkennbar. Das Fehlen eines Effekts beruht vermutlich auf den bereits zuvor erwähnten Tatsachen, daß einige Komponenten des GSP bei alleiniger Überexpression instabil sind und andere obligat auf andere Bestandteile des GSP angewiesen sind, um ihre Funktion auszuüben. Die Überexpression einzelner *sec*-Gene ist also kein geeignetes Mittel zur Steigerung der Proteinsekretion in *C. glutamicum*.

Auch für die Stämme, welche die Kombinationen *secDF*, *secEDF* und *secYDF* überexprimieren, wurde die Amylase-Aktivität und der Proteingehalt im Kulturüberstand bestimmt. Während die Überexpression von *secDF* die Amylase-Sekretion gegenüber dem Stamm *C. glutamicum* IAmy2 um den Faktor 1,6 steigert, bewirkt die von *secEDF* eine Steigerung um den Faktor 2,2 und die von *secYDF* sogar eine von 2,6. Der Proteingehalt in den Kulturüberständen nimmt in etwa im gleichen Maße zu wie die Amylase-Sekretion. Diese Zunahme kann nicht allein auf die gesteigerte Amylase-Sekretion zurückgeführt werden, da der Proteingehalt im Kulturüberstand von *C. glutamicum* IAmy2 [pSecYDF] mit 15,5 $\mu\text{g/ml}$ fast dreimal so hoch ist, wie der des Stammes *C. glutamicum* [pAmy], der aber die achtfache Menge an Amylase sekretiert. Zusammen mit den Daten, die für die Sekretion der Zellwandproteine gesammelt wurden, ergibt sich daraus, daß die gleichzeitige Überexpression von Komponenten des GSP die Sekretion von Proteinen steigert. Diese Beobachtung wird durch das Wachstumsverhalten der übersekretierenden Stämme auf Stärke als einziger Kohlenstoffquelle bestätigt. Die Wachstumsgeschwindigkeit korreliert mit der Rate der

Amylase-Sekretion, das heißt, der Stamm mit der höchsten Sekretionsrate, *C. glutamicum* IAmy2 [pSecYDF] wächst auch am schnellsten. Unter diesen Bedingungen können die übersekretierenden Stämme die gesteigerte Sekretion in einen direkten Wachstumsvorteil umsetzen.

Eine Steigerung des Proteinexports durch Verstärkung des GSP kann nur erfolgen, wenn die Sekretion des entsprechenden Proteins suboptimal ist. Dies ist unter zwei möglichen Bedingungen der Fall: Erstens, im Zustand der Hypersekretion, das heißt, wenn soviel Exoprotein produziert wird, daß die Exportkapazität der Zellen nicht mehr ausreichend ist um alle Präproteine zu sekretieren. Die zweite Möglichkeit ist, daß das zu sekretierende Protein selbst nicht optimal an den Sekretionsprozeß angepaßt ist, beispielsweise durch eine weniger ideale Signalsequenz. Letzteres ist vermutlich auch bei der Sekretion der heterologen Amylase der Fall, die noch ihre aus *Streptomyces* stammende Signalsequenz besitzt (Cadenas *et al.*, 1996). Diese wird zwar in *C. glutamicum* korrekt prozessiert (Cadenas *et al.*, 1992), ist aber vermutlich nicht ideal für die Sekretion. Durch gleichzeitige Überexpression von *secD* und *secF*, deren Funktion unter anderem die Verstärkung des Exports von Proteinen mit imperfekter Signalsequenz ist (Pogliano & Beckwith, 1994a), wird dieser Mangel möglicherweise ausgeglichen, was zu einer Steigerung der Sekretion des heterologen Proteins führt. Die zusätzliche Steigerung der Amylase-Sekretion, die bei gleichzeitiger Überexpression von *secEDF* und *secYDF* auftritt, beruht vermutlich auf den gegenseitigen, stabilisierenden Effekten, welche die Proteine SecE, SecF und SecY wie zuvor beschrieben untereinander ausüben (Sagara *et al.*, 1994; Matsuyama *et al.*, 1990). Die Sekretion von Exoproteinen läßt sich also nur durch die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen steigern.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, daß der „General Secretory Pathway“ in *C. glutamicum* dem für Gram-positive Bakterien typischen Aufbau entspricht. Mutagenesen in den nicht essentiellen Bestandteilen des GSP führen zu Störungen im Aufbau der Zellwand, betreffen aber nicht alle endogenen Zellhüllproteine in gleicher Weise. Untersuchungen mit dem heterologen Enzym α -Amylase als Reportersystem der Proteinsekretion haben gezeigt, daß die Überexpression von Kombinationen von *sec*-Genen ein geeignetes Mittel darstellen, um die Proteinsekretion in *C. glutamicum* zu steigern.

Weitere Untersuchungen könnten zeigen, wie sich solche Manipulationen am GSP im Stadium der Hypersekretion auswirken oder welche Effekte eine Mutation und Überexpression von Nebenbestandteilen des GSP wie von Chaperonen oder Signalpeptidasen auf die Proteinsekretion in *C. glutamicum* ausüben.

F Literaturverzeichnis

- Altenbuchner, J. & Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 134-138.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 289-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* **25**: 3389-3402.
- Amann, E., Ochs, B. & Abel, K.-J. (1988). Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**: 301-315.
- Anderson, S., Makrs, C. B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymor, S., Light, D., Rastetter, W. & Estell, D. (1985). Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* **230**: 144-149.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. & Zenke, M. (1987). Automated DNA sequencing: Ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acid Res.* **15**: 4593-4602
- Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J & Schwager, C. (1986). A non-radioactive method for DNA sequence determination. *J. Biochem. Biophys. Methods* **13**: 315-323
- Arkowitz, R.A. & Wickner, W. (1994). SecD and SecE are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *EMBO J.* **13**: 954-953.
- Asai, Y., Kobayashi, T. & Yukawa, H. (1994). Gene DNA encoding for translocation machinery of protein. Patent-Nummer: JP6277073.
- Attwood, T. K., Flower, D. R., Lewis, A. P., Mabey, J. E., Morgan, S. R., Scordis, P., Selley, J. & Wright, W. (1999). PRINTS prepares for the new millennium. *Nucleic Acid Res.* **27**: 220-225.
- Bardonnet, N. & Blanco, C. (1991). Improves vectors for transcriptional signal screening in corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**: 97-102.
- Barksdale, L. (1970). *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol. Rev.* **4**: 378-422.
- Bathe, B., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1996). A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 255-265.
- Bayan, N., Schrempp, S., Joliff, G., Leblon, G. & Schechter, E. (1993). Role of the protonmotive force and the state of the Lipids in the in vivo protein secretion in *Corynebacterium glutamicum*, a Gram-positive bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* **1146**: 97-105.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. & Frank, J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain the ribosome-Sec61 complex. *Science* **278**: 2123-2126.
- Béguin, P. & Aubert, J-P. (1992). Cellulases. In: *Encyclopaedia of Microbiology*, S. 467-479. Herausgeber: J. Lederberg, Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Belisle, J. T., Vissa, V. D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P. J. & Besra, G. S. (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422.
- Bhattacharyya, D. & Das, J. (1997). The *secY* gene of *V. cholerae*: identification, cloning and characterisation. *Gene* **196**: 261-266.
- Billman-Jacobe, H., Wang, L., Kortt, A., Stewart, D. & Radford, A. J. (1995). Expression and secretion of heterologous proteases by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1610-1613.
- Billman-Jacobe, H., Hodgson, A. L. M., Lightowers, M., Wood, P. R. & Radford, A. J. (1994). Expression of ovine Gamma Interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1641-1645.

- Blanco, J., Driessen, A. J. M., Coque, J. J. R. & Martín, J. F. (1998).** Biochemical characterisation of the SecA protein of *Streptomyces lividans*: Interaction with nucleotides, binding to membrane vesicles and *in vitro* translocation of proAmy protein. *Eur. J. Biochem.* **257**: 472-478.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277 (5331)**: 1453-1474.
- Bolhuis, A., Broekhuizen, C. P., Sorokin, A., van Roosmalen, M. L., Venema, G., Bron, S., Quax, W. J. & van Dijk, J.M. (1999a).** SecDF of *Bacillus subtilis*, a molecular siamese twin required for the efficient secretion of proteins. *J. Biol. Chem.* **273**: 21217-21224.
- Bolhuis, A., Matzen, A., Hyyrylainen, H. L., Kontinen, V. P., Meima, R., Chapui, J., Venema, G., Bron, S., Freudl, R. & van Dijk, J. M. (1999b).** Signal peptide peptidase- and ClpP-like proteins of *Bacillus subtilis* required for efficient translocation and processing of secretory proteins. *J. Biol. Chem.* **274**: 24585-24592.
- Bonnassie, S., Burini, J. F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J. C. & Sicard, A. M. (1990).** Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2107-2112.
- Bron, S., Bolhuis, A., Tjalsma, H., Holsappel, S., Venema, G. & van Dijk, J. M. (1998).** Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in Bacilli. *J. Biotech.* **64**: 3-13.
- Burkovski, A. (1997).** Rapid detection of bacterial surface proteins using an enzyme-linked immunosorbent assay system. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **34**: 69-71.
- Cadenas, R. F., Fernandez-Gonzales, C., Martin, J. F. & Gil, J. A. (1996).** Construction of new cloning vectors for *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**: 63-68.
- Cadenas, R. F., Gil, J. A. & Martin, J. F. (1992).** Expression of *Streptomyces* genes encoding extracellular enzymes in *Brevibacterium lactofermentum*: secretion proceeds by removal of the same leader peptide as in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 362-369.
- Cadenas, R. F., Martin, J. F. & Gil, J. A. (1991).** Construction and characterisation of promoter probe vectors for Corynebacteria using the kanamycin-resistance reporter gene. *Gene* **98**: 117-121.
- Cardini, G. & Jurtschuk, P. (1970).** The enzymatic hydroxylation of *n*-octane by *Corynebacterium* sp. strain 7EC1C. *J. Biol. Chem.* **245**: 2789-2796.
- Chami, M., Bayan, N., Peyret, J. L., Gulik-Krzywicki, T., Leblon, G. & Schechter, E. (1997).** The S-Layer Protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain. *Mol. Microbiol.* **23**: 483-492.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eigemeier, K., Gas, S, Barry, C.E.3rd, Tekaia, F. Badcock, K., Basham, D., Brown, D., et al (1998).** Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **6685**: 537-544.
- Collins, M. D. & Cummings, C. S. (1986).** Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, S. 1266-1276. Herausgeber: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Collins, M. D. & Jones, D. (1983).** Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov.. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 3545-3548.
- Collins, M. D., Jones, D. & Kroppenstedt, R. M. (1982).** In Validation of the publication of new names and combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 9. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 284-385.
- Crueger, W. & Crueger, A. (1984).** *Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. R. Oldenbourg Verlag, München.
- Damann, T. (1992).** Analyse einer Metalloprotease und ihres Regulators aus *Streptomyces coelicolor* "Müller". Doktorarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld.

- Damann, T. & Wohleben, W. (1992).** A metalloprotease gene from *Streptomyces coelicolor* "Müller" and its transcriptional activator, a member of the LysR family. *Mol. Microbiol.* **6**: 2267-2278.
- Davies, M. J., Gillespie, A. G. J., Vidaver, A.K. & Harris, R. W. (1984).** Clavibacter: a new genus containing some phytopathogenic coryneforme bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. 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.
- den Blaauwen, T. & Driessen, A. M. J. (1996).** Sec-dependent preprotein translocation in bacteria. *Arch. Microbiol.* **165**: 1-8.
- Driessen, A. M. J., de Wit, J. G., Kuiper, W., van der Wolk, J. P. W., Fekkes, P., van der Does, C., van Wely, K., Manting, E. & den Blaauwen, T. (1995).** SecA, a novel ATPase that converts chemical energy into a mechanical force to drive precursor protein translocation. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 981-985.
- Duong, F. & Wickner, W. (1997a).** Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* **10**: 2756-2768.
- Duong, F. & Wickner, W. (1997b).** The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.* **16**: 4871-4879.
- Duong, F. & Wickner, W. (1998).** Sec-dependent membrane protein biogenesis: SecYEG, preprotein hydrophobicity and translocation kinetics control the stop-transfer function. *EMBO J.* **17**: 696-705.
- Eckhardt, T. (1978).** A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Economou, A. (1998).** Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol. Microbiol.* **27**: 511-518.
- Economou, A. (1999).** Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends in Microbiol.* **7**: 315-319.
- Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B. & Wickner, W., (1995).** SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecE. *Cell* **83**: 1171-1181.
- Economou, A. & Wickner, W. (1994).** SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**: 835-843.
- Eichler, J. & Wickner, W. (1997).** Both an N-terminal 65 kDa domain and a C-terminal 30 kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 5574-5581.
- Eikmanns, B., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahn, H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M. O., Schekman, R. & Kepes, F. (1994).** SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J. Biol. Chem.* **269**: 27478-27485.
- Fath, M. J. & Kolter, R. (1993).** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**: 995-1017.
- Fekkes, P., de Witt, J. G., van der Wolk, J. P. W., Kimsey, H. H., Kumamoto, C. A. & Driessen, A. J. M. (1998).** Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol. Microbiol.* **29**: 1179-1190.
- Fekkes, P. & Driessen, A. J. M. (1999).** Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 161-173.
- Flower, A. M., Hines, L. L. & Pfennig, P. L. (2000).** SecG is an auxiliary component of the protein export apparatus of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 131-136.
- Forsberg, A., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (1994).** Regulation and polarized transfer of the *Yersinia* outer proteins (Yops) involved in antiphagocytosis. *Trends Microbiol.* **2**: 14-19.
- Freudl, R. (1992).** Protein secretion in gram-positive bacteria. *J. Biotechnol.* **23**: 231-240.
- Galan, J. E. (1996).** Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**: 263-271.

- Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. & Beckwith, J., (1990).** The secD locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **16:** 3209-3216.
- Gish, W. & States, D. J. (1993).** Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3:** 266-272.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U. & Rapaport, T. A. (1992)** A mammalian homolog of Sec61p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71:** 489-503.
- Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. & Beckwith, J., (1990).** The secD locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **16:** 3209-3216.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87:** 4645-4649.
- Hanada, M., Nishiyama, K. & Tokuda, H. (1996).** SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. *FEBS Lett.* **381:** 25-28.
- Harris, C. R. & Silhavy, T. J. (1999).** Mapping an interface of SecY (PrfA) and SecE (PrfG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J. Bact.* **181:** 3438-3444.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. & Rapaport, T. A. (1994).** Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367:** 654-657.
- Heilig, R. (1999).** *Pyrococcus abyssi* genome sequence: insights into archeal chromosome structure and evolution. GenBank AJ 248288.
- Herbort, M., Klein, M., Manting, E. H., Driessen, A. J. M. & Freudl, R. (1999).** Temporal expression of the *Bacillus subtilis* secA gene, encoding a central component of the preprotein translokase. *J. Bact.* **181:** 493-500.
- Hermann, T., Wersch, G., Uhlemann, E. M., Schmid, R. & Burkovski, A. (1998).** Mapping and identification of *Corynebacterium glutamicum* proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis* **19:** 3217-3221.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkel, E., Li, B. C. & Herrmann, R. (1996).** Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acid Res.* **24:** 4420-4449.
- Homma, T., Yoshihisa, T. & Ito, K. (1997).** Subunit interactions in the *Escherichia coli* protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Lett.* **408:** 11-15.
- Ish-Horowitz, D. & Burke, J. F. (1981).** Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Res.* **9:** 2989-2998.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G. & Wohleben, 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.
- Joliff, G., Guyonvarch, A., Reyano, P., Leblon, G., Duchiron, F. & Renaud, M. (1993a).** System for protein expression and secretion especially in corynebacteria. Patent-Nummer: *WO 9303158*.
- Joliff, G., Hahn, V., Duchiron, F., Renaud, M. & Leblon, G. (1993b).** Expression and secretion system in a *Corynebacterium*. Patent-Nummer: *FR 2679922*
- Joliff, G., Mathieu, L., Hahn, V., Bayan, N., Duchiron, F., Renaud, M., Shechter, E. & Leblon, G. (1992).** Cloning and nucleotide sequence of the *cspI* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex. *Mol. Microbiol.* **6:** 2349-2362.
- Jones, J. D. G., Grady, K. L., Suslow, T. V. & Bedbrook, J. R. (1986).** Isolation and characterisation of genes encoding two chitinase enzymes of *Serratia marcescens*. *EMBO J.* **5:** 467-473.
- Kalinowski, J. (1990).** Die Genregion für Aspartokinase und Aspartat- β -Semialdehyd-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Universität Bielefeld.
- Kaneko, T., Tanaka, A., sato, S., Kotani, H., Sazuka, T., Miyajima, N., Sugiura, M. & Tabata, S. (1995).** Sequence analysis of the genome of the unicellularcyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* **2:** 153-166.

- Kappes, R. M. & Freudl, R. (2000).** The protein secretion machinery in Gram-positive bacteria: The SecDF protein as a limiting factor for protein secretion in *Staphylococcus carnosus*. In: *Biospektrum, Sonderausgabe zum I. gemeinsamen Kongress der GGHM, ÖGHMP und VAAM: "Microbiology 2000"*, S. 187.
- Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A. S. & Economou, A. (1999).** A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol. Microbiol.* **34**: 1133-1145.
- Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T. & Furuya, A. (1984).** Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**: 306-311.
- Kaufmann, A., Manting, E. H., Veenendaal, A. K., Driessen, A. J. M. & van der Does, C. (1999).** Cysteine-directed cross-linking demonstrates that helix 3 of SecE is close to helix 2 of SecY and helix 3 of a neighbouring SecE. *Biochemistry* **38**: 9115-9125.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993).** Isoleucin synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.
- Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S. & Mizushima, S. (1991).** Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **10**: 6600-6606.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimono, M. (1957).** Amino Acid Fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Kirchner, O. (1999).** Hocheffizienter Elektrottransfer von Plasmiden nach *Corynebacterium glutamicum* und Entwicklung von Vektorsystemen zur funktionellen Genomanalyse. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld.
- Kobayashi, M., Fugono, N., Asai, Y., Inui, M., Vertès, A.A., Kurusu, Y. & Yukawa, H. (1994).** Cloning and sequencing of the *secY* homolog from coryneform bacteria. *Gene* **139**: 99-103.
- Kobayashi, M., Fugono, N., Asai, Y. & Yukawa, H. (1999).** Cloning and nucleotide sequencing of the *secA* gene from coryneform bacteria. *Gen. Anal. Biomol. Eng.* **15**: 9-13.
- Kontinen, V. P., Yamanaka, M., Nishiyama, K. & Tokuda, H. (1996).** Roles of the conserved cytoplasmic region and non-conserved carboxy-terminal region of SecE in *Escherichia coli* protein translocase. *J. Biochem. (Tokyo)* **119**: 1124-1130.
- Klüpfel, D. (1988).** Screening of prokaryotes for cellulose- and hemicellulose-degrading enzymes. *Methods Enzymol.* **160**: 184-192.
- Kunioka, E., Matsuyama, S. & Tokuda, H. (1998).** Cloning and expression of the *secA* gene of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, and analysis of its function in *Escherichia coli*. *Gene* **216**: 303-309.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevdo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A. et al. (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390 (6657)**:249-256.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-658.
- Lee, C. W., Lucas, S. & Desomaceaud, M. J. (1985).** Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 201-205.
- Lehninger, A. L. (1987).** Biochemie. S. 214-216. Verlag Chemie; Weinheim, Basel.
- Leloup, L., Driessen, A. J. M., Freudl, R., Chambert, R. & Petit-Glatron, M., F. (1999).** Differential dependence of levansucrase and alpha-amylase secretion on SecA (Div) during the exponential phase of growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **181**: 1820-1826.
- Leuchtenberger, W. (1984).** Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren. *Chemie für Labor und Betrieb* **6**: 285-287.
- Lichtinger, T., Burkowski, A., Niederweis, M., Kramer, R. & Benz, R., (1998).** Biochemical and Biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry* **37**: 15024-15032.

- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. & Schleifer, K. H. (1991). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**: 299-303.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 255-260.
- Liebl, W., Schleifer, K. H. & Sinskey, A. J. (1989). Secretion of heterologous proteins by *Corynebacterium glutamicum*. In: *Genetic transformation and expression*. S. 323-327. Herausgeber: L. O. Butler, C. Harwood & B. E. B. Moseley, Intercept Ltd., Andover, U. K..
- Liebl, W. & Sinskey, A. J. (1990). Coryneform expression and secretion system. Patent-Nummer: US 4965197.
- Liebl, W. & Sinskey, A. J. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene involved in the production of extracellular DNase by *Corynebacterium glutamicum*. In: *Genetics and Biotechnology of Bacilli*. S. 383-388. Herausgeber: A. T. Ganesan & J. A. Hoch, Academic Press; New York.
- Liebl, W., Sinskey, A. J. & Schleifer, K. H. (1992). Expression, Secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bact.* **174**: 1854-1861.
- Lill, R., Dowhan, W. & Wickner, W., (1990). The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor protein. *Cell* **60**: 259-269.
- Lottspeich, F. (1999). Proteomanalyse- ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. *Angew. Chem.* **111**: 2603-2647.
- Manting, E. H., van der Does, C. & Driessen, A. J. M. (1997). In vivo cross-linking of the SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Bact.* **179**: 5699-5704.
- Manting, E. H., van der Does, C., Remigy, H., Engel, A. & Driessen, A. J. M. (2000). SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.* **19**: 852-861.
- Marienfeld, A., Uhlemann, E.-M., Schmid, R., Krämer, R. & Burkowski, A. (1997) Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 291-297.
- Martin, J. F. (1989). Molecular genetics of amino acid-producing bacteria. In *Society of general Microbiology Symposium*. S. 25-59. Herausgeber: S. Baumberg, I. Hunter & M. Rhodes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Matsuyama, S., Akimaru, J. & Mitzushima, S. (1990) SecE dependent overproduction of secY in *Escherichia coli*. Evidence for an interaction between two components. *FEBS Lett.* **269**: 69-100.
- Matsuyama, S., Fujita, Y. & Mitzushima, S. (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **12**: 265-270.
- Matsuyama, S., Fujita, Y., Sagara, K. & Mitzushima, S. (1992). Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1122**: 77-84.
- McPherson, R. A. (1995). Evolution of polymerase chain-reaction to a quantitative laboratory tool. *Clinical chemistry* **41**: 1065-1067.
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J. & Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.* **175**: 2131-2136.
- Meyer, T. H., Menetret, J. F., Breitling, R., Miller, K. R., Akey, C. W. & Rapaport, T. A. (1999). The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eucaryotic Sec61p complex. *J. Mol. Biol.* **285**: 1789-1800.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Mitchell, C. & Oliver, D. (1993). Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.* **10**: 483-497.

- Miwa, K., Matsui, K., Terabe, M., Ito, K., Ishida, M., Takagi, H., Nakamori, S & Sano, K. (1985). Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **39**: 281-286.
- Morinaga, Y., Tsuchiya, M., Miwa, K. & Sano, K. (1987). Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using shuttle vector pEB77003. *J. Biotechnol.* **5**: 305-312.
- Morosoli, R., Ostiguy, S. & Dupont, C. (1999). Effect of carbon source, growth and temperature on the expression of the *sec* genes of *Streptomyces lividans* 1326. *Can. J. Microbiol.* **45**: 1043-1049.
- Myers, G. & Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *CABIOS* **4**: 11-17.
- Nagarjan, V. (1993). Protein secretion. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive bacteria. S. 713-726. Herausgeber: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losik, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Nishiyama, K-I., Suzuki, T. & Tokuda, H. (1996). Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**: 71-81.
- Nishiyama, K-I., Hanada, M. & Tokuda, H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**: 3272-3277.
- Odgen, R. C. & Adams, D. A. (1987). Electrophoresis in agarose and acrylamid gels. *Methods Enzymol.* **152**: 61-87.
- Ogata, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. & Aida, K (1976). "Microbial production of nucleic acid related substances", New York, Weinheim.
- Palva, I. (1989). Engineering for secretion of proteins by bacteria. In: *Society for General Microbiology. Symposium 44. Microbial Products: New Approches*. S. 255-270. Herausgeber: S. Baumberg, I. Hunter & M. Rhodes, Cambridge University Press, Cambridge.
- Paradis, F. W., Warren, R. A. J., Kilburn, D. G. & Miller jr., R. C. (1987). The expression of *Cellulomonas fimi* cellulase genes in *Brevibacterium lactofermentum*. *Gene* **61**: 199-206.
- Pátek, M., Eikmanns, B. J., Patek, J & Sahm, H. (1996). Promoters from *Corynebacterium glutamicum* : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology* **142 (Pt 5)**: 1297-1309.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Peyret, J. L., Bayan, N., Joliff, G., Gulik-Krzywicki, T., Mathieu, L., Shechter, E & Leblon, G. (1993). Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **9**: 97-109.
- Pogliano, J. A. & Beckwith, J. (1994a). SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **13**: 554-561.
- Pogliano, K. J. & Beckwith, J. (1994b). Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli secD* operon and its products. *J. Bact.* **176**: 804-814.
- Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711-753.
- Pugsley, A. P. (1993): The complete general protein secretory pathway in gram negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
- Redenbach, M., Kiesner, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D. A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96.
- Sagara, K., Matsuyama, S. & Mizushima, S. (1994). SecF stabilizes SecD and SecY, components of the protein translocation machinery of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J. Bact.* **176**: 4111-4116.
- Salim, K., Haedens, V., Content, J., Leblon, G & Huygen, K. (1997). Heterologous expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding Antigen 85A in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4392-4400.
- Salmond, G. P. C. & Reeves, P. J. (1993). Membrane traffic wardens and protein secretion in gram negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 7-12.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour.
- Sandmann, G. (1994).** Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* **223**: 7-24.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santamaria, R., Gil, J. A., Mesas, J. M. & Martin, J. F. (1984).** Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2237-2246.
- Schiebel, E., Driessen, A. J. M., Hartl, F.-U. & Wickner, W. (1991).** $\Delta\mu_{H^+}$ and ATP function at different steps off the catalytic cycle off preprotein translocase. *Cell* **64**: 927-939.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H. & 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., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1994a).** Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergenic matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 756-759.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994b).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selections of defined deletion in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schatz, P. J., Riggs, P. D., Annick, J., Fath, M. J. & Beckwith, J. (1989).** The SecE gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3**: 1035-1044.
- Schwarzer, A. & Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnology (N Y)* **9**: 84-87.
- Shiozuka, K., Mitzushima, S. & Tokuda, H. (1990).** The proton motive force lowers the level of ATP required for the *in vitro* translocation of a secretory protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 18843-18847.
- Siefert, J. L., Martin, K. A., Abdi, F., Widger, W. R. & Fox, G. E. (1997).** Conserved gene clusters in bacterial genomes provide further support for the primacy of RNA. *J. Mol. Evol.* **45**: 467-472.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 748-794.
- Sleytr, U. B. (1997).** Application of S-Layers. *FEMS Microb. Rev.* **20**: 151-175.
- Sleytr, U. B. & Beveridge, T. J. (1999).** Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology* **7**: 253-260.
- Sleytr, U. B. & Sara, M. (1997).** Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological application. *Trends Biotechnol.* **15**: 20-26.
- Smith, M. D., Flickinger, J. L., Lineberger, D. W. & Schmidt, B. (1986).** Protoplast transformation and introduction of an α -amylase gene from *Bacillus amyloliquifaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 634-639.
- Southern, E. M. (1995).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Stackebrand, E. & Woese, C. R. (1981).** The evolution of prokaryotes. In *Molecular and cellular aspects of microbial evolution*, S. 1-31. Herausgeber: M. J. Carlile, J. F. Collins & B. E. B. Moseley. Cambridge University Press, Cambridge.
- Staden, R. (1986).** The current status and portability of our sequence handling software. *Nucleic Acid Res.* **14**: 217-231.
- Suzuki, H., Nishiyama, K-I. & Tokuda, H. (1998).** Coupled structure change of SecA and secG revealed by the synthetic lethality of the *secAcsR11* and Δ *secG::kan* double mutant. *Mol. Microbiol.* **29**: 331-341.
- Suzuki, T., Honda, H. & Katsumata, R. (1972).** Production of antimicrobial compounds analogous to chloramphenicol by *n*-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2223-2228.

- Tauch, A. (1996).** Entwicklung von Transposonmutagenesensystemen für Aminosäure-produzierende Corynebakterien. Doktorarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld.
- Tauch, A., Kirchner, O., Wehmeier, L., Kalinowski, J. & Pühler, A. (1994).** *Corynebacterium glutamicum* DNA is subjected to methylation-restriction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 343-347.
- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A. & Kalinowski, J. (1998).** *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon TN5564: Genetic organisation and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* **40**: 126-139.
- Tschauder, S., Driessen, A. J. & Freudl, R. (1992).** Cloning and molecular characterization of the *secY* genes from *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus carnosus*: comparative analysis of nine members of the SecY family. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 147-152.
- Tusnády, G. E. & Simon, I. (1998).** Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Applications to topology prediction. *Journal of Molecular Biology* **283**: 489-506.
- Ugorcakova, J., Jucovic, M., Bukovska, G. & Timko, J. (1996).** Construction and characterization of new corynebacterial plasmids carrying the alpha-amylase gene. *Folia Microbiol. (Praha)* **41**: 10-14.
- Vahjen, W., Munch, J.-C. & Tebbe, C. C. (1995).** Carbon source utilization of soil extracted microorganisms as a tool to detect the effects of soil supplement with genetically engineered and non-engineered *Corynebacterium glutamicum* and a recombinant peptide at the community level. *FEMS Microb. Ecol.* **18**: 317-328.
- Vigal, T. Gil, J. A., Daza, A., García-González, M. D. & Martín, J. F. (1991).** Cloning, characterisation and expression of an α -amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 278-288.
- von Heijne, G. (1994).** Membrane proteins: From Sequence to structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 167-192.
- von Heijne, G. (1997).** Getting greasy: how transmembrane polypeptide segments integrate into lipid bilayer. *Mol. Microbiol.* **24**: 249-253.
- Wallace, D. M. (1987).** Precipitation of nucleic acids. *Methods in Enzymology* **152**: 41-48.
- West, S. C., Baumann, P. & Benson, F. (1997).** Protein-directed molecular interactions in recombination and repair. *Mutation research* **379**: S55.
- Wehmeier, L. (1999).** Molekulargenetische Analyse der "stringenten Kontrolle" in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation. Universität Bielefeld.
- Wehmeier, L., Schäfer, A., Burkowski, A., Krämer, R., Mechold, U., Malke, H., Pühler, A. & Kalinowski, J. (1998).** The role of *Corynebacterium glutamicum rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiology* **144**: 1853-1862.
- Wild, J., Rossmeissl, P., Walter, W. A. & Gross, C. A. (1996).** Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **178**: 3608-3613.
- Wild, J., Walter, W. A., Gross, C. A. & Altman, E. (1993).** Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *J. Bact.* **175**: 3992-3997.
- Wohleben, ., Muth, G. & Kalinowski, J. (1993).** Genetic engineering of Gram positive bacteria. In *Biotechnology*, S. 457-505. Herausgeber: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler & P. Stadler.
- Worley, K. C., Wiese, B. A. & Smith, R. F. (1995).** BEAUTY: an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome Research* **5**: 173-184.
- Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. & Aida, K. (1972).** The microbial production of amino acids. New York, Weinheim.
- Yamada, Y., Won Seo, C. & Okada, H. (1985).** Oxidation of acyclic terpenoids by *Corynebacterium* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 960-963.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Erfle, H., Stucky, K., Kirstensen, T & Ansorge, W. (1990).** A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. *Nucleic Acid Res.* **18**: 1067.

G Anhang

1) Häufig verwendete Abkürzungen

μ	Mikro	Km	Kanamycin
μF	Mikrofarad	l	Liter
Ap	Ampicillin	LB	Luria-Bertani-Medium
As	Aminosäure	M	Molar
ATCC	American Type Culture Collection	mcs	multiple cloning site
ATP	Adenosintri-phosphat	mg	Milligramm
bp(s)	Basenpaar(e)	min	Minute
BPB	Bromphenol-Blau	N	Normal
Cm	Chloramphenicol	oD	optische Dichte
(k)Da	(Kilo)Dalton	ORF	offenes Leseraster
Dig	Digoxigenin	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DTT	Dithiotreitol	r	Resistenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RBS	Ribosomen-Bindestelle
Eppi	Eppendorf-Reaktionsgefäß	RNA	Ribonucleinsäure
EtBr	Ethidium-Bromid	RT	Raumtemperatur
EtOH	Ethanol	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
g	Gramm	sec	Sekunde
rpm	Umdrehungen pro Minute	SSC	Standard-Saline-Citrat
GC	Guanin + Cytosin	Tris	Trishydroxyaminomethan
GSP	General secretory pathway	Tet	Tetracyclin
h	Stunde	U	Unit, Volumenaktivität
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	ü/N	über Nacht
kb	Kilobasenpaare	Xgal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galaktosid

2) Sequenzdaten

DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz potentieller ORFs des "Plasmid-Rescues"

```

- - P R Y S A D Q L E L S D F T A T E
>f.1.18tccgcgttattccgcagatcaattagaactcagcgatttcaccgctactgagc 60

Q A V W I R C T A D L P D N P T F H Q C
aagctgtgtggattcgggtcaccgctgatcttccggataatcccaccttcaccagtgct 120

S L T Y L S D M T L L H S A L V P H P G
cactgacttatctgtccgatatgactttgctgcatagtgccctggtgccacaccagggtg 180

E K M Q M A S L D H A V W F L R P F R V
agaaaatgcagatggcctcacttgatcacgctgtgtggttcctgcgtcccttccgcgctc 240

D E W L L Y D Q R S P S A S S G R A L T
atgaatgggtgctttatgatcagcgtctccatcggcctcaagtgggagccttgactc 300

H G R L F N Q Q G D L V A I V N Q E G M
acggggcggttttcaaccagcaggagatttggtcgctattgtcaatcaagagggaatga 360

T R T L H E G A Q S I P M R K D *
cccgcacactccacgaggggtgcgcaatcaattccgatgcgcaaagactaaaatgcagcga 420

acttgaagatctgaatccggtaacgcgcagaaaattgggtgccctttaagtttcatcattt 480

gaccttggcgtatactgtttcatcagttccaactaccaactccgtttccatggaagctac 540

ccggctttcgcaccgcaacatgagtctaaaatattaacacggcgcaccacacatttggt 600

ggtgtattgagctatctctgggctgcggtgagaaaccattttccggtggatgatggaagct 660

M S G H S K W A T T K H K K
agacgacgaaaggagcatatgtctggccactcaaaatgggcgactaccaagcacaagaa 720

A A N D A K R G K E F A K L I K N I E V
ggctgctaacgacgccaagcgaggcaaggaatttgccaagctgatcaagaacatcgaagt 780

A A R T G G G D P S A N P T L D D M I K
tgcggcacgtacagcggtggagatccgtctgcaaccaacgcttgatgacatgatcaa 840

K A K K A S V P N D N I E R A R K R G S
gaaagccaagaaggcttctgtgccaacgataaacatcgaacgtgcacgcaagcgtggctc 900

G E E A G G A D W M N I M Y E G Y G P N
cggcgaagaagctggtggcgtgactggatgaacatcatgtacgagggatacggcccaa 960

G V A M L I E C L T D N R N R A A T E V
cggcgttgcattgatctcagagtgtctgaccgacaaccgtaaccgcgcagctaccgaagt 1020

R T A M T K N G G N L G E S G S V S Y M
tcgcaccgcaatgacccaaaacggtggcaacttgggagctccggttccggtgcctacat 1080

F T R T G V V T V Q K G D L S E D D V L
gttcaccgcaccggtgtcgtcaccgtacaaaagggcgatcttagtgaagatgacgtgct 1140

M A V L E A G A E E V N D N G D L F E V
catggctgttcttgaagctgggtgctgaagaagtcaacgacaacggcgatctgttcgaggt 1200

T C A P T D I V A V R D A I V E A G I E
tacctgcgcaccaactgacattgtagctgttcgcgacgcaatcgtggaagctggcattga 1260

V E D S E S D F R A S V Q V P L D A D G
agtagaagattctgaatcagacttccgggcatctgttcagggtccccctggacgctgacgg 1320

A R K I F K L V D A L E D S D D V Q N V
tgcaacgcaagatcttcaagcttggagcgcgttgggaagattccgacgatgtgcaaacgt 1380

Y T N I D L S D E V L T E L E N D *
ctacaccaacatcgacttgagcgtatgaggttttgacagagctggaaaacgactagttcgt 1440

atthtccgcactccggttcccccgtatccctgcagctaaaacgcagaggatagcgggggt 1500

gatcgcaattgtgtgctaaaaatgagatggaatagcaactgcacagcgacgaatcagcg 1560

```

tesB2
(part.)

yfcA

M N H E G L R V M G I D P
 acgaatcagtgaggacacgaata**atga**accacgaagggtctcgggtaatgggcattgaccc 1620
 G L T R C G L S V V Q A G R G R T V Y P
 aggtccttaccggttggtgcttatctgtggttcaagcaggtcgtggtcgtaccgtgtatcc 1680
 V S V G V V R T P P D A E L A E R L L R
 agtgcgggtgggctggtgcgcacccaccagatgaggatggtggcgagcggttgcctcg 1740
 L S K A V G E W M D E Y T P D V I A I E
 gctcagcaaaagcagtggtgagtgatgagtagtacacccagatgctcattgctattga 1800
 R V F E R G N V S T V M N T A H A V G V
 gcgtgctcttgagcgcggaaatgtttccaccgtagtaaacactgcgcagatcggtgggtgt 1860
 L I L A A A E R G L P V H M Y T P S E V
 gttgatcttggtgctgctgaacgcggattgccagttcacatgtacaccccgatgaggt 1920
 K K A I S G N G R A D K K Q M T V M I T
 gaaaaaggctatctccggtaatggtgcgcgctgataagaaacagatgacggtcatgatcac 1980
 R I L G L G E P P K P A D A A D A L S L
 tcgaattctgggcttggtgagccacccaacctgctgacgcgctgatgctttatcggt 2040
 A V C H C W R A P M L M R A Q S Q Y S E
 ggcgggtggtcactgctggcgggccaatgcttatgcggcgcaatcgcagtaactccga 2100
 Q E L E K R R R V Q Q G K L G K A K S T
 gcaagagttgaaaaagcagcggcgtgtgcagcaagaaaattgggtaaaagcgaatcaac 2160
 Y N A E Q A Q S H A S D P A K A A H P S
 ttacaatgcggaacaagctcaatcccagatcctgctaaagcggctcatcccag 2220
 Q F Q R T D T N *
 tcagtttcaacgaactgacaccaattagtttttaaaaagttctagtagtatttttcaggag 2280
 M I A S L R G T V I N I G L S S A V
 tgtcttcatgaattgcctcacttgcgtggcactggttatcaacattggtctgagctctgctgt 2340
 I E C N G V G Y E V V T T P N T L S Q L
 cattgaatgcaatggcgtgggctatgaggtgtcaccacaccgaacacctgtcacagtt 2400
 V R G E E A L V L T T M V V R E D A M K
 ggtccgcggtgaggaagcactggtggtgaccaccatggtggtccggaagacgcgatgaa 2460
 L Y G F I D N E S R E M F S V L Q T V S
 actctatgggtttattgacaatgaatcacgtgagatggtttccggtgtgcaaacagtatc 2520
 G L G P R L A L A C E S V L S P L E I S
 tggattgggtccacgcctggccttggcatgtgaatcggtgttgagcccactggagatttc 2580
 Q A I T N A D A K T L Q R V P G V G K R
 tcaggcagatcaccaatgccgatgcaaaaactttgcagcgggttccgggtgtgggaagcg 2640
 M A D R L I V E L K G K V A A F A A G V
 catggcagatcgtctcatcgtggagcttaaaaggcaaggtcgcagcttttctgctgcccgtgt 2700
 V D E G G E Q I S L P N A N I A S E V V
 cgtggatgaggggagggagcaaatctccttgcctaacgcgaacattgcttctgaggtggt 2760
 V E Q V S Q A L V G L G F S E K Q S D D
 tgtggagcaggtttctcaagcgtggtggggttgggcttagcgagaagcaatcagatga 2820
 A V S F V L A A D P S L D T S G A L R A
 tgcagtgagctttgtgctggcggcgatccatccttgacaccagtgccgcgcttctgctgc 2880
 A L A K L S G K * M S D V E R T E F
 cgcattggcaaaactcagcggaaagtagaccctc**atg**tccgatgtggaaagaacagagtt 2940
 E I P G G F H L V E T V V K A V A A D T
 tgaaattccgggaggttccacctcgtcgaacgggtggtcaaggcgtgcagctgatacc 3000
 N V D A N L K P D E Y D A E V T L R P K
 aacgtagatgcgaacctgaagcctgatgaatacagatgcggaagtaaacacttctgcccgaag 3060
 S L T E F I G Q P K V R D Q L S L V L T
 tctttgactgagtttatcggccagccgaaggtgcgcgatcagcttagtttgggtgcttacc 3120
 G A K N R G V V P D H V L L S G P P G L
 ggtgcgaaaaacgggtggttcccgatcacgtgtgtgtgctggccctcctggcctg 3180
 G K T T M A M I I A Q E L G T S L R M T

*ruvC**ruvA*

ggtaagaccacccatggcgatgattatcgcccaggagtgggaccagtttgcgtatgacc 3240
 S G P A L E R A G D L A A M L S N L M E
 tcaggcccagccttggaaacgcgcaggcgatctggctgccatgctgtccaacctcatggaa 3300
 G D V L F I D E I H R I A R P A E E M L
 ggggacgtgctgtttattgatgagattcaccgcatcgcacgctcctgccgaggaaatgctg 3360
 Y M A M E D F R I D V I V G K G P G A T
 tacatggcgatggaagatttccggatcgatgtcatcgtcggtaagggctcctggcgctacc 3420
 S I P L E I P P F T L V G A T T R S G M
 tcaatcccgcctggagatcccaccctttaccctcgttggcgcaaccaccaggtcgggcatg 3480
 L T G P L R D R F G F T A Q M E F Y D V
 ctcaacggcccactgctgaccgtttcggttttaccgcgagatggaattctacgatgtg 3540
 P D L T K V V K R T A K I L D V G I D N
 cctgatctgaccaaagtggtgaaacgaacagctaagatcctcgtatgctcggaatcgacaac 3600
 D A A V E I A S R S R G T P R I A N R L
 gatgccgcgctggaattgcctcgcggtctcgtgggtactcctcgtattgctaaccgactg 3660
 L R R V R D F A E V H A D G H I T M G A
 cttcgtcagtcctgacttcgctgaagtcatcgggatggtcacatcacgatgggtgct 3720
 A N A A L D V F D V D E V G L D R L D R
 gccaatgctgctggatgtattcgtatgctgatgaagtcggactcgtcgcctggatagg 3780
 A V L D A L I R G H G G G P V G V N T L
 gcagtgcttgatgccttgatccgcgacatggcggaggccctgtggcgtgaacacactc 3840
 A V A V G E E P G T V E E V C E P Y L V
 gcggttgacgttggtaagaacccggcactgtggaagaagtatgcgagcctatttgggtg 3900
 R A G M I A R T G R G R V A T A A A W R
 cgtgccggcatgatgacgaaccggacggggacgcgtggcaaccgcagctgcatggaga 3960
 H L G L E P P E G T I G D Y *
 cacctggggctggaaccaccagaaggcaccatcggcgattattagccaccttaggtggcc 4020
 M D I V F L I I L
 aggatgttccatggctcggcaactaactaaccatggacatcgttttccataattctt 4080
 L A I F I V P T F L M S R R Q R A R M T
 ctagccatttttctcgttcccactttcctcatgagccgcgcccagcgcgcacggatgact 4140
 E I Q K L Q D S V V P G D R I V T T A G
 gaaatccaaagctgcaggactctgtcgtcccaggcagcgcacgtcaccaccgcggga 4200
 Q H A T V I S T T A E T V D L E I A P G
 cagcagcgaacggctatttccaccactgcagaaaccgttgatctagagatcgcgcccgggt 4260
 M I S T F E K L A I V R V L S K A N E P
 atgatcagcacttttgaagccttgctatcgtgctgctgctccaaggccaatgaacct 4320
 Q M L D E P T L F D Q P E D D Q P N D G
 cagatgttgatgagccgacgctgttgatcagccagaagacgatcagccgaacgatggt 4380
 F D G R T D G H P E N R *
 ttcgatggacgcactgacggacatcctgagaatcgttagaattaataataattcagcac 4440
 ccttttgctcattactttctgtggcaagggctgctgtttatatatctactcatattggta 4500
 gccagactcacaggggtatgggaaggcaaaactacgcagatggcgttagcatgttttgggt 4560
 taaacactatcccgaaggcaccgttactttgcctttctcgtcgtgctgcactcaccac 4620
 gccacctggcggtgggtgagtgccgatggagtggtggcgctgacaagcgtgggtgtct 4680
 M A R Q K K S A A S A
 ggttgattggaattgaaggagactttcttggctcggcaaaaaagagtgcgctagcgcc 4740
 W E R W P K R A I A L F V L I V V G V Y
 tgggaacgatggcaaaacgcgcaatagcgttggttgtgctcatcgtcgttgggtttat 4800
 A L V L L T G D R S A T P K L G I D L Q
 gcgttgggtgctgtgacagggcatcgttctgccacacaaaattgggtattgatctgcaa 4860
 G G T R V T L V P Q G Q D P T Q D Q L N
 ggcggaaccgagtgacctcgtgccgcaggggagggatccaactcaggaccagctgaat 4920
 Q A R T I L E N R V N G M G V S G A S V

*ruvB**ORF 6*

caggcaccgacattctggaacacccgtgtgaacggcatggcggtttcaggtgcaagcgtg 4980
 V A D G N T L V I T V P G E N T A Q A Q
 gtcgctgacggtaaacgctggatcactgttcccggggaaaataccgcacagggcga 5040
 S L G Q T S Q L L F R P V G Q A G M P D
 tccttaggacagacctcccagctgctgttccgctccggtgggtcagggcaggaatgcccgat 5100
 M T T L M P E L E E M A N R W V E Y G V
 atgaccacgttgatgccagagctggaagagatggccaacaggtgggttgaatacggcgtc 5160
 I T E E Q A N A S L E E M N T A V A S T
 atcaccgaagagcaggcaaatgcctccttggaggaaatgaacaccgctgttgcacgcacc 5220
 T A V E G E E A T E P E P V T V S A T P
 actgcggtggaaggcgaagaagcaactgagccagaacccgctcaccgtgtcggcgaccct 5280
 M D E P A N S I E A T Q R R Q E I T D M
 atggatgagccagccaactccattgaggcaacacagcgacgcccaggaaatcacggacatg 5340
 L R T D R Q S T D P T V Q I A A S S L M
 ctgcgccaccgaccgaccagtcaccgatcccactgtccagatcgctgcaagttccttgatg 5400
 Q C T T D E M D P L A G T D D P R L P L
 cagtgcaccactgatgagatggatcctttggccggcaccgatgatccacgcctgccattg 5460
 V A C D P A V G G V Y V L D P A P L L N
 gtggcatgtgatccagctgtaggtggcgtgtatgtacttgatcctgcacctttgctcaac 5520
 G E T D E E N G A R L T G N E I D T N R
 ggcgaaaccgatgaggaaaatgggtgcgcgcctaaccggtaatgagatcgataccaaccgt 5580
 P I T G G F N A Q S G Q M E I S F A F K
 cccatcaccgggtgattcaacgccagtcggccagatggaaatcagctttgccttcaaa 5640
 S G D G E E G S A T W S S L T S Q Y L Q
 tccggcgatggggaagaaggctctgcaacttggctcctctctgaccagccagctacctgcag 5700
 Q Q I A I T L D S Q V I S A P V I Q S A
 cagcagatcgccatcaccctggactctcaggtgatcttctgcaccctgattcagtcagca 5760
 T P V G S A T S I T G D F T Q T E A Q D
 acccctgtgggttctgcaacatccatcaccgggtgacttcaactgaagccaagat 5820
 L A N N L R Y G A L P L S F A G E N G E
 ctggcgaacaacctgcgctacggatgcatgccccctgagcttcgcaggtgaaaacggcgag 5880
 R G G T T T V P P S L G A A S L K A G
 cgcggcggaactaccaccaccggtccgcgatcactaggcgcagatccttgaaggccgga 5940
 L I A G I V G I A L V A I F V F A Y Y R
 ctgatcgcaggcatcgctcggcatcgcgctggctgccatcttcgtgttcgcctactaccgc 6000
 V F G F V S L F T L F A A G V L V Y G L
 gtcttcggattcgtttccctggtcaccctgtttgcccagggcgtgttggtctacggcctt 6060
 L V L L G R W I G Y S L D L A G I A G L
 ctggtactgctgggacgctggatcgatattccctagaccttgcgtggtatcgccggtttg 6120
 I I G I G T T A D S F V V F Y E R I K D
 atcatcggatcgttaccaccgagctccttgcgtggtgttctatgagcgcacaaaggat 6180
 E I R E G R S F R S A V P R A W E S A K
 gagatccgtgaaggaagatcctttagatctgcagctacctcgtgcatgggaaagcgaag 6240
 R T I V T G N M V T L L G A I V I Y L L
 cgcaccatcgtcacaggcaacatggctcactttgctcggcgctatcgtgatttacttgctc 6300
 A V G E V K G F A F T L G L T T V F D L
 gcggcggcgaagtcaagggtcttgcctcaccctgggtctgaccaccgtattcgatctc 6360
 V V T F L I T A P L V I L A S R N P F F
 gttgtcaccttccctgatcacggcaccactgggtatcctggcatcacgcaacccatcttt 6420
 A K S S V N G M G R V M K L V E E R R A
 gccaaagtcatcggcgaacggcagggacgagtgatgaagctcgttgaagaacggcggcc 6480
 N G E L D E P E Y L K K I H A K N A A A
 aacggatgaattggatgagcctgagctacctgaaaaagatccatgccaagaatggcgagct 6540
 D K A S T D N S S T D N S E A P G T D T
 gataaggcttccactgacaattcttccactgacaattctgaagcacctggcaccgatacg 6600

secD

N Q E E E K * M T D S Q T E S L S T Q
 aaccaagaggaggagaaagtagcca**atg**actgattcccagactgaatcactgtcaactcaga 6660
 S V K P A K K R S W F N S L Y T G D G G
 gcgtaaaacagccaaaaaacgcagttggttcaacagcctctacaccggtgacggcggca 6720
 I D F I A K T K L W Y W I T G I L L V I
 ttgacttcatcgccaaaacaaactgtggtactggatcaccggcatttttctggttatct 6780
 S I L F I A I R G F S L S I D F Q G G T
 cgatcctgttcatcgccatccgtggttctccctgagcatcgatttccagggcggtagca 6840
 K M S M P A S D Y S T E Q V E E T F T E
 agatgagcatgccagcatcggattactccaccgaacaggtggaggaaacctttactgaag 6900
 A T G I T P E I V Q I V G S G D A R T L
 ccaccggcattactccggaaactcgtgcagatcgtcgggtccggcgacgcccgaccctgg 6960
 E I Y S E R L S D E D V E K A R L A I Y
 agatctactccgagcgcactcagcgcagtaggagtagaaaaagcccgcctggcgatctacg 7020
 E E Y Q P L N S E G Q P S P D A I G N S
 aggaataccaaccctaaactctgagggccagccaagcccagatgccatcggttaattcca 7080
 T V S E S W G S T I T Q R M V L A L I A
 cgggtgcggaatcatgggggtccaccatcacccaacgcagtggtgtggctctgattgcct 7140
 F L V I A A I Y I A F R L E R E M A I A
 tcctgggttattgcagcgcactacattgctttccgcctcgagcgtgaaatggccatcgccg 7200
 A M A A L V V D G I V I A G I Y A V I G
 ccatggcagcattggttgtgacggcatcgtcatcgccggcatctacgccgtcatcggcc 7260
 L E V S P A T V I G L L T V L T F S I Y
 tcgaagtatccccagcaaccgtcatcggctgctcaccgtgctgaccttctccatctacg 7320
 D T V V V F D K V R E N T E G F E G S R
 acaccgtcgtggtctttgacaaggtcagagaaaaacaccgaaggcttcgaaggcagccgca 7380
 R R T Y A E Q A N L A V N Q T F M R S I
 gacgaacctacgccgaacaagccaacctggcgggtcaaccagaccttcatgcggttcgatct 7440
 S T T I I S A L P I I A L M V V A V W M
 ccacgacaatcatctctgcaacttccgatcatcgctttgatgggtgtcgccgtctggatga 7500
 M G V G T L K D L A L I Q L I G V I E G
 tgggtgtggcaccctcaaagacctcgcactgatccagctgatcggcgtcatcgaaggca 7560
 T F S S V F L A T P L L V S L K N R L S
 ccttctcctccgtcttctcggcaacccccactgctggtcagcctgaaaaaccgcctgagca 7620
 K T K A H T A S V M K L R D G Q S T L I
 aaaccaaagcgcacaccgcttccgttatgaagttgcgcgacggccaaagcacgcttatcg 7680
 D A T P H T N A D A S A H G T E S D T D
 acgccacccccacaccaaaccgacgcctccgcgcacggcaccgaaagcgcactgacg 7740
 G V T P E A P A K R T V S K P I V D D H
 gtgtgacccccgaagcacctgcaaaacgtacagtaagcaaacccattgtggatgatcacc 7800
 R S S G T W R P G R S *
 gatcaagcggaaactggcgaccagggcagaagctaacaattggagaacgaagaaaaatc 7860
 ccgcagactcgcgttctgcgggatttttttgtgctctatgactcacgatgttcccaaa 7920
 cgacgacttccagtggtcgcacttccagtcggatttgcggtttttatccagtgaagtcggct 7980
 catgagaagttgagcacgcgaagtcgtaggttaggtctcgtaatctgcggtgctgtagg 8040
 ttgagatgtcgcgccttaagttcgatttctcaccttcgatacctcacgctcaatttctt 8100
 atgttcgagaccgctagggaaaagcaccaaaaaccgactgaaattgagtttgggaaattga 8160
 V I S N L S N G G
 gcgcaaggtattgagcccagagaaattgaacat**gtgat**ctcgaacttaagtaacggggggca 8220
 R H S A T G R R Y I G I A R F G C R R G
 gacattcggctacgggacgtcgttatataggtattgccagatttgggtgtcgcgggggca 8280
 K N R I I T V L L R F G E R L G T S H M
 aaaaccgtataattacagtcctattacgattcgggggaaaggctgggtacttcacacatgt 8340
 L F R K S R S A V I M L V A A L V M T S

secF

tgtttcggaaagtcacgcagcgcggtaatcatggttggtgcagcgttagtgatgacaagct	8400
<u>C G D G E P E P T S H Q T S L F G Y A V</u>	
gtggtgatggggaaccggaaccaaccagccaccaacaagccttttcggctacgcagtta	8460
<u>N S S L A T T N A A S L L G V A N D A G</u>	
actcttcgctggctacaaccaacgcggcgtcgctggtgggagtggtaatgatgctggtc	8520
<u>L L A A R V Y P G V Y V Q G P S G Q M I</u>	
ttttggctgccagagtgtatccgggtgtgtatgttcagggtccttctgggcagatgattc	8580
<u>P N T D L A S T Q V L P G I N R Q V I Y</u>	
ccaacactgatccttgcctccacgcaggatattgcccgggtattaaccgccaggtgatttaca	8640
<u>T I N E D A T Y S D G Q P V V C D D F L</u>	
ctatcaatgaagatgccacctactcagatggtcagcctgtggtgtgtgatgattttctgc	8700
<u>L S A T A G Q M P E L F Q S H V P L T S</u>	
tctctgctgacagctgggcagatgccggaactgttccagtcctcatgtgccattgacctcgc	8760
<u>Q I E R V D C V S G S K V A T V V F K E</u>	
agattgagcagtggtgactgtgtatctggttctaaagtagccaccgtgggtttcaaggaag	8820
<u>D L G E R W R Y L F E Q G D L L P A H A</u>	
acctcggtgagcgttggcgttatctttttgagcagggcgatttgttgccagcccatgccg	8880
<u>V A S K A G M T L E E L N Q A L K D K D</u>	
ttgcttccaagcaggtatgacctggaggagcttaatcaggcgttgaaggataaggatc	8940
<u>P E A L T E P A R V W S E G F Q L S Q F</u>	
ctgaagcgttgactgaacctgctcgtgtgtggagcgaaggtttccagctgtcccagttg	9000
<u>D P E L Q T A F G P Y K V D S V G E F G</u>	
atccagagctgcagacggcttttggcccgtacaaggtggattctgtgggtgaattcggcg	9060
<u>E V K L V R N E F Y S G D Q A V E A E I</u>	
aagtcaagctggtagcgaatgagttttacagtggcgcaccaggcgggttgaagcagaaatca	9120
<u>T M W P K G S D L S A I A D N G N L Q I</u>	
cgatgtggcctaaaggctcggatctcagcgcattgcccgataatggaaaccttcagatcg	9180
<u>A D V V A W E S E P W V N R D D P L N P</u>	
cagatgttggcgtgggagagcgcagcgggtgaaatcgcgatgaccttgaatcctt	9240
<u>Y D I K E E V G V L T E Q L T L A S A G</u>	
atgacattaaggaagaggtcgggtttttagctgagcagctcaccttggccagtgccgggtg	9300
<u>V F Y A A E A R Q A F A A C V D Q E A V</u>	
tgttttacgctgcggaggcccggcaggcgtttgcccctgcggtgaccaggaagcgggtgg	9360
<u>A A A S S S I S G I D V P A V G V H S V</u>	
ctcggcgtcgtcaagcatctctggaatcgatgtgcctgccgtaggtgtgactcgggtgc	9420
<u>R H Q N P V V H Q I G D L P A Q H M A V</u>	
gtcaccaaaatccggctcgtgcacaaaatcgggtgatctgccagcacagcacatggcgggtg	9480
<u>D I N A A S A L A G Q S I R I G Y D G P</u>	
atattaatgccgcacagcgttggcgggtcaatccatccgcattggctacgacggacctg	9540
<u>D E R K A A M V E A I R Q S C E P A G I</u>	
atgagcgaaggctgcaatggtggaggcattcgccaaagtgtgagcctgccggtatca	9600
<u>T V I D A S Q E A V S L N D L S R T E V</u>	
ccgttatcgatgcgtcgcaggagctgttagtcttaatgatctcagtcgaaccgaagtca	9660
<u>S E W G Y E Q Y F E G T L D A V L R T V</u>	
gtgaatggggctatgagcagctacttgaagggacacttgacgctgttctgcgtacagtg	9720
<u>D P S S V P S L A *</u>	
atccgagctcggtagcaagcttggcgtaatcatggtca	9758

dciAE

Abbildung G-1: DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 9,8 kb-Plasmid-Rescue. Stoppcodons sind als *, Startcodons durch Fettdruck dargestellt, die potentiellen RBS sind unterstrichen. Die Zahlen geben die Nukleotid-Position im Rescue an.

Die "codon usage" in *C. glutamicum*

F	TTT	11.	S	TCT	24.	Y	TAT	6.	C	TGT	2.
F	TTC	52.	S	TCC	51.	Y	TAC	35.	C	TGC	8.
L	TTA	4.	S	TCA	9.	*	TAA	3.	*	TGA	0.
L	TTG	25.	S	TCG	7.	*	TAG	2.	W	TGG	10
L	CTT	25.	P	CCT	19.	H	CAT	2.	R	CGT	27.
L	CTC	31.	P	CCC	16.	H	CAC	46.	R	CGC	62.
L	CTA	9.	P	CCA	42.	Q	CAA	20.	R	CGA	7.
L	CTG	59.	P	CCG	8.	Q	CAG	33.	R	CGG	3.
I	ATT	27.	T	ACT	17.	N	AAT	12.	S	AGT	1.
I	ATC	62.	T	ACC	75.	N	AAC	49.	S	AGC	19.
I	ATA	1.	T	ACA	6.	K	AAA	13.	R	AGA	0.
M	ATG	29.	T	ACG	5.	K	AAG	39.	R	AGG	2.
V	GTT	58.	A	GCT	59.	D	GAT	37.	G	GGT	33.
V	GTC	49.	A	GCC	77.	D	GAC	84.	G	GGC	84.
V	GTA	17.	A	GCA	82.	E	GAA	87.	G	GGA	31.
V	GTG	54.	A	GCG	28.	E	GAG	40.	G	GGG	5.

Abbildung G-2: *C. glutamicum* Codon-Präferenztable., mit der die Kodierbereichsanalyse des "Plasmid-Rescues" durchgeführt wurde. Sie wurde durch die Auswertung der "codon usage" verschiedener *C. glutamicum* Gene erstellt (Kalinowski, 1990).

Multiples Alignment, DNA- und Aminosäuresequenz von SecA

```

CgSecA      --VFGLSKVLRVGEGRAVKRLHKIADQVIALEDKFANLTDEELKAKTAEFKERIAGG---
MtSecA      ----MLSKLLRLGEGRMVKKRLKVVADYVGTLSDDVEKLTDAELRAKTDEFKRRRLADQKNP
SlSecA      --MSVLSKLMRAGEGKILRKLHRIADQVNSIEEDFADLSDAELRALTDEYKQRYADG---
EcSecA      MLIKLLTKVFGSRNDRTLRRMRKVVNIINAMEPEMEKLSDEELKGGKTAEFRARLEKG---
              *:::  ::  :::::  ::  ::  ..  .* *  *  *  *  *

CgSecA      EGLDEIFLEAFATAREAAWRVLGQKHVYVQIMGGAALHFGNVAEMRTGEGKTLTCVLPAY
MtSecA      ETLDDLLPEAFAVAREAAWRVLDQRPFVQVMGAAALHLGNVAEMKTGEGKTLTCVLPAY
SlSecA      ESLDDLLPEAFATVREAAKRVLGQRHYDVQIMGGAALHMGYVAEMKTGEGKTLVGTLPAY
EcSecA      EVLENLIPEAFVREASKRVFGMRHFDVQLLGGMVLNERCIAEMRTGEGKTLTATLPAY
              *  *:::  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CgSecA      LNALGKGVHVVTVNDYLAKRDAEMMGRVHRYLGLVGVILSDMRPDERREAYAADITYG
MtSecA      LNALAGNVHIVTVNDYLAKRDESEWMGRVHRFLGLQVGVILATMTPDERRVAYNADITYG
SlSecA      LNALSSEGCVHIVTVNDYLAERDSELMGRVHKFLGLNVGCILANQTPAQREMYACDITYG
EcSecA      LNALTGKGVHVVTVNDYLAQRDAENNRPLFEFLGLTVGINLPGMPAPAKREAYAADITYG
              **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CgSecA      TNNEFGFDYLRDNMARSLSDLVQRGHNYAIVDEVDSILIDEARTPLIISGPDVGTSGFYN
MtSecA      TNNEFGFDYLRDNMAHSLDDLVRQGHNYAIVDEVDSILIDEARTPLIISGPDGASNWYT
SlSecA      TNNEFGFDYLRDNMAWSKDELVQRGHNFIAIVDEVDSILVDEARTPLIISGPDQATKWYG
EcSecA      TNNEFGFDYLRDNMAFSPEERVQRKLYALVDEVDSILIDEARTPLIISGPAEDSSEMYK
              **** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CgSecA      VFAQIVPRMTKDVB-----YEVDERKKTGVKKEGVEYVEDQLG----IDN--
MtSecA      EFARLAPLMEKDVH-----YEVDLRKRTVGVHEKGVFVEDQLG----IDN--
SlSecA      DFAKLVTRLLKKGEGAGNTLKGIEETGDYEVDEKKTVAIHESGVAKVEDWLG----IDN--
EcSecA      RVNKIIPHLIRQEKEDS-ETFQGEHFSVDEKSRQVNLTERGLVLIIEELLVKEGIMDEGE
              .  ::  .  :  :  :  :  :  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```


Multiples Alignment, DNA- und Aminosäuresequenz von SecY

```

CgSecY      -VSAIIQAFKAD-----LRKKIFFTTIAMIVLYRIGAQIPSPGVDYATISGRLRDLTQDQ
MbSecY      MLSAFISSLRITVD-----LRRKILFTLGIIVVYRVLGTHIPIPGVDYKQVQCEASAGE
StcSecY      MLTAFARAFKTPD-----LRKKLLFTLGIIVVYRVLGTHIPIPGVDYKQVQCEASAGE
EcSecY      MAKQPLGDFQSAKGGGLGELKRLLFVIGALIVFRIGSFIPGIDA AVLAKLLEQQ---R
              .          .          *:::***:.. ::::***: :* **:: : : : .

CgSecY      S-SVYSLINLFSGGALLQLSIFAIGIMPYITASIIVQLLTVVIPHFEELKKEGQSGQAKM
MbSecY      AGQIYSLINLFSGGALLKLTAVAVGVMPYITASIIVQLLTVVIPHFEELKKEGQAGQSKM
StcSecY      G--LFGLVNMFSGGALLQITFFALGIMPYITASIIQLLTVVIPHFEELKKEGQAGTPKI
EcSecY      G-TIIEFMFNMFSGGALSRSIFALGIMPYISASIIQLLTVVHPTLAEIKKEGESGRRKI
              . : :.*:***** : :.*:*****:*****:***** * : :*****: * :

CgSecY      MQYTRYLTVALALLQSSGIVALADREQLL-GAGIRVLS-ADRNFDFLIVLITMTAGAVL
MbSecY      TQYTRYLAIALAILQATSIVALAANGLLQGCSLDII--ADQSIFTLVIVLVMGTGAAL
StcSecY      TQYTRYLTVALAILQGTGLVATARSALFSGCTVAGQIVPDQAIFTTVVMVICMTAGTCV
EcSecY      SQYTRYGTLVLAIFQSIGIATGLPNMPPGMQGLVINPG-----FAFYFTAVVSLVTGTMF
              ***** :.*:***:.. :.: : * : : : : . * : . * : .

CgSecY      VMWMGELITEKGVGNGMSLLIFAGIATRLEPTDGMNILGN---SGGVVFAVVLASVLILV
MbSecY      VMWMGELITERGIGNGMSLLIFVGVIAARIPAEQGSILES---RGGVVFVAVCAALIIII
StcSecY      VMWLGELITDRGIGNGMSILMFISIAATFPSALWAIKKQGEADGWIEFGTVILVGLVMV
EcSecY      LMWLGEQITERGIGNGISIIIFAGIVAGLPPAIAHTIEQAR--QGDHLFLVLLLVAVLVF
              :***: * : : : : : * : : . * : * : : : : .

CgSecY      IG--VVFVEQGQRRIPVQYAKRMVGRQYGGSTYLPLKVNQAGVIPVIFASSLIYMPV
MbSecY      VG--VVFVEQGQRRIPVQYAKRMVGRMYGGTSTYLPLKVNQAGVIPVIFASSLIYIPH
StcSecY      GL--VVFVEQAQRRIPVQYAKRMIGRRSYGGTSTYIPLKVNQAGVIPVIFASSLIYIPA
EcSecY      AVTFFVVFVERGQRRIVVNYAKRQQRVYAAQSTHPLKVNQAGVIPVIFASSLIIFPA
              *****:.*:***: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

CgSecY      LITQIVNSGSLEVSDNWNWRNIIAHLQTPSSWQYIVLYFALTIFFSYFYVSVQYDPAEQ
MbSecY      LITQLIRSGSVVGNWWDKVFVGTYSNLDPSNLVYIGIYFGLIIFFTYFYVSIITFNPDERA
StcSecY      LIVQFSNS-----TAGWATWITKNLADTAATPHIILYFLLIVFFAFFYVAISFNPEEVA
EcSecY      TIASWFGGG---TGWNWLTITISLYLQ-PGQPLYVLLYASAIIFCFFFYTALVFNPRETA
              *.. . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

CgSecY      ENMKKYGGFIPGIRPGRPTAEYLGFMNRLLFVGSYLYLAVLAVLPNIMLDLGDVAGSAGA
MbSecY      DEMKKYGGFIPGIRPGRPTADYLRVLSRITLPGSIYLGVIAVLPNLFQIGAG-GTVQN
StcSecY      DNMKKYGGFIPGIRAGRPTAEYLSYVLRITWPGSLYLGLIALVP---TMALAGFGANQN
EcSecY      DNLKKSAGFVPGIRPGEQTAKYIDKVMTRTLVGLYITFICLIP----EFMRD-AMKVP
              :*** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

CgSecY      TPFGGTAILILVSVALTTVKQIESQLLQSNYEGLLK-----
MbSecY      LPFGGTAVLIMIGVGLDVKQIESQLMQRNYEGFLK-----
StcSecY      FPFGGTSILIIVGVLETVKQIESQLQQRNYEGFLR-----
EcSecY      FYFGGTSLLIVVVVIMDFMAQVQTLMMSSQYESALKKANLKGYGR
              *****:***: * : : * : : : : * : * :

```

Abbildung G-5: Multiples Alignment von SecY-Proteinen aus verschiedenen Organismen.
 Cg: *Corynebacterium glutamicum* ; Mt: *Mycobacterium tuberculosis*; Stc: *Staphylococcus carnosus*; Ec: *Escherichia coli*.

ValSerAlaIleIleGlnAlaPheLysAspAlaAspLeuArgLysLysIlePhePheThrIleAlaMetIleValLeuTyrArgIleGlyAlaGln
 tgcgtgaggaggccaggaagataaagtgtccgccattattcaggcattcaaggacgcgcgatctgcgtaagaagattttcttcactatcgcaatgatcgtctctataccgcacatcggtgcgcaga 120
RBS **Transmembran-Helix I**

IleProSerProGlyValAspTyrAlaThrIleSerGlyArgLeuArgAspLeuThrGlnAspGlnSerSerValTyrSerLeuIleAsnLeuPheSerGlyGlyAlaLeuLeuGlnLeu
 tccttccccgggagttgactacgcaacgattagtggtcgtctgcgtgactgactcaggatcagtcgaagcgtttattcgcgtgattaactcgttttccgggtggagcgcgtgtgcagctgt 240

SerIlePheAlaIleGlyIleMetProTyrIleThrAlaSerIleIleValGlnLeuLeuThrValValIleProHisPheGluGluLeuLysLysGluGlyGlnSerGlyGlnAlaLys
 ccatttttgcatttggtatcatgcccgtacatcacggcgtctattatcgtgcagctgctgactgtggtattccacactttgaggagttgaagaaggaaggccagctctggccaggccaaga 360
Transmembran-Helix II

MetMetGlnTyrThrArgTyrLeuThrValAlaLeuAlaLeuLeuGlnSerSerGlyIleValAlaLeuAlaAspArgGluGlnLeuLeuGlyAlaGlyIleArgValLeuSerAlaAsp
 tgatgcagtacaccaggtaacttaacggttgctttggcgttgcagctctcaggcattgtcgcgttggcggaccgtgagcagctgcttggcgcaggtattcgtgtgctgtcgctgatc 480
Transmembran-Helix III

ArgAsnPhePheAspLeuIleValLeuValIleThrMetThrAlaGlyAlaValLeuValMetTrpMetGlyGluLeuIleThrGluLysGlyValGlyAsnGlyMetSerLeuLeuIle
 gcaacttcttcgatctcattggtttggcctacccatgactgcaggtgcggtgctgtgatgtggatgggtgagctcatcacggaaaaggcgtgggcaatggatgtcgttgcgtgatt 600
Transmembran-Helix IV **Transmembran-**

PheAlaGlyIleAlaThrArgLeuProThrAspGlyMetAsnIleLeuGlyAsnSerGlyGlyValValPheAlaValValLeuAlaSerValLeuIleLeuValIleGlyValValPhe
 tcgctggatcgcaactcgccctcccaactgatggcatgaacattctgggtaactccggcggcgtggttttcgctgtgtttctggcttccgctctgatcctggctcattgggtgtgtattcgc 720
Helix V **Transmembran-Helix VI**

ValGluGlnGlyGlnArgArgIleProValGlnTyrAlaLysArgMetValGlyArgArgGlnTyrGlyGlySerSerThrTyrLeuProLeuLysValAsnGlnAlaGlyValIlePro
 ttgagcaggccacgcgtcgtattccagtcagtaacgcaagcgcattggtgggagctgcaccagtcaggtggttcttccacttacctgccattgaaggtcaaccaagctggtgttatccag 840

ValIlePheAlaSerSerLeuIleTyrMetProValLeuIleThrGlnIleValAsnSerGlySerLeuGluValSerAspAsnTrpTrpGlnArgAsnIleIleAlaHisLeuGlnThr
 tgccttcgctcttcgctgatttacatgccagtgctgattactcagatcgtgaactcgtggttcgctggaagtgtctgataactgggtggcagcgaacatcattgcgcacctgcagacgc 960
Transmembran-Helix VII

ProSerSerTrpGlnTyrIleValLeuTyrPheAlaLeuThrIlePhePheSerTyrPheTyrValSerValGlnTyrAspProAlaGluGlnAlaGluAsnMetLysLysTyrGlyGly
 cttcttcctggcagtagcattggttttgactttgcactgacctcttcttcttacttctatggttccggttcagtagatccagctgagcaggctgaaaaacatgaagaagtacgggtggat 1080
Transmembran-Helix VIII

PheIleProGlyIleArgProGlyArgProThrAlaGluTyrLeuGlyPheValMetAsnArgLeuLeuPheValGlySerLeuTyrLeuAlaValIleAlaValLeuProAsnIleMet
 ttatccctggtattcgtccgggcccgcgactgctgagtagtctgggattcgtcatgaaccgcctgctgtttggtgggtccctgtacctggctgtcattgctgtgctgccaacattatgc 1200
Transmembran-Helix IX

LeuAspLeuGlyValAspAlaGlySerAlaGlyAlaThrProPheGlyGlyThrAlaIleLeuIleLeuValSerValAlaLeuThrThrValLysGlnIleGluSerGlnLeuLeuGln
 tggatctaggtgttgacccgggttcggcgggagcaactccattcggcggaaaccgcaactcttgattctgtgatctgttgcactgaccacagtgagcagattgagagccagctcctgcaaa 1320
Transmembran-Helix X

Met
 SerAsnTyrGluGlyLeuLeuLys***
 gcaactacgaaggacttctaaaataatg 1350

Abbildung G-6: DNA- und Aminosäuresequenz von SecY aus *C. glutamicum*. Die Transmembran-Domänen des Proteins und die RBS sind grau unterlegt.

Multiples Alignment, DNA- und Aminosäuresequenz von SecE

```

CgSecE      -----VSDE-----QNS---GVGG-----TSRPTGKRQLS---GAST-----
MtSecE      MSDEGDVADEAVADGAENADSRGSGGRTALVTKPVVRPQRPTGKRSRRAAGADADVDVE
SgSecE      -----MTDAVGSIDMP-----DA-----
                                     ..* . . . . :

CgSecE      -TSTSSYEA----KQVSTQKKSSGSD-----SKPGGG-----VISFLPEVVGEVRKVI
MtSecE      EPSTAASEATGVAKDDSTTKAVSKAARAKKASKPKARSVNPIAFVYNYLKQVVAEMRKVI
SgSecE      -EDEAP-ES---KKS SRKGGKRGK-----G-PLGR-----LALFYRQIVAELRKVV
          . : . * :   * . *           . * .           : : : : * : * : * :

CgSecE      WPTARQMVTYTLVVLGFLIVLTALVSGVDFLAGLGVEKILTP-
MtSecE      WPNRKQMLTYTSVVLAFVLAFLAFMVALVAGADL--GLTKLVMLVFG
SgSecE      WPTRSQLTTYTSVVIVFVVVMIGLVTVLDI--GFARVVKYVFG
          ** .   * :   *** ** : * : . : . ** :   * :   * :

```

Abbildung G-7: Multiples Alignment von SecE-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Cg: *Corynebacterium glutamicum* ; Mt: *Mycobacterium tuberculosis*; Sg: *Streptomyces griseus*.

```

tgtagcaggtatgtcctaataaatattgcgaggggttcgcgggattaatgtactctcgaag 60
                                     F37-Promotorregion

gttgaacacagggctgcgattgtgctggatcaaatgtctgcacgaaaaattgttatcgcc 120
                                     ValSerAspGluGlnAsnSerGlyValGly
cctggatgagtagtgatttagaggagtgctgtgagcgacgagcagaattctggcgtaggc 180
                                     RBS

GlyThrSerArgProThrGlyLysArgGlnLeuSerGlyAlaSerThrThrSerThrSer
ggaacgtctcgcccaacgggtaaacgccagctgtcgggtgcttcactacctctacctct 240

SerTyrGluAlaLysGlnValSerThrGlnLysLysSerSerGlySerAspSerLysPro
tcttatgaggctaagcaggtatctacacagaagaagtcacccggttcggattctaagcct 360

GlyGlyGlyValIleSerPheLeuProGluValValGlyGluValArgLysValIleTrp
ggcggcggtgttatttctttctgctgaggttggtgggagaagtcgtaagggttatttgg 420

ProThrAlaArgGlnMetValThrTyrThrLeuValValLeuGlyPheLeuIleValLeu
cctactgcgcgccagatggtcacgtacacccttgctggttttgggattcttgattgtttt 480
                                     Trans-

ThrAlaLeuValSerGlyValAspPheLeuAlaGlyLeuGlyValGluLysIleLeuThr
accgctttgggtgctgctgggtggtgatttcttagctggtcctggagttgagaagattctgact 520
membran-Helix

Pro***
ccgtaggtaggatgtgtaacatctttttttgaaaagtcccgcgtggttccctggaggagcc 600
                                     Terminator-Region

```

Abbildung G-8: DNA- und Aminosäuresequenz von SecE aus *C. glutamicum*. Die funktionellen Domänen des Proteins und die RBS sind grau unterlegt.

Multiples Alignment, DNA- und Aminosäuresequenz von SecG

```

CgSecG      -----MALTQLIILVVASLLMTVFV
MtSecG      MAGVTAAVSARLKADEARRPGFYAAGSGPLPQVRGSLPVMELALQITLIVTSVLVLLV
StcSecG      -----MVACCHRAPVVHRRSSESE-----EVGPAVVLGFSIALIVFSLLLMLLV
              : * :.* ** *::: ::*

CgSecG      LLHKGKGGGLSSLFGGGVQSNLSGSTVVEKNLDRVTILVAVIWIWICIVALNLIQTYS-
MtSecG      LLHRAKGGGLSTLFGGGVQSSLSGSTVVEKNLDRLTFTGIWLVSIIGVALLIKYR-
StcSecG      LMHKGKGGGLSDMFGGGMQSSVGGSSVAERNLDRITVVVGLAWFACIMVLGLLMKANN
              *::.* ** ** :****:* :.*:* :*****:* :.* * :.* : : * : .

```

Abbildung G-9: Multiples Alignment von SecD-Proteinen aus verschiedenen Organismen. Cg: *Corynebacterium glutamicum* ; Mt: *Mycobacterium tuberculosis*; Stc: *Staphylococcus carnosus*.

```

              MetAlaLeuThrLeuGlnIleIleLeuValValAlaSer
cggcaaaaggaaacattttccacatggcattgacgcttcaaatacctcgtcgtcgccagc 60
      RBS                               Transmembran-

LeuLeuMetThrValPheValLeuLeuHisLysGlyLysGlyGlyGlyLeuSerSerLeu
ctgctcatgacggttttcgtcttgctgcacaagggcaaagggcggcggactctccagcctc 120
Helix I

PheGlyGlyGlyValGlnSerAsnLeuSerGlySerThrValValGluLysAsnLeuAsp
ttcggcggcggtgtgcagtccaatctttcgggctccactgttggtgaaaagaacctggat 180
Transmembran-Helix II

ArgValThrIleLeuValAlaValIleTrpIleValCysIleValAlaLeuAsnLeuIle
cgcgtcaccattttggttgccggttatctggattgtgtgcattgtcgcactcaacctcatc 240
      Transmembran-Helix III

GlnThrTyrSer***
cagacttattcataagacac 260

```

Abbildung G-8: DNA- und Aminosäuresequenz von SecG aus *C. glutamicum*. Die Transmembran-Domänen des Proteins und die RBS sind grau unterlegt.

3) Plasmidkarten

