

**Untersuchung der Zellhüllenstruktur
von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032**

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

der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

**vorgelegt von
Sven Brand
aus Lemgo**

Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | <u>Zusammenfassung</u> | 1 |
| II. | <u>Einleitung</u> | 2 |
| 1 | Corynebakterien-Taxonomie | 2 |
| 2 | Wirtschaftliche Bedeutung | 3 |
| 3 | Gentechnische Methoden für <i>C. glutamicum</i> | 4 |
| 4 | Das <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Genom | 6 |
| 5 | Die Zellhülle von <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 6 |
| 6 | Schaumbildung bei Fermentationsprozessen | 14 |
| 7 | Ziele dieser Arbeit | 16 |
| III. | <u>Material und Methoden</u> | 17 |
| 1 | Bakterienstämme und Plasmide | 17 |
| 1.1 | Bakterienstämme | 17 |
| 1.2 | Plasmide | 18 |
| 2 | Verwendete Primer | 19 |
| 3 | Medien und Zusätze | 20 |
| 3.1 | Nährmedien | 20 |
| 3.2 | Zusätze zu den Nährmedien | 21 |
| 4 | Puffer und Lösungen | 22 |
| 4.1 | DNA-Isolierung und –Reinigung | 22 |
| 4.2 | DNA-Bearbeitung | 23 |
| 4.3 | Elektrophorese-Puffer und –Lösungen | 24 |
| 4.4 | Lösungen zur DNA-Amplifizierung durch PCR | 24 |
| 4.5 | Lösungen für den DNA-Transfer | 25 |
| 4.6 | Puffer und Lösungen für Vakuumblot und DNA-Hybridisierung | 25 |
| 4.7 | Lösungen für Proteinextrakte | 27 |
| 4.8 | Lösungen für Proteindarstellung | 28 |
| 4.9 | Lösungen für Semi-Dry-Blot / Westernblot | 29 |
| 4.10 | Lösungen für „In Gel“-tryptischer Verdau | 30 |
| 5 | Enzyme, Chemikalien und anderes Material | 31 |
| 5.1 | Enzyme, Marker | 31 |
| 5.2 | Chemikalien | 31 |
| 5.3 | Kits | 32 |
| 5.4 | Materialien | 32 |
| 5.5 | Geräte | 33 |
| 6 | Kultivierung von Bakterien und mikrobiologische Tests | 34 |
| 6.1 | Anzucht von Bakterien | 34 |
| 6.2 | Lagerung von Bakterien | 34 |
| 6.3 | Bestimmung des Bakterientiters | 34 |
| 6.4 | MIC-Test | 35 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 7 | Isolierung von DNA | 35 |
| 7.1 | HB-Lyse zur Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> | 35 |
| 7.2 | Gesamt-DNA-Isolierung aus <i>C. glutamicum</i> | 36 |
| 7.3 | Isolation von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA mit Hilfe von „Kits“ | 37 |
| 8 | Reinigung von DNA | 37 |
| 8.1 | Phenolisierung | 37 |
| 8.2 | Sephadex G50-Säulenchromatographie | 37 |
| 8.3 | Entfernen von RNA | 37 |
| 8.4 | DNA-Konzentrierung und Alkoholfällung | 37 |
| 9 | DNA-Analysen | 38 |
| 9.1 | Agarose-Gelelektrophorese | 38 |
| 9.2 | Größenbestimmung von DNA-Fragmenten | 39 |
| 9.3 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 39 |
| 9.4 | Eckhardt-Lyse von <i>E. coli</i> | 39 |
| 10 | Klonierungsexperimente | 40 |
| 10.1 | DNA-Restriktion | 40 |
| 10.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 40 |
| 10.3 | Primer-Design | 41 |
| 10.4 | PCR-Reaktionen | 41 |
| 10.5 | DNA-Ligation | 42 |
| 10.6 | Identifizierung rekombinanter Plasmide durch α -Komplementation | 43 |
| 10.7 | Gen-Deletion mittels „Gene-SOEing“ | 43 |
| 10.8 | PCR-Schnelltest für Integrationen/Deletionen in <i>C. glutamicum</i> | 44 |
| 11 | DNA-Transfertechniken | 46 |
| 11.1 | Schnelltransformation nach <i>E. coli</i> | 46 |
| 11.2 | Elektroporation nach <i>E. coli</i> | 46 |
| 11.3 | Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen | 47 |
| 11.4 | Elektroporation nach <i>C. glutamicum</i> | 47 |
| 11.5 | Herstellung elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> Zellen | 48 |
| 11.6 | Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i> | 49 |
| 12 | Hybridisierung von DNA | 50 |
| 12.1 | DNA-Transfer durch Vakuum-Blotting | 50 |
| 12.2 | Nicht-radioaktive DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP | 50 |
| 12.3 | Nicht-radioaktive Hybridisierung | 51 |
| 12.4 | Digoxigenin-Nachweis | 52 |
| 12.4.1 | Antikörpernachweis durch NBT/X-Phosphat | 52 |
| 12.4.2 | Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz | 52 |
| 13 | Extraktion , Darstellung und Analyse von Proteinen | 53 |
| 13.1 | Herstellung von <i>C. glutamicum</i> Gesamtprotein-Rohextrakten | 53 |
| 13.2 | Herstellung von <i>C. glutamicum</i> Zellhüllenproteinextrakten | 53 |
| 13.3 | Herstellung eines Proteinkonzentrates aus dem Kulturüberstand | 54 |
| 13.4 | Dialyse der Proteinextrakte | 54 |
| 13.5 | Bestimmung des Proteingehaltes | 55 |
| 13.6 | Diskontinuierliche SDS-PAGE | 55 |
| 13.5.1 | Herstellung diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgele | 56 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 13.5.2 | Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf | 57 |
| 13.6 | 2D-Gelelektrophorese | 57 |
| 13.6.1 | Dialyse der Proteinextrakte | 57 |
| 13.6.2 | Acetonfällung der Proteinextrakte | 58 |
| 13.6.3 | Elektrophoreselauf | 58 |
| 13.7 | Proteinfärbung im Gel | 59 |
| 13.8 | Immunoblotting (Western-Blot) | 60 |
| 13.8.1 | Semi-Dry-Blot | 60 |
| 13.8.2 | Ponceau-Färbung | 61 |
| 13.8.3 | Immunologischer Nachweis gebloetter Proteine | 61 |
| 13.9 | Tryptischer „In-Gel“-Verdau | 62 |
| 13.10 | MALDI-TOF-Massenspektrometrie | 63 |
| 13.10.1 | Probenvorbereitung für MALDI-TOF-Analysen | 63 |
| 13.10.2 | Erstellung des Peptid-Massespektrums | 63 |
| 13.10.3 | Auswertung der Massespektren mit „MASCOT“ | 64 |
| 14 | Analyse der extrahierbaren Lipide (Mycolsäureverbindungen) | 65 |
| 14.1 | Isolierung extrahierbarer Lipide (und Mycolsäureverbindungen) | 65 |
| 14.2 | Auftrennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie | 65 |
| 14.3 | Nachweis aufgetrennter Lipide durch Jod | 65 |
| 14.4 | Anthron-Nachweis von Glycolipiden | 66 |
| 14.5 | Phospholipidnachweis mit Molybdänblau | 66 |
| 14.6 | Lipidnachweis mit Molybdänblau | 66 |
| 14.6 | R _F -Wert-Bestimmung | 67 |
| IV | <u>Ergebnisse</u> | 68 |
| 1 | Identifizierung von PS2/<i>cspB</i> | 68 |
| 1.1 | Homologe Hybridisierung mit <i>cspB</i> | 68 |
| 1.2 | PCR-Experimente mit <i>cspB</i> -spezifischen Primern | 68 |
| 1.3 | Suche nach <i>cspB</i> im <i>C. glutamicum</i> Genomprojekt | 69 |
| 1.4 | Identifikation von PS2 im Zellhüllenproteinextrakt | 69 |
| 1.5 | PS2/ <i>cspB</i> in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 | 70 |
| 1.6 | Untersuchung anderer <i>C. glutamicum</i> -Stämme auf das Vorhandensein eines <i>S-layers</i> | 71 |
| 2 | Identifizierung von <i>csp1</i> | 73 |
| 2.1 | Homologe Hybridisierung von <i>csp1</i> | 73 |
| 2.2 | Suche nach <i>csp1</i> im <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Genomprojekt | 73 |
| 2.3 | Sequenzanalyse der <i>csp1</i> -homologen <i>orf</i> 's | 76 |
| 3 | Systematische Analyse der extrahierbaren Zellhüllenproteine von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 | 79 |
| 3.1 | Identifizierung der extrahierbaren Zellhüllenproteine im 1D-SDS-PAGE | 79 |
| 3.2 | Identifizierung der extrahierbaren Zellhüllenproteine im 2D-SDS-PAGE | 82 |
| 3.3 | Systematische Analyse des Kulturüberstandes von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 | 86 |
| 3.4 | PS1A/B/C/D als Bestandteil der Zellhülle von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 | |
| 4 | Funktionsanalyse der PS1-Proteine aus <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 | 90 |
| 4.1 | Analyse der <i>csp</i> -Einfachmutanten | 90 |
| 4.1.1 | Konstruktion der <i>csp</i> -Einfachmutanten | 90 |
| 4.1.2 | Analyse der Zellhüllenproteinprofile der <i>csp</i> -Einfachmutanten | 91 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.1.3 | Erstellen einer <i>csp1</i> -Überexpressionsmutante | 92 |
| 4.1.4 | Morphologische Analyse der <i>csp</i> -Einfachmutanten | 93 |
| 4.1.5 | Bestimmung der Mycolsäurezusammensetzung der <i>csp</i> -Einfachmutanten | 96 |
| 4.1.6 | Analyse der extrahierbaren Mycolsäureverbindungen der <i>csp</i> -Einfachmutanten | 97 |
| 4.1.7 | Bestimmung der <i>minimal inhibiting concentration</i> (MIC) von Ethambutol für die Einzelmutanten | 98 |
| 4.2 | Analyse der <i>csp</i> -Mehrfachmutanten | 100 |
| 4.2.1 | Konstruktion <i>csp</i> -Mehrfachmutante | 100 |
| 4.2.2 | Verhalten in Flüssigkultur | 101 |
| 4.2.3 | Analyse der extrahierbaren Mycolsäureverbindungen der <i>csp</i> -Mehrfachmutanten | 102 |
| 4.2.4 | PS1A/B/C-Funktion in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 | 104 |
| 5 | Biotechnologische Eigenschaften der <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 PS1 -Mutanten | 105 |
| 5.1 | Untersuchung der Schaumbildung | 105 |
| 5.2 | Bestimmung der Lysinproduktion der PS1 -Mutanten | 109 |
| IV | <u>Diskussion</u> | 111 |
| | Besitzt <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032 einen <i>S-layer</i> ? | 111 |
| | Neben <i>csp1</i> konnten in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 acht neue zu <i>csp1</i> homologe Gene identifiziert werden. | 113 |
| | PS1A/B/C/D/E sind auf der Zelloberfläche von <i>C. glutamicum</i> lokalisiert. | 115 |
| | Mit den Proteinen PS1A, PS1B und PS1C konnte in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 eine Familie von Mycolyltransferasen identifiziert werden. | 117 |
| | <i>C. glutamicum</i> Mycolyltransferasemutanten weisen eine reduzierte Schaumbildung bei der Fermentation auf. | |
| V | <u>Literaturverzeichnis</u> | 126 |
| VI | <u>Anhang</u> | 140 |
| 1 | <i>Alignment</i> von PS1A aus <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und PS1 aus <i>C. glutamicum</i> ATCC17965 | 140 |
| 2 | <i>Alignment</i> von <i>csp4</i> und <i>csp5</i> / PS1D und PS1E | 141 |
| 3 | Multiplles <i>Alignment</i> von PS1A-F mit Antigen 85A/B/C | 143 |
| 4 | Gen- und Mutationskarten | 145 |
| 5 | Plasmidkarten | 147 |
| 6 | MASCOT-Daten (2D-Gel) | 149 |
| 7 | Lysinproduktion | 152 |
| 8 | Bestimmung der Mycolsäurezusammensetzung | 152 |
| 9 | MIC-Test | 152 |
| 8 | Abkürzungen und Symbole | 154 |

I. Zusammenfassung

C. glutamicum ATCC13032 verfügt im Gegensatz zu *C. glutamicum* ATCC17965 über keine die Zelle umgebende *S-layer*-Schicht. Das Protein PS2 und das kodierende Gen *cspB* konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 wurden neben dem aus *C. glutamicum* ATCC17965 bekannten Gen *csp1* die acht neuen Gene *csp2-csp9* identifiziert. Diese Gene sind mit Ausnahme von *csp1* und *csp3*, die direkt benachbart vorliegen, über das gesamte Chromosom verteilt. Einen Sonderfall stellen die Gene *csp4* und *csp5* dar, die zu 94% identisch sind. Die translatierten Proteine der neuen *csp*-Gene, PS1B-PS1I, ließen sich in zwei Klassen unterteilen. Die Proteine der ersten Klasse, zu der PS1B/C/D/E/F gehören, weisen Homologien zur *N*-terminalen Domäne von PS1A (PS1 in *C. glutamicum* ATCC17965) auf, die wiederum homolog zu den Antigen85A/B/C-Proteinen aus *Mycobacterium* ist und für die Mycolyltransferaseaktivität des Proteins verantwortlich ist. Eine Zuordnung zu den Antigen85-Gruppen A/B/C war nicht möglich. Die andere Klasse mit PS1G/H/I ähnelt der *C*-terminalen Domäne unbekannter Funktion. Bei allen Proteinen außer PS1G konnte ein Signalpeptid gefunden werden.

Durch systematische Analysen der extrahierbaren Zellhüllenproteine und des Kulturüberstandes des Bakteriums durch 1D-SDS-PAGE, 2D-SDS-PAGE, Westernblot und MALDI-TOF „peptide fingerprint“-Untersuchungen konnten die Proteine PS1A/B/C/D/E als Bestandteil der Zellhülle identifiziert werden. Dabei handelt es sich neben PS1A nur um Proteine, die zur *N*-terminalen Domäne von PS1A homolog sind.

Für einen Funktionsnachweis wurden Mutationsstudien durchgeführt. Einzelmutationen bewirkten mit Ausnahme des Gens *csp1*, bei dessen Mutanten eine Zunahme der Zellgröße beobachtet werden konnte, keine Veränderung des Phänotyps. Für die Gene *csp1/2/3* wurden Mehrfachmutanten hergestellt. Anhand dieser Mutanten konnte erstmals gezeigt werden, daß *C. glutamicum* ATCC13032 über eine Familie von Mycolyltransferasen verfügt, die aus den Proteinen PS1A, PS1B und PS1C besteht. Diese Proteine katalysieren die Synthese von Trehalosedicorynemycolat (TDCM), welches Bestandteil der Mycolsäure-schicht des Bakteriums ist. Mit dem Stamm $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3$ int wurde eine Mutante erzeugt, die kein TDCM mehr synthetisieren kann. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte für die Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032 ein Modell entworfen werden, welches die Funktion der Proteine PS1A/B/C/D/E mit einbezieht.

Es konnte gezeigt werden, daß durch Mutation der Mycolyltransferasen das bei Fermentationsprozessen nachteilige Schaumverhalten von *C. glutamicum* ATCC13032 beeinflußt werden kann. Bei diesen Stämmen werden geringere Mengen Antischaummittel benötigt, um die Kultur schaumfrei zu bekommen. Ein nachteiliger Effekt auf die industriell bedeutende Lysinproduktion konnte für die *csp1*- und die *csp2*-Einzel- und Doppelmutanten nicht festgestellt werden.

II. Einleitung

1 Corynebakterien - Taxonomie

1896 wurde die Gattung *Corynebacterium* erstmals von Lehmann und Neumann definiert. In ihr sind Gram-positive, nicht-motile, nicht-sporulierende und fakultativ anaerobe Stäbchen (Collins & Cummins, 1986) zusammengefaßt. Der Gattungsname wurde dabei von der mikroskopisch deutlich sichtbaren keulenförmigen Zellform abgeleitet (griech. Koryne = Keule). Ein weiteres charakteristisches morphologisches Merkmal ist das Abwinkeln der Zellen bei der Teilung, zurückzuführen auf das asymmetrische Aufreißen der neu gebildeten Zellwand (*snapping division*) (Abb. II.1).

Die Gattung *Corynebacterium* wurde ursprünglich zur taxonomischen Erfassung des medizinisch bedeutsamen Typus *Corynebacterium diphtheriae* eingeführt. Heute ordnet man sie in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* der Sektion 15 der Prokaryonten („irregular nonsporing gram-positive rods“) zu (Jones & Collins, 1986). Als weiteres wichtiges Gattungsmerkmal gilt der GC-Gehalt der DNA zwischen 51 und 65 mol% (Liebl,

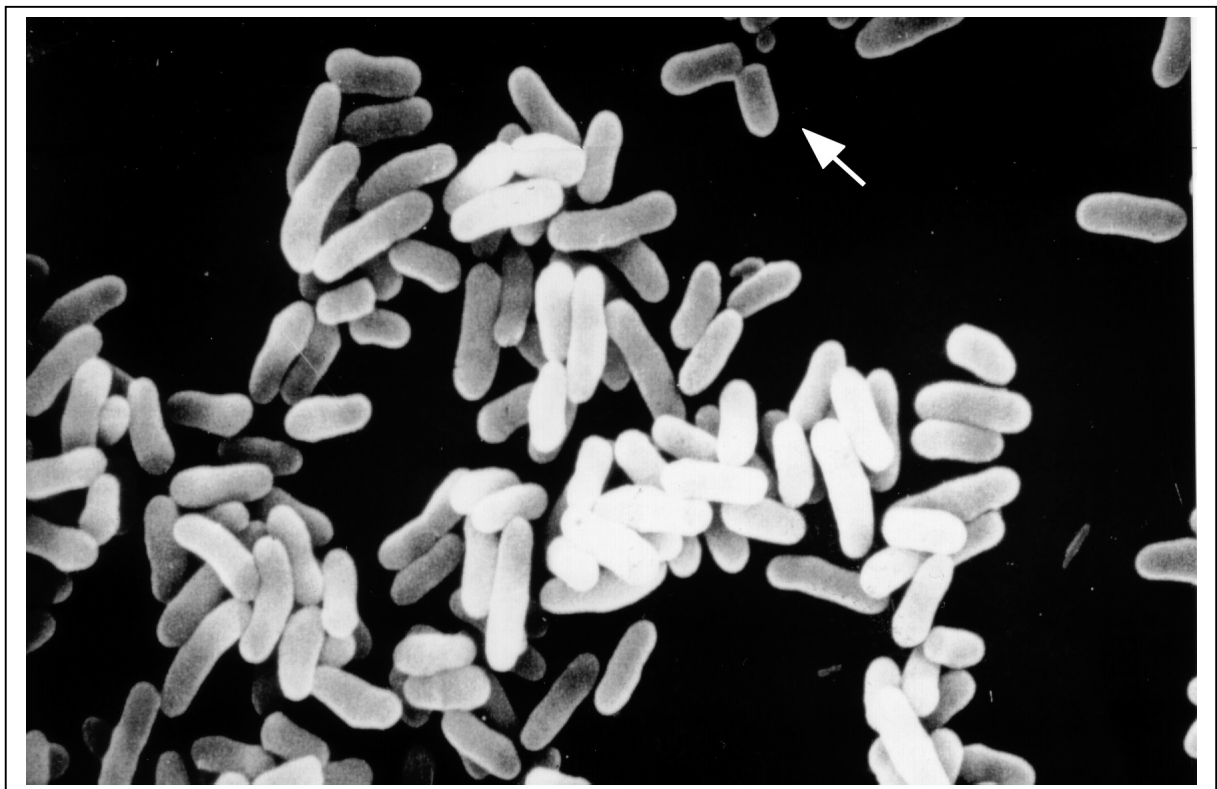


Abb. II.1: Rasterelektronische Aufnahme einer Zellsuspension des Stammes *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Keulenform und Ausbildung der „*snapping division*“ bei der Zellteilung (Pfeil) sind deutlich zu erkennen.

1991), womit *C. glutamicum* zur Gruppe der hoch-GC-haltigen, Gram-positiven Bakterien gehört, welche die Actinomycetenunterfamilie der Eubakterien bildet (Stackebrandt & Woese, 1981). Auch die charakteristischen Zellwandbestandteile meso-Diaminopimelat zur Quervernetzung des Peptidoglycans, Galactose und Arabinose als Hauptzellwandzucker und kurzkettige Mycolsäuren mit einer Länge von 22 bis 36 Kohlenstoffatomen (Collins *et al.*, 1982) sind typisch. Durch chemotaxonomische Vergleiche der Peptidoglycanstruktur und der Lipidkomponenten konnte eine enge phylogenetische Verwandtschaft der Gattung *Corynebacterium* mit *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* gezeigt werden. Diese vier Gattungen werden nach Barksdale in der CMN-Gruppe zusammengefaßt (Barksdale, 1970).

2 Wirtschaftliche Bedeutung

Erhebliche wirtschaftliche Bedeutung haben hauptsächlich die bodenbewohnenden, apathogenen Corynebakterien aufgrund zahlreicher StoffwechsellLeistungen erlangt. So werden sie heute zur Produktion und Umsetzung einer Vielzahl von Stoffen eingesetzt (Tab. II.1).

Das größte industrielle Interesse liegt seit der Entdeckung von L-Glutamat im Kulturüberstand von *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita *et al.*, 1957) jedoch in der fermentativen Produktion von L-Aminosäuren, besonders von L-Glutamat (Hirose *et al.*, 1985), L-Lysin (Tosaka *et al.*, 1983) und L-Aspartat (Teresawa *et al.*, 1985) (siehe auch Abb. II.2). Mittlerweile wurden für die meisten Aminosäuren industriell nutzbare biotechnologische Herstellungsverfahren entwickelt (Kleemann *et al.*, 1985). Ursachen dafür liegen in der Verwendung der Aminosäuren durch die Lebensmittelindustrie, z.B. als Geschmacksverstärker (Natrium-L-Glutamat, D,L-Alanin), kalorienarmer Süßstoff (Aspartam® = L-Aspartyl-L-

| Einsatzgebiet | Referenz |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Produktion von: | |
| Aminosäure | Yamada <i>et al.</i> , 1987 |
| Antibiotika | Suzuki <i>et al.</i> , 1972 |
| Carotinoiden | Sandmann, 1994 |
| Nukleotiden | Enei <i>et al.</i> , 1985 |
| Oberflächenaktive Agentien | Zajic <i>et al.</i> , 1977 |
| Vitamin C-Vorstufen | Anderson <i>et al.</i> , 1985 |
| Biokonversion von z.B. Steroiden | Miller, 1985 |
| Degradation von Kohlenwasserstoffen | Yokota <i>et al.</i> , 1987 |
| Käsereifung | Lee <i>et al.</i> , 1985 |
| Reinigung von Industrieabwässern | Calabrese <i>et al.</i> , 1993 |

Tab. II.1: Industrielle Einsatzgebiete coryneformer Bakterien (nach Wohlleben *et al.*, 1993)

Phenyl-Methylester) und Antioxidantien (L-Cystein, L-Histidin, L-Tryptophan). Weiterhin verwendet die Pharmaindustrie Aminosäuren als festen Bestandteil von Infusionslösungen zur postoperativen Therapie (Hoppe & Martens, 1983).

Besondere Bedeutung hat die Produktion von essentiellen Aminosäuren. So werden zum Beispiel L-Lysin und D,L-Methionin, die am stärksten limitierenden Aminosäuren (Kleemann *et al.*, 1985), als Futtermitteladditiv zur ernährungsphysiologischen Aufwertung pflanzlicher Nahrung in der Geflügel- und Schweinezucht eingesetzt (Leuchtenberger, 1984). Die industrielle Herstellung von L-Lysin erfolgt ausschließlich fermentativ durch Hochleistungsstämme von *Corynebacterium glutamicum* (Abb.II.2) und die eng verwandten Arten *Brevibacterium flavum* und *Brevibacterium lactofermentum*.

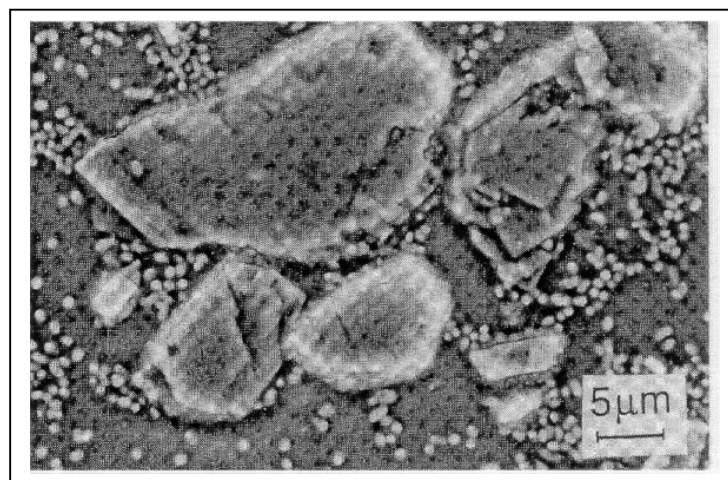


Abb. II.2: *C. glutamicum*-Zellen neben Kristallen der ins Kulturmedium sekretierten Aminosäure Tryptophan.

3 Gentechnische Methoden für *C. glutamicum*

Zunächst wurden die Aminosäure-Produktionsstämme durch klassische (ungerichtete) Mutagenesemethoden (z.B. chemische Mutagenese mit Ethylenmethansulfonat oder Hydroxylamin) und Selektion auf z.B. Aminosäure-Überproduktion optimiert. Diese Methoden waren jedoch unzureichend und lieferten zudem häufig Mehrfachmutanten, die neben der gewünschten noch weitere Mutationen tragen, deren Einfluß auf den Phänotyp nicht erwünscht oder nicht abschätzbar waren. Aus diesem Grund legte man in letzter Zeit einen Schwerpunkt auf die Erforschung von molekulargenetischen Methoden zur Isolierung und Analyse der entsprechenden Biosynthesegene und zur gezielten Beeinflussung der Stoffwechselwege sowie deren Regulationsmechanismen (Martin, 1989; Wohlleben *et al.*, 1993).

Dazu wurden zunächst geeignete Plasmide, Antibiotikaresistenzgene und Transformationssysteme benötigt, da die von *Escherichia coli* bekannten Systeme nicht übertragen werden konnten. Lediglich das Kanamycinresistenzgen des Transposons Tn5 arbeitet auch im Gram-positiven *Corynebacterium* (Pühler & Kalinowski, 1995).

Die meisten zur Zeit verwendeten Vektoren wurden durch Kombination der Replikons der kryptischen Plasmide pBL1 aus *Brevibacterium lactofermentum* (Santamaria *et al.*, 1984) und pHM1519 aus *C. glutamicum* (Miwa *et al.*, 1984) mit geeigneten Antibiotikaresistenzgenen hergestellt. Basierend auf diesem System wurden zudem *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Vektoren (Martin, 1989; Wohleben *et al.*, 1993; Kirchner, 1999) und Plasmide für spezielle Anwendungen, wie Promotor- und Terminator-Testvektoren oder Integrations- und Expressionsvektoren (Mornaga *et al.*, 1987; Cadenas *et al.*, 1991; Eikmanns *et al.*, 1991; Bardonet & Blanco, 1991; Schwarzer & Pühler, 1991; Schäfer *et al.*, 1994c; Kirchner, 1999), entwickelt. Weiterhin können durch Einsatz des *Bacillus subtilis* *sacB*-Gens, welches in *C. glutamicum* Sucrose-Sensitivität verleiht (Jäger *et al.*, 1992), schnell und einfach definierte Deletionsmutanten hergestellt werden (Schäfer *et al.*, 1994c), die positiv selektioniert werden können.

Als geeignete Transformationssysteme in Corynebakterien stehen heute die Elektroporation (Wolf *et al.*, 1989), die 1999 entscheidend durch O. Kirchner optimiert wurde, und der konjugative Plasmidtransfer (Schäfer *et al.*, 1990) zur Verfügung. Bei der Konjugation werden Vektoren, die die für den Transfer benötigten Mobilisierungsgene (*mob*) tragen, von *E. coli* nach *Corynebacterium* übertragen. Dabei wird der *E. coli*-Stamm S-17-1 verwendet, bei dem die Transferfunktionen des Plasmids RP4 ins Chromosom integriert vorliegen (Simon *et al.*, 1983). Durch einen vorgeschalteten Hitzeschock (bzw. andere Streßfaktoren) der Rezipientenzellen wird das Restriktionssystem von *C. glutamicum* inaktiviert, was eine Transferrate von bis zu 10^{-2} gewährleistet (Schäfer *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1994a; Schäfer *et al.*, 1994b).

Durch die Entdeckung des Erythromycin-Resistenz-Transposons Tn5432 aus *Corynebacterium xerosis* (heute *C. striatum*) (Kono *et al.*, 1983) stand auch das erste natürliche Transposon für *C. glutamicum* zur Verfügung (Kassing, 1992; Tauch *et al.*, 1995), mit dem Insertionsorte markiert und nach der Reisolierung weiter analysiert werden können (Kassing, 1992; Tauch, 1992; Jäger, 1995).

Mit diesen Methoden wurde eine molekulargenetische Ausstattung geschaffen, mit der differentielle Analysen zur Entschlüsselung der jeweiligen Stoffwechselwege in *C. glutamicum* durchgeführt werden können.

4 Das *C. glutamicum* ATCC13032 Genom

Aufgrund moderner und sehr leistungsfähiger DNA-Sequenzierungstechniken, unter anderem ermöglicht durch die Entwicklung der PCR („polymerase chain reaction“, Saiki *et al.*, 1988), bieten sich heute Genomprojekte als Alternative zum ausschließlich gezielten klonieren und analysieren von einzelnen Genen an. Auf diese Weise lassen sich sämtliche Gene eines Organismus erfassen, wodurch man eine Plattform erhält, von der aus „unzählige biochemische, physiologische und genetische Experimente gestartet werden können“ (Charlebois *et al.*, 1996). Einer umfassenden Analyse der zu optimierenden Stoffwechselwege oder dem tieferen Verständnis des Infektionsvorgangs von Krankheitserregern wird so eine deutlich breitere Basis geboten. Mögliche Regulationswege lassen sich wesentlich einfacher erkennen und auch sämtliche im untersuchten Vorgang involvierten Gene sind leicht identifizierbar und sofort für genetische Eingriffe zugänglich.

Aus diesem Grund wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld, zusammen mit der Degussa AG, das ca. 3,3 Mbp große Genom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, basierend auf einer physikalischen Makrorestriktions- und geordneten Cosmidkarte (Bathe, 1996; Brockmann-Gretza, 1998), sequenziert. Die Sequenzierung wurde 1999 zu 85 % fertiggestellt (Bathe, 1999), ein kompletter Lückenschluß erfolgte Ende 2000 durch Erstellung einer geordneten BAC-Karte (Tauch, 2000). Nach der Annotation durch MAGPIE (Gaasterland & Sensen, 1996a+b), später „Pedant-Pro“ der Firma BIOMAX, standen 8902 (3287) *orf's* mit möglichen Funktionszuweisungen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Zum Ende dieser Arbeit wurde die vollständige Sequenz des *C. glutamicum* ATCC13032 Genoms durch die Firma Kiowa Hakko veröffentlicht (Nakagawa *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Daten jedoch nur noch ansatzweise genutzt werden.

5 Die Zellhülle von *Corynebacterium glutamicum*

Die Zellhülle von Bakterien ist neben ihrer Funktion als physikalische Abgrenzung des Cytoplasmas gegen das Außenmedium auch an vielen wichtigen Lebensvorgängen wie Energiegewinnung, Substrat- und Metabolittransport, Wachstum, Zellteilung etc. beteiligt. Aus diesen Gründen hat sie auch für Fermentationsprozesse eine hochrangige Bedeutung, so daß ein tieferes Verständnis im Aufbau der Zellwand angestrebt wird.

Die Zellwand von *Corynebacterium* beinhaltet, wie die der verwandten Gattungen *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus*, die wesentlichen Komponenten Peptidoglycan, Arabinogalactan und Mycolsäuren. Ihr Aufbau unterscheidet sich deutlich von „nicht Mycolsäurehaltigen“ Gram-positiven und von Gram-negativen Bakterien (Nikaido, 1994; Abb.II.3). Die meisten Gram-positiven Bakterien sind von einer porösen

Peptidoglycanschicht umgeben, die durchlässig für die meisten mikrobiellen Agenzien ist. Im Gegensatz dazu werden Gram-negative Bakterien von einer äußeren Membran umgeben, die aufgrund der in dieser Membran vorkommenden Lipopolysaccharide (Osborn, 1979) ein effizientes Diffusionshindernis darstellt. Einen ähnlichen Effekt erzielen die Mycolsäurehaltigen Gram-positiven Bakterien, die einen unüblichen Bilayer ausbilden, der als außerordentlich effiziente Barriere gegen enzymatische und chemische Attacken wirkt (Nikaido, 1994).

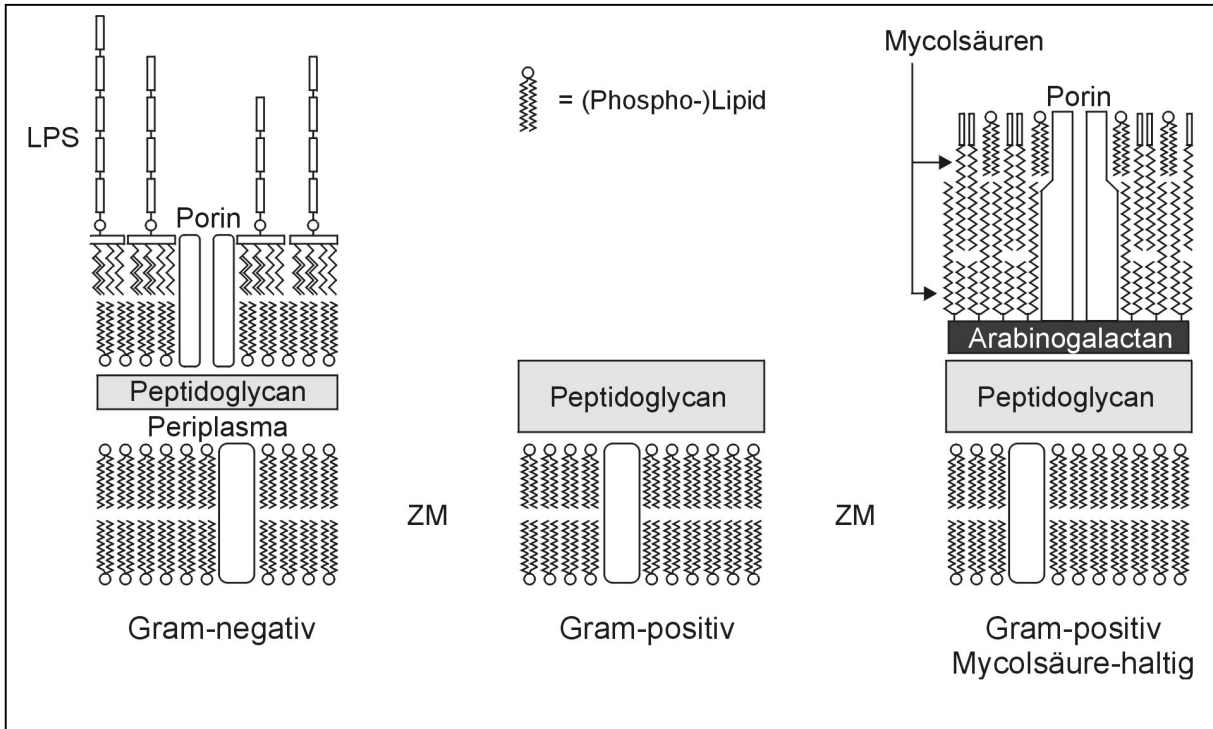


Abb. II.3: Schematische Darstellung von Gram-negativen, Gram-positiven und Mycolsäurehaltigen Gram-positiven Bakterien (nach Nikaido, 1994).
 ZM = Zellmembran LPS = Lipopolysaccharide

Das Peptidoglycan von *Corynebacterium* ist, wie bei allen Bakterien, ein charakteristisches Zellwandpolymer. Es handelt sich dabei um ein lineares Glycan, daß sich aus alternierenden 1,4-verbundenen Glucosaminen und Muraminsäure Einheiten zusammensetzt. Die Glycanketten sind durch Peptid-Untereinheiten miteinander vernetzt. Diese Peptide sind auch für den Großteil der Variationen der Peptidoglycan-Schicht verantwortlich, bedingt durch Veränderungen ihrer Aminosäurezusammensetzung und der Art der Quervernetzung (Minnikin & O'Donnel, 1984). Beim Arabinogalactan handelt es sich um eine Schicht aus verzweigt-kettigen Polysacchariden, die über Phosphodiesterbrücken an das Peptidoglycan gebunden ist (Brennan & Nikaido, 1995). Die Mycolsäuren sind α -verzweigte,

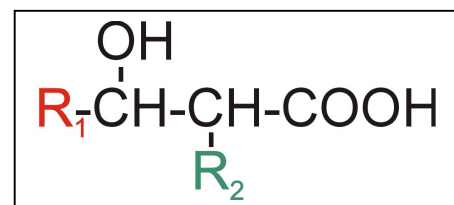


Abb.II.4: Strukturformel von Mycolsäuren

| Typ | Kettenlänge | | Vorkommen | Referenz |
|-----|----------------|----------------|--|--------------------------------------|
| | R ₁ | R ₂ | | |
| M | 43-62 | 20-24 | <i>Mycobacterium</i> | Minnikin, 1982 |
| N | 32-39 | 10-16 | <i>Nocardia</i> , einige <i>Rhodococcus</i> -Stämme | Tomiyasu & Yano, 1984 |
| R | 13-25 | 10-16 | <i>Rhodococcus</i> | Minnikin & Goodfellow, 1976 |
| C | 11-17 | 10-16 | <i>Corynebacterium</i> , <i>Caseobacter</i> , <i>Rhodococcus</i> | Herrera-Alcaraz <i>et al.</i> , 1993 |

Tab.II.2: Typklasse, Kettenlänge und Vorkommen von Mycolsäuren

β -hydroxylierte langkettige Fettsäuren (Hinrikson & Pfyffer, 1994; Abb.II.4), die in vier Klassen mit einer maximalen Kettenlänge von bis zu 60-90 Kohlenstoffatomen (Minnikin, 1982) eingeteilt werden (Tab.II.3). Mycolsäuren treten nur bei wenigen Bakterienarten auf, sind bei diesen aber ein Hauptzellwandbestandteil und stellen ein typisches Charakteristikum für diese Mikroorganismen dar (Alshamaony *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1982; Tomiyasu, 1982; Barksdale & Kim, 1977; Etémadi, 1967). Aus diesem Grund wird *Corynebacterium* auch in die Gruppe der Mycolsäuren tragenden Actinomyceten eingeordnet. Da bei Corynebakterien die Kettenlänge aber mit 22-36 Kohlenstoffatomen nur ein Drittel der Länge der bei *Mycobacterium* vorkommenden Mycolsäuren beträgt (Chun *et al.*, 1996) und weil sie nicht über eine Tuberculostearinsäure verfügen, nehmen sie eine Sonderstellung innerhalb dieser Gruppe ein. Während die Kohlenwasserstoffketten von *Nocardia* und *Rhodococcus* 0-4 Doppelbindungen aufweisen (Alshamaony *et al.*, 1976; Minnikin & Goodfellow, 1976), handelt es sich bei Corynebakterien um ein homogenes Gemisch aus gesättigten und ungesättigten Komponenten (Collins *et al.*, 1982). Aus *Mycobacterium* ist bekannt, daß der äußere Bilayer von den Mycolsäuren ausgebildet wird (Brennan & Nikaido, 1995; vgl. auch Abb.II.3). Dabei wird die äußere Membran von Trehalosedimycolaten (TDM) und Trehalosemonomycolaten (TMM), ebenfalls nicht kovalent gebundenen Proteinen und verschiedenen Peptiden gebildet (Minnikin *et al.*, 1977; George *et al.*, 1995; Liu *et al.* 1996). Die Mycolsäuren und Trehalosen sind dabei miteinander verestert (Lanéele & Asselineau, 1977). Die innere Membran setzt sich dagegen aus Mycolsäuren zusammen, die, ebenfalls über Esterbindungen, kovalent an das D-Arabino-D-Galactan (Asselineau, 1981; Liu *et al.*, 1995) und darüber an das Peptidoglycan gebunden sind (Barksdale & Kim, 1977; Brennan & Nikaido 1995; Michel & Bordet, 1976). Außerdem konnten Porine nachgewiesen werden (Niederweis *et al.*, 1995), die durch die Mycolsäureschicht reichen.

Zusätzlich wurde bei *Corynebacterium* eine äußere, die Zelle umgebende, sogenannte *S-layer*-Schicht festgestellt (Richter *et al.*, 1985; Peyret *et al.* 1993), wie sie auch in nahezu jeder phylogenetischen Gruppe von Eubakterien und als universelle Ausstattung von Archaeobakterien bekannt ist (König, 1988; Beveridge, 1994; Sleytr & Sara, 1997). *S-layer* werden von sich selbst anordnenden Proteinen oder Glycoproteinuntereinheiten geformt, so

daß sich auf der Zelloberfläche eine monomolekulare parakristalline Schicht bildet (Sleytr & Beveridge, 1999), welche die gesamte Zelle umschließt (vgl. auch Abb. II.7). Elektronenmikroskopische Studien konnten zeigen, daß die *S-layer* Proteine ein Muster aus schrägen, quadratischen oder hexagonalen Symmetrien mit einem „center to center“ Abstand von etwa 2,5 bis 35 nm ausbilden (Sleytr, 1997; Sára & Sleytr, 2000) (Abb.II.5). Dabei werden jeweils identische Poren ausgebildet, die eine Größe von 2 bis 8 nm haben und somit 30 bis 70 % der Zelloberfläche ausmachen (Baumeister *et al.*, 1989; Sleytr *et al.*, 1996). Auffällig ist der extrem hohe Grad an Regularität der vom *S-layer* ausgebildeten Strukturen (Beveridge, 1981; Sleytr & Messner, 1988). Die gesamte *S-layer*-Schicht ist ca. 5 bis 25 nm dick und weist eine relativ glatte Außenseite auf, während die Innenseite eher strukturiert erscheint. Nachdem Gene von *S-layer*-Proteinen verschiedener Bakterien sequenziert und analysiert worden sind, ist festgestellt worden, daß die Homologie zwischen *S-layer* von Bakterien verschiedener Spezies oder sogar von Stämmen einer Spezies generell sehr gering ist (Boot & Pouwels, 1996; Kuen & Lubitz, 1996). Lediglich die Aminosäurezusammensetzung ist auch bei *S-layer*-Proteinen verschiedener phylogenetische Zweige sehr ähnlich (Sára & Sleytr, 1996), wobei sie einen hohen Anteil von sauren und hydrophoben Aminosäuren aufweisen.

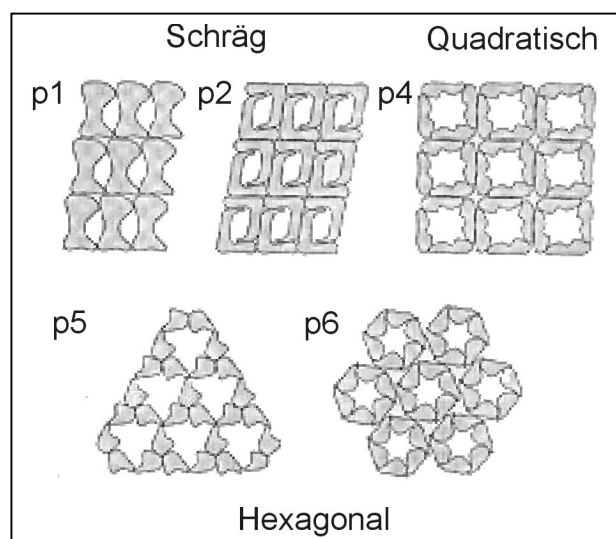


Abb.II.5: Schematische Darstellung der *S-layer*-Proteinanordnung und der daraus resultierenden Symmetrien (Sleytr & Sára, 1997).

p = Anzahl der Proteine, die eine morphologische Untereinheit ausbilden

Diese verschiedenen Schichten bilden zusammen eine wirksame Barriere gegen die Außenwelt und sind in der Lage, die Zellwand vor enzymatischen Angriffen, wie z.B. durch Lysozym, zu schützen (Komatsu, 1979). Man vermutet außerdem, daß die Mycolsäure-schicht als strukturelle Komponente eine Rolle bei der eingeschränkten Permeabilität dieser

Mikroorganismen für wasserlösliche Substanzen spielen könnte (Jarlier & Nikaido, 1990). Auch der Schutz des Peptidoglycans vor Lysozym wird durch den Mycolsäure-Bilayer vermittelt, welcher das Peptidoglycan umhüllt und damit abschirmt (Katsumata *et al.*, 1984). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Antibiotikasensitivität zunimmt, wenn man die Zellwand von *Mycobacterium* durch Wachstum in Gegenwart von Tween80 (Hui *et al.*, 1977) oder Entfernen von Zellwandmaterial durch Sphäroblastierung (David *et al.*, 1987) verändert. Der *S-layer*-Schicht fällt als äußerste Hüllschicht eine wichtige Rolle als *Interface* zum die Zelle umgebende Medium zu (Beveridge & Graham, 1991). Ihr werden Funktionen als Schutzschicht vor z.B. Phagen, Adhäsionsstelle für Exoenzyme, Oberflächenerkennung und Zelladhäsion an Substrate, isopores Molekularsieb und Virulenzfaktor bei pathogenen Organismen zugesprochen (Kay *et al.*, 1980; Lewis & Yuston, 1987; Blaser *et al.*, 1988; Messner & Sleytr, 1992; Wang *et al.*, 1993; Beveridge, 1994; Sleytr *et al.*, 1996; Beveridge, 1997)

Über die chemische Zusammensetzung der Zellwand von *Corynebacterium glutamicum* ist aufgrund der Bedeutung dieser Information für die taxonomische Klassifizierung viel bekannt. So wurde z.B. Vorkommen und Chemie der Zellwandzucker (Takeuchi & Yokota, 1989; Takeuchi & Yokota, 1993) oder der Mycolsäuren (Minnikin *et al.*, 1978) des Bakteriums untersucht. Der strukturelle Aufbau der Zellwand ist jedoch weitgehend unbekannt (Kinoshita, 1985). 1997 veröffentlichten Marienfeld *et al.* eine Arbeit, in der sie die Ultrastruktur der *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Zellwand mit Hilfe der Elektronenmikroskopie genauer untersuchten und darstellten (Abb.II.6). Dabei wurde festgestellt, daß die Zellwand mit ca. 32 nm deutlich dicker ist als die von *Mycobacterium*, welche eine Dicke von ca. 25 nm aufweist (Paul & Beveridge, 1992). Es ist somit eher eine Ähnlichkeit zur 30-40 nm dicken Zellwand von *Bacillus subtilis* zu erkennen (Graham & Beveridge, 1994). Möglicherweise kann man in der ausgeprägten Zellwand von *C. glutamicum* einen der Gründe für die hohe Resistenz des Bakteriums gegenüber mechanischem und chemischem Stress sehen (Marienfeld *et al.*, 1997). Desweiteren konnte eine Mehrschichtenstruktur erkannt werden, die der aus *Mycobacterium* bekannten Zellwandaufteilung sehr ähnelt (Paul & Beveridge, 1992). Bei der unteren ca. 17 nm dicken Schicht handelt es sich um das Peptidoglycan, welches, ähnlich wie bei *Bacillus subtilis* (Graham & Beveridge, 1994) eng an die äußere Plasmamembran assoziiert ist. Es folgt eine ca. 6,5 nm dicke elektronendurchlässige Schicht, die als Arabinogalactan-Mycolsäurekomplexe identifiziert wurde. Nach außen hin wird die Zelle von einer ca. 8,5 nm starken Schicht abgeschlossen, bei der es sich mutmaßlich um *S-layer* handeln könnte. Definitiv identifiziert werden konnte der *S-layer* bei *Corynebacterium glutamicum* ATCC17965 (*C. melassecola*) durch „Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie“ (Richter *et al.*, 1985; Peyret *et al.*, 1993) Dabei wurden hexagonale, symmetrische Anordnungen mit einen „center to center“ Abstand von 13,2 nm erkannt (Abb.II.7).

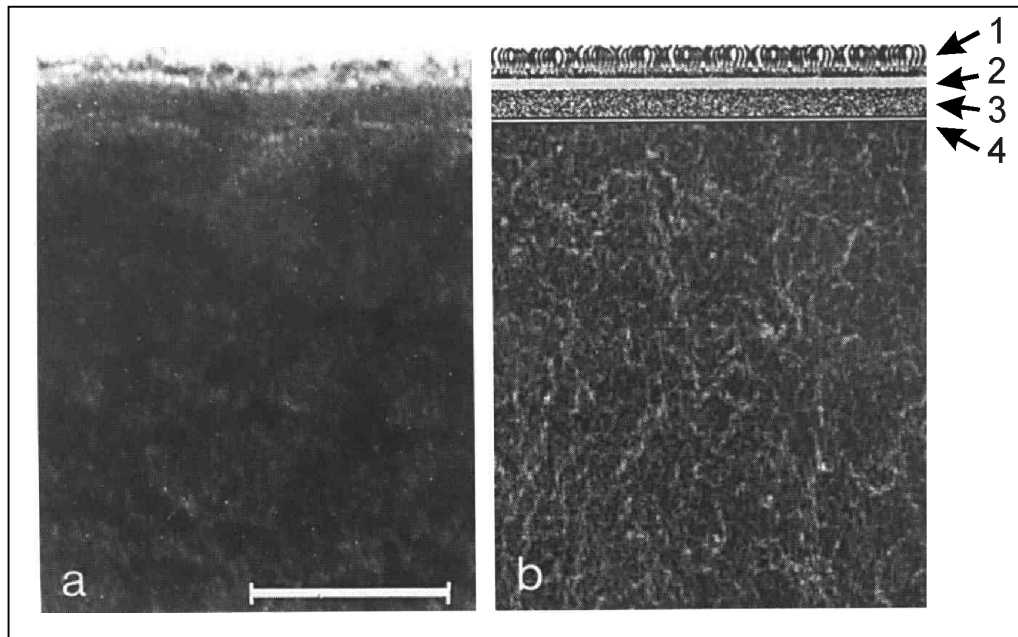


Abb.II.6: Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultra-Dünnschnittes der Zellwand konventionell fixierter *C. glutamicum* ATCC13032 Zellen (a). In (b) ist eine schematische Darstellung wiedergegeben (Marienfeld *et al.*, 1997). Pfeile und Nummern identifizieren die unterschiedlichen Schichten der Wand:

- 1 = äußere Schicht, evtl. *S-layer*
- 2 = ETR (electron-translucent region), Elektronendurchlässige Schicht, besteht wahrscheinlich aus Mycolyl-Arabinogalactan-Komplexen
- 3 = äußere Seite der Plasmamembran und Peptidoglycanschicht
- 4 = innere Seite der Plasmamembran (Cytoplasma)

Der Balken entspricht eine Länge von 10 nm.

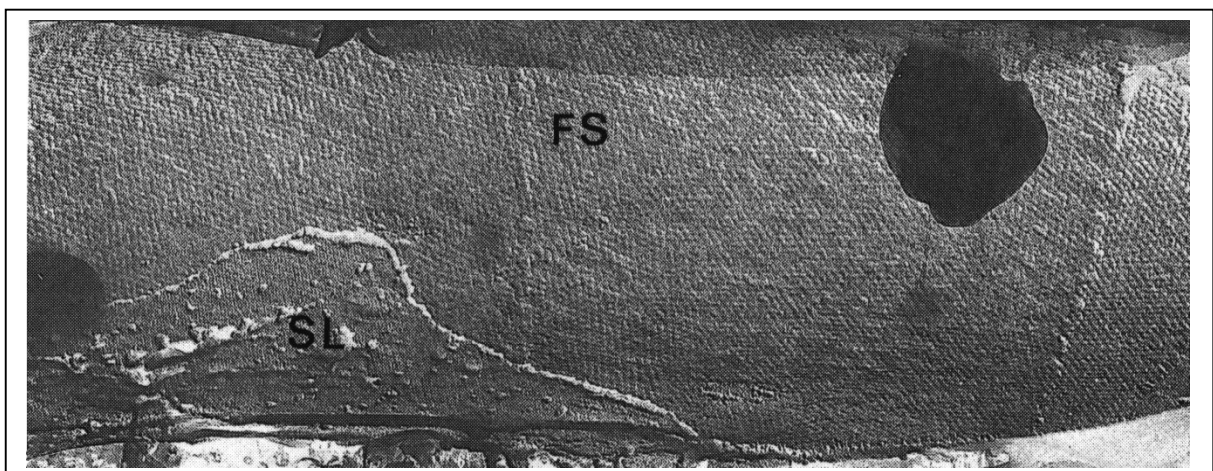


Abb.II.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* ATCC17965 nach Gefrierbruchpräparation (Peyret *et al.*, 1993).

SL = *S-layer* als periodisch angeordnete Oberfläche

FS = Erste Bruchschicht der Zellwand. Deutlich wird das regelmäßige Muster der rauheren Unterseite der *S-layer*-Schicht wiedergegeben

Seit einigen Jahren sind aus *C. glutamicum* ATCC17965 (früher *Corynebacterium melassecola*) mit den Proteinen PS1 und PS2, die mit 90% den Proteinanteil im Kulturüberstand dominieren (Joliff *et al.*, 1992), zwei Proteine bekannt, die eine wichtige Rolle beim Aufbau der Zellwand des Bakteriums spielen.

PS1

Joliff *et al.* haben 1992 das Protein PS1 erstmals beschrieben. Es hat nach Abspaltung des 4411 Da (43 AS) großen *N*-terminalen Signalpeptides eine Größe von 66463 Da (614 AS). Das PS1-kodierende Gen *csp1* umfaßt 1971 Nukleotide. Eine in „*Brevibacterium lactofermentum*“ (genetische Arbeiten in *C. glutamicum* ATCC17965 waren nicht möglich, da dieser Stamm stark DNA-restriktiv ist (Reyes *et al.*, 1990)) durchgeführte Deletion des *csp1*-Gens führte zu keiner phänotypischen Veränderung. Während zur *C*-terminalen Hälfte von PS1 keine Homologien in Genbanken gefunden wurden, fällt die *N*-terminale Homologie zu den sekretierten Proteinen A/B/C des Antigenkomplexes 85 aus *Mycobacterium* (Closs *et al.*, 1980; Wiker *et al.*, 1990) auf, welche als Mycolyltransferasen für die Synthese von Trehalosedicorynemycolaten zuständig sind (Ronning *et al.*, 2000). Bei der in *Mycobacterium* katalysierten Reaktion handelt es sich um eine Reaktion in drei Schritten (Abb.II.8). Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff des Ser₁₂₅ (Kraut, 1977; Belisle *et al.*, 1997) des aktiven Zentrums des Enzyms auf das Carboxyl-C-Atom ein Trehalosemonomycolats (TMM), unterstützt durch His₂₆₁ und Glu₂₂₉ (Aminosäure-Position in Bezug auf Antigen85C aus *M. tuberculosis*). Diese Reaktion führt zu einem Acyl-Enzym-Intermediat, bei dem die Mycolsäure kovalent an das Serin gebunden ist (Bullock *et al.*, 1996) und Trehalose freigesetzt wird. Im nächsten Schritt kommt es, wiederum unterstützt durch His₂₆₁ und Glu₂₂₉ zu einem nukleophilen Angriff der 6'-Hydroxyl-Gruppe eines weiteren TMM auf das Carboxylat-Atom des Acyl-Enzym-Intermediats, wodurch im letzten Schritt Trehalosedimycolat entsteht und die Ser₁₂₅-Seitenkette wieder freigesetzt für einen nächsten Reaktionszyklus wird. Später konnte festgestellt werden, daß es sich bei PS1 ebenfalls um eine Mycolyltransferase handelt, die Corynemycolylreste sowohl auf das Arabinogalactan überträgt, als auch auf Trehalosemonocorynemycolate (TMCM), wodurch Trehalosedicorynemycolate (TDCM) entstehen (Puech *et al.*, 2000). Eine Deletion des *csp1*-Gens führte zu einer 50%igen Verringerung der kovalent an die Zellwand gebundenen Corynemycolate. Zusätzlich konnte eine Verdopplung der nicht kovalent gebundenen TMCM-Menge und eine Halbierung der TDCM-Menge beobachtet werden. Die Funktion liegt dabei nur auf der *N*-terminalen Hälfte des Proteins. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, daß es in *C. glutamicum* weitere Mycolyltransferasen geben muß (Puech *et al.*, 2000). Bisher konnten jedoch keine weiteren Proteine mit Homologien zu PS1 oder zu Mycobakterien-Antigen85-A/B/C identifiziert werden.

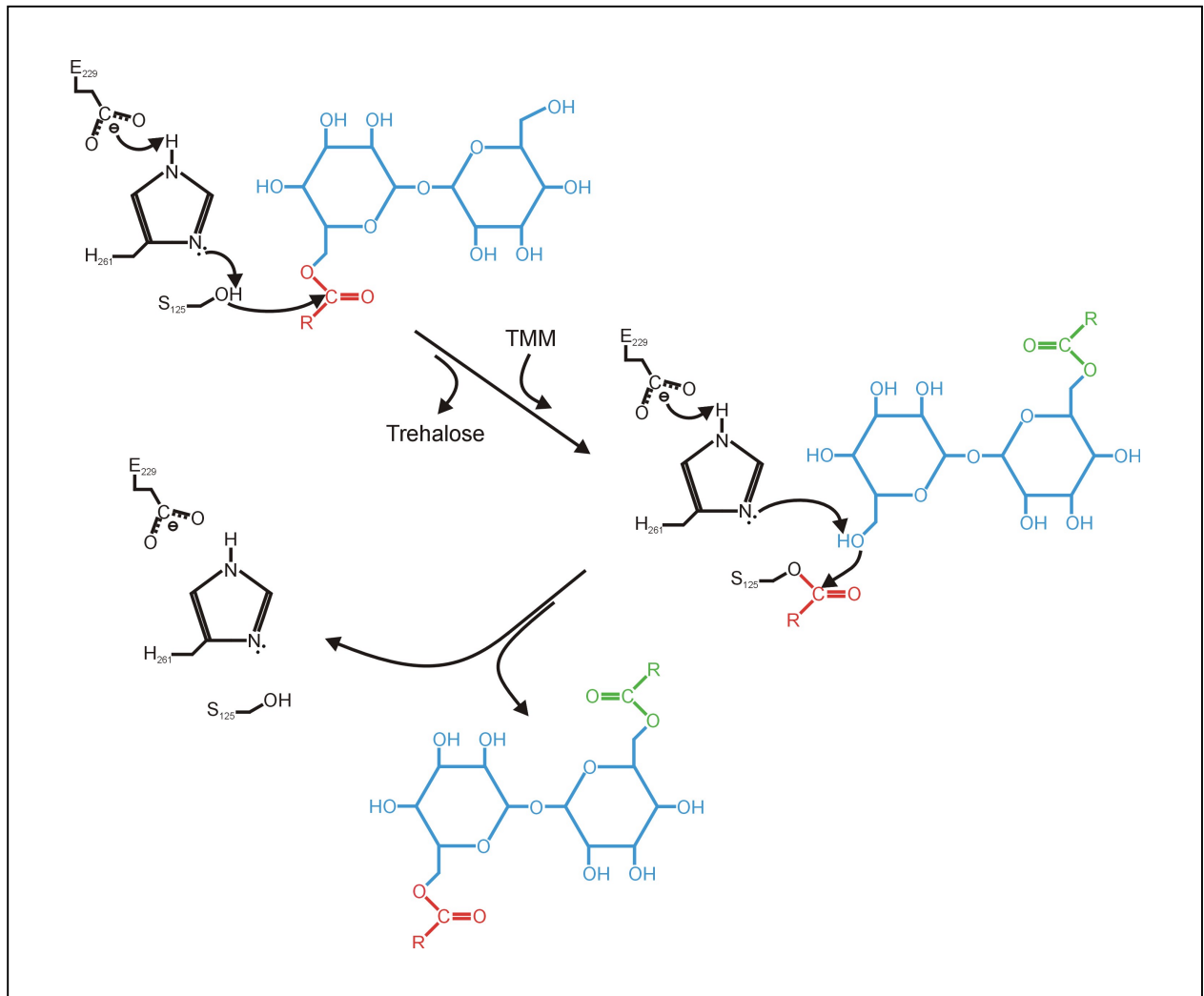


Abb.II.8: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus des Mycolyltransfers in *Mycobacterium* (Ronning *et al.*, 2000). Die Trehalosemoleküle sind in blau, die Proteinseitenketten in schwarz dargestellt. Die Mycolysäuren sind in rot und grün wiedergegeben, wobei das transferierte Molekül rot gekennzeichnet ist.

PS2

Das Protein PS2 wurde erstmals 1993 von Peyret *et al.* charakterisiert. Nach Identifikation des dazugehörigen 1533 bp großen Gens *mspB* konnte die Größe des Proteins nach Abspaltung des 2930 Da (30 AS) großen *N*-terminalen Signalpeptides auf 52496 Da (480 AS) festgelegt werden. Durch Herstellung entsprechender Deletionsmutanten in *Brevibacterium lactofermentum* konnte gezeigt werden, daß das PS2-Protein den die Zelle umgebenden *S-layer* ausbildet. Wachstum oder Vitalität der Bakterien wurde nicht durch das Fehlen der *S-layer*-Schicht beeinflusst, die genau Funktion bleibt also unklar. Einige *S-layer* bestehen aus zwei deutlich ausgeprägten Domänen. Eine dieser Domänen ist für die Monomerinteraktion und damit für die Ausbildung der parakristallinen Anordnung verantwortlich. Die andere ist an der Interaktion mit der Zellwand und auf diese Weise der Befestigung des Proteins beteiligt (Chu *et al.*, 1991; Hastie & Brinton, 1979; Thomas *et al.*, 1992). So weiß man auch von PS2, daß das Protein über eine *C*-terminale hydrophobe Domäne (Chami *et al.*, 1997) aus 21 Aminosäuren verfügt, wie sie auch bei *Halobacterium halobium* (Lechner &

Sumper, 1987), *Haloferax volcanii* (Sumper *et al.*, 1990) und *Rickettsia prowazekii* (Carl *et al.*, 1990) beobachtet wurde. Mit dieser Domäne ist PS1 in einer ebenfalls hydrophoben Schicht der Zellwand, die nicht aus Proteinen besteht (Chami *et al.*, 1995), nicht-kovalent verankert. Da das Protein auch in großen Mengen in das Medium abgegeben wird (Jollif *et al.*, 1992), wurde die Vermutung aufgestellt, daß Transport und Anordnung der Proteine nicht koordiniert erfolgt (Peyret *et al.*, 1993, Sleytr & Messner, 1988).

6 Schaumbildung bei Fermentations-Prozessen

Bei der Anzucht von Bakterien im Fermenter kommt es häufig zu so starker Schaumbildung (Abb. II.9), daß der eigentliche Produktionsprozess erheblich gestört werden kann. Durch die im Fermenter herrschenden hydrodynamischen Kräfte wird, in Verbindung mit den Kräften, die beim Aufbau und dem Zerplatzen der Schaumblasen entstehen, auf die Bakterien ein Druck ausgeübt, der zu suboptimaler mikrobieller Produktivität führen kann (Illing & Harrison, 1999). So kann es sogar zu Veränderungen in metabolischen Stoffwechselwegen (Fowler & Robertson, 1991) und zu Veränderung der Zellgröße und Hülle kommen (Wase & Patel, 1985). Bedingt wird die Schaumbildung durch die für optimale Wachstumsbedingungen der Bakterien notwendige Durchmischung der Fermentationsbrühe und den Eintrag von Luft.

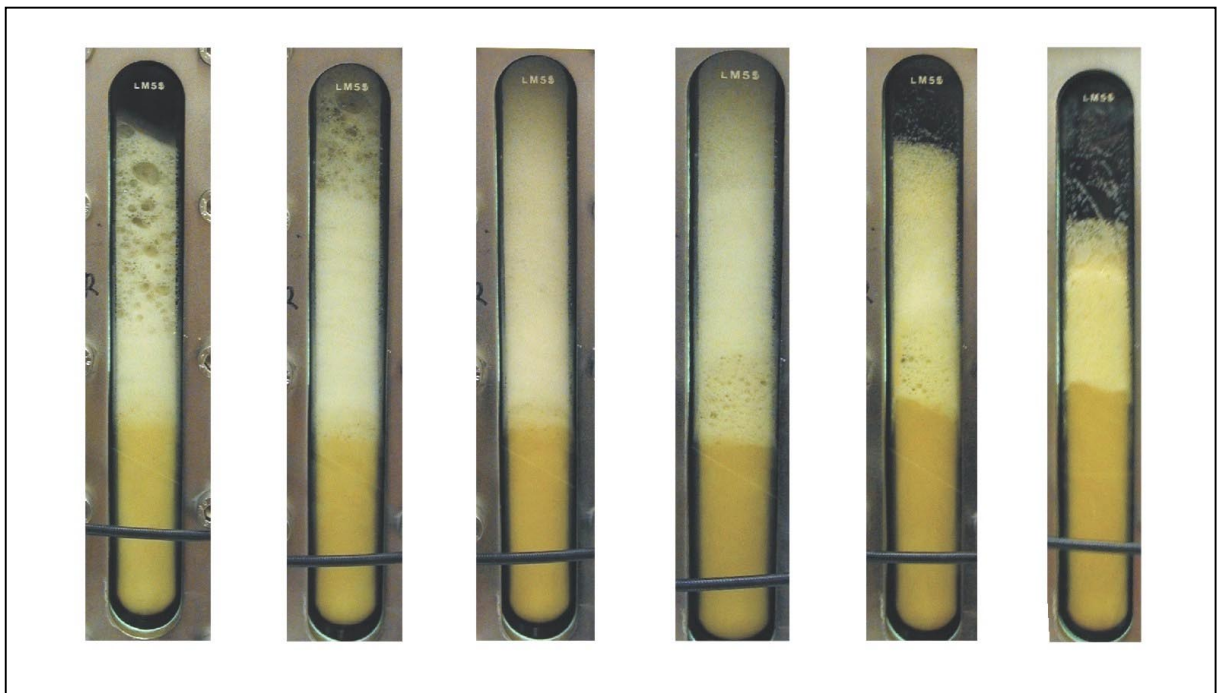


Abb.II.9: Schaumbildung eine *Corynebacterium glutamicum* Kultur im Verlauf des Fermentationsprozesses (B. Bathe, Degussa AG, 2001). Deutlich ist im Schauglas das Kulturmedium und der Schaum zu erkennen, der im zeitlichen Verlauf an Dichte zunimmt.

Diese Vorgänge, welche die Nähr- und Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen sicherstellen, bewirken durch Vermischen der Gas- mit der Wasserphase die Schaumbildung. Beim Schaum handelt es sich um ein Agglomerat von Gasblasen in bzw. auf einer Flüssigkeit (Römpp, 1999). Dabei werden die Gasblasen durch Flüssigkeitslamellen voneinander getrennt. Die genauen Gründe für die Schaumentstehung sind jedoch noch nicht erforscht. Normalerweise würden diese Schaumblasen von alleine wieder platzen, da sie dadurch einen energetisch günstigeren Zustand erreichen. Bestimmte oberflächenaktive Substanzen, wie z.B. Detergentien oder Proteine, sorgen aber für eine Stabilisierung dieser Blasen (Wilson, 1989). Besonders bei biotechnologischen Prozessen treten solche Substanzen verstärkt auf. Mit Hilfe von verschiedenen Maßnahmen versucht man daher die Schaumbildung zu bekämpfen. Alle Methoden sollen das gleiche Ziel erreichen: Durch Ablauf der intralamellaren Flüssigkeit oder durch Brechen der Lamellen soll die Stabilität der Schaumblasen gestört werden. Neben mechanischen Lösungen (Schaumseparator) werden zu diesem Zweck auch Antischaummittel verwendet. Hierbei handelt es sich um oberflächenaktive Substanzen mit begrenzter Löslichkeit (Bsp.: Siliconöle, Mineralöle, Pflanzenöle und -fette, Octyl- oder Butylalkohole, Propylenglykole). Die Schwierigkeit bei den Antischaummitteln ist allerdings, daß sie den Produktionsprozess unter Umständen negativ beeinflussen. So können sie z.B. die Sauerstoffversorgung der Bakterien stören. Außerdem dürfen sie für den Mikroorganismus nicht toxisch sein und müssen bei bestimmten Anwendungen nach dem Lebensmittelgesetz zugelassen werden. Deshalb wird eine Lösung angestrebt, bei der weniger oder gar keine chemischen Zusätze verwendet werden müssen.

Ursachen für die Entstehung von Schaum bei der Fermentation von *C. glutamicum* könnten u.a. die Bakterien selber sein, die durch hydrophobe Wechselwirkungen die ebenfalls hydrophoben Gasblasen stabilisieren und so zur Schaumbildung beitragen (Zhang *et al.*, 1992). Entscheidender Faktor wäre in diesem Fall die Zellwand, da sie als Hülle des Bakteriums die Verbindung zu dem sie umgebenden Medium darstellt. Dabei könnte der *S-layer*, der einen hohen Anteil an hydrophoben und sauren Aminosäuren enthält (Messner & Sleytr, 1992), als äußerste Schicht der Wand (Marienfeld, 1997; Peyret, 1993) oder die hydrophobe Mycolsäureschicht eine wichtige Rolle spielen. Veränderungen dieser Schicht könnten dann zu einer Änderung des Schaumverhaltens führen. Angriffspunkte für eine solche Veränderung auf genetischer Ebene wären demnach die Gene *csp1* und *cspB*, die für die am Aufbau der entsprechenden Schichten beteiligten Proteine PS1 und PS2 kodieren.

7 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032. Dazu sollten zunächst die aus *C. glutamicum* ATCC17965 bekannten Gene *csp1* und *cspB*, die für die Proteine PS1 und PS2 kodieren, identifiziert werden. Diese Proteine sind von Bedeutung, da PS1 als Mycolyltransferase am Aufbau der Mycolsäureschicht der Zellhülle beteiligt ist und PS2 als morphologische Untereinheit die *S-layer*-Schicht ausbildet, welche als äußere Schicht die Zelle umgibt. Durch Analyse des Genomprojektes von *C. glutamicum* ATCC13032, welches am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld angefertigt wurde, sollten weitere Gene identifiziert werden, die am Aufbau dieser Schichten beteiligt sein können. Durch Mutation der im Rahmen dieser Fragestellung gefundenen Gene sollte der Einfluß ihrer Proteine auf den Aufbau der Zellhülle des Bakteriums untersucht und ihre Funktion charakterisiert werden.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte durch gezielte Veränderung der Zellhülle eine *C. glutamicum* Mutante erzeugt werden, bei der die während der Fermentation des Bakteriums auftretende Schaumbildung reduziert ist.

III. Material und Methoden

1 Bakterienstämme und Plasmide

1.1 Bakterienstämme:

| Stamm | relevante Eigenschaften | Referenz |
|---|--|-----------------------------|
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | | |
| <i>C. g.</i> ATCC13032 | Wildtyp, Nx ^r | ATCC |
| <i>C. g.</i> ATCC17965 | „ <i>C. melassecola</i> “, Nx ^r | ATCC |
| <i>C. g.</i> RES167 | Wildtypderivat, $\Delta hsdR$, Nx ^r | A. Schäfer, Univ. Bielefeld |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta csp1$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp2$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta 4m8_018$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $csp3int$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , 5b22_054int (500bp internes Fragment in pCR2.1, chromosomal integriert) | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp4$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta 1m15_069$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp6$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta 2k5_039$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp7$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta 3f13_090$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp8$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta 4n21_045$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp9$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta 5o17_026$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , $\Delta csp1$, $\Delta 4m8_018$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1_csp2$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , $\Delta csp1$, $\Delta 4m8$ | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1_csp3int$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , $\Delta csp1$, 5b22_054int (500bp internes Fragment in pCR2.1, chromosomal integriert) | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp2_csp3int$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , $\Delta 4m8_018$, 5b22_054int (500bp internes Fragment in pCR2.1, chromosomal integriert) | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1_csp2_csp3int$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , $\Delta csp1$, $\Delta 4m8_018$, 5b22_054int (500bp internes Fragment in pCR2.1, chromosomal integriert) | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $csp1exp$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , replikatives Plasmid pCSP1 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1_csp1exp$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , $\Delta csp1$, replikatives Plasmid pCSP1 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> RES167_AS- | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , replikatives Plasmid pJC1 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> $\Delta csp1_AS-$ | $\Delta hsdR$, Nx ^r , Km ^r , $\Delta csp1$, replikatives Plasmid pJC1 | diese Arbeit |

| | | |
|---|---|--------------|
| <i>C. g.</i> Δ csp2_AS- | Δ hsdR, Nx ^r , Km ^r , Δ 4m8_018, replikatives Plasmid pJC1 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> Δ csp1_ Δ csp2_AS- | Δ hsdR, Nx ^r , Km ^r , Δ csp1, Δ 4m8_018, replikatives Plasmid pJC1 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> RES167_AS+ | Δ hsdR, Nx ^r , Km ^r , AEC ^r , replikatives Plasmid pJC50 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> Δ csp1_AS+ | Δ hsdR, Nx ^r , Km ^r , AEC ^r , Δ csp1, replikatives Plasmid pJC50 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> Δ csp2_AS+ | Δ hsdR, Nx ^r , Km ^r , AEC ^r , Δ 4m8_018, replikatives Plasmid pJC50 | diese Arbeit |
| <i>C. g.</i> Δ csp1_ Δ csp2_AS+ | Δ hsdR, Nx ^r , Km ^r , AEC ^r , Δ csp1, Δ 4m8_018, replikatives Plasmid pJC50 | diese Arbeit |

| | | |
|--|---|----------------------------|
| <i>Escherichia</i> | | |
| <i>E. coli</i> DH5 α MCR ¹ | F ⁻ endA1 supE44 thi-1 λ ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169 Φ 80dlacZ Δ M15 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) | Grant <i>et al.</i> , 1990 |
| <i>E. coli</i> S17-1 | Mobilisatorstamm, chromosomal integriertes RP4-2 Derivat (Tc::Mu; Km::Tn7), thi pro hsdR recA | Simon <i>et al.</i> , 1983 |

Tab.III.1: Verwendete Bakterienstämme

1.2 Plasmide

| Plasmid | relevante Eigenschaften | Referenz |
|---------------|--|------------------------------|
| pCR2.1 | käuflicher PCR-Produkt-Kloniervektor, Amp ^r , Km ^r | invitrogen |
| pCR2ZeroBlunt | käuflicher PCR-Produkt-Kloniervektor, Amp ^r , Km ^r | invitrogen |
| pK18mobsacB | mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor, Km ^r , lacZ α , mcs, sacB | Schäfer <i>et al.</i> , 1994 |
| pECXK99e | Shuttle-Expressionsvektor (<i>E. coli</i> , <i>C. glutamicum</i> : ColE1, pGA1), Km ^r , mcs (pUC18), Ptrc, lacI ^q , per | Kirchner, 1999 |
| pCSPexp | pECXK99e Derivat, csp1 inkl. RBS, Amp ^r , Km ^r | diese Arbeit |
| pJC1 | pZ1-Derivat (<i>E.coli</i> - <i>C.glutamicum</i> shuttle-Vektor), Km ^r , polylinker | Cremer <i>et al.</i> , 1991 |
| pJC50 | pJC1-Derivat; dapA, lysC α ; lysC β (Fbr); Km ^r | Cremer <i>et al.</i> , 1991 |

Tab.III.2: Verwendete Plasmide

2 Verwendete Primer

Alle Primer wurden bei der Firma ARK-Scientific synthetisiert.

| Name | Sequenz | Bemerkung |
|---------------|---|-------------------------------------|
| cspB-1 | CCA TgT CgT gAT CAg CCA TT | außerhalb 5'-cspB |
| cspB-2 | gAT AAg CCA CCT CCT TgA gA | intern |
| cspB-3 | ACC AAC ggC TTC AAC gAT gC | intern |
| cspB-4 | gCT gCg ATT gCT gCg ATg AT | intern |
| cspB-5 | CAg AAC ggC ACC gTT gAg gA | intern |
| cspB-6 | ggT TgC ACg CTC gAg gAA gA | außerhalb 3'-cspB |
| csp1-10 | gAT CTA-ggA TCC-CgA TgA gCg CgT CCA TgT gT | csp1-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1-11 | gAT CTA-ggA TCC-TCg ACC TTg Cgg TgC TgC TT | csp1-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1-del | ggA ATA CgT AgC CAC CTT Cgg TCC CgA AAg TTC CCC gCT t | csp1-Deletion |
| csp1ex1 | gAT CTA-ggA TCC-gCg CAg TAT CCA AAA ATC AA | csp1-Exp. (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1ex2 | gAT CTA-gTC gAC-CgT AgA TgC gCT TCA CTA TT | csp1-Exp. (<i>Sa</i> II-Ext.) |
| csp1li1 | AgT TCg TCg gTT CCT TCT CC | csp1-~500bp_int |
| csp1li2 | ATT CgT Tgg TCA ggC Agg Tg | csp1-~500bp_int |
| csp1_1m15_1 | gAT CTA-TCT AgA-TgC gAC ggA TAC CAA CCA gT | csp4-Deletion (<i>Xba</i> I-Ext.) |
| csp1_1m15_2 | gAT CTA-TCT AgA-Cgg AgA TCg CCT TgA Tgg AA | csp4-Deletion (<i>Xba</i> I-Ext.) |
| csp1_1m15_del | ATT gTg gCg TgT gAA CCT CC-ggC ATg CAC TCg TCA TAT CT | csp4-Deletion |
| csp1_2k5_1 | gAT CTA-ggA TCC-AAC gAT TCC ggC gAT gTC AA | csp6-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_2k5_2 | gAT CTA-ggA TCC-CCA ATg ATC gCg gCg TAA TA | csp6-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_2k5_del | AAC gAA TAA ggC CAg TgC TC-TCg AAC TCA gCA AgC CTT CA | csp6-Deletion |
| csp1_3f13_1 | gAT CTA-ggA TCC-TTg gCT ATT gTT gCT gCT GC | csp7-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_3f13_2 | gAT CTA-ggA TCC-gTg gTT ggC gAA gTT gTg TT | csp7-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_3f13_del | TTC CAT TCC ACg CAA TCA CC-CTA TCg TTg ACT TgC TCg Tg | csp7-Deletion |
| csp1_4m8_1 | gAT CTA-ggA TCC-gAA TAG gTC AgA AgC TCA gg | csp2-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_4m8_2 | gAT CTA-ggA TCC-gAT gAg gTT gAT ggC TAT gg | csp2-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_4m8_del | AgC CAC gAg TCT CTC TTC AA-CTC gTg AAC TTg Tgg TTg gT | csp2-Deletion |
| csp1_4n21_1 | gAT CTA-ggA TCC-ggC ACC TTg TAG ATA CgT gA | csp8-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_4n21_2 | gAT CTA-ggA TCC-CgC AAC Agg TTg TAG ATC TC | csp8-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_4n21_del | CAg CTT gTC ggA ATA CAT gC-ATg gCA CAT ATC ACg CgA gA | csp8-Deletion |
| csp1_5b22_1 | gAT CTA-ggA TCC-CAg Agg TTA TgC gCg ATC Ag | csp3-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_5b22_2 | gAT CTA-ggA-TCC CCT ggT gCA gTg gTg TCC AA | csp3-Deletion (<i>Bam</i> HI-Ext.) |
| csp1_5b22_del | AgA ATC Agg Agg AgC ACA ggg TAT ggA CCg CTg ATA CCT c | csp3-Deletion |
| 5b22li1 | AAC gCA Tgg CTC gTg gAT AC | csp3-~500bp_int |
| 5b22li2 | ACgCgAACTCCATCATCTg | csp3-~500bp_int |
| csp1_5o17_1 | gAT CTA-TCT AgA-GtG TAT TCA CCg CCA ACA gC | csp9-Deletion (<i>Xba</i> I-Ext.) |
| csp1_5o17_2 | gAT CTA-TCT AgA-CTC CAG CgT TCT gAT CAT Cg | csp9-Deletion (<i>Xba</i> I-Ext.) |
| csp1_5o17_del | CCA TCA CCA CAg CTT CAA gg-ggT gAT gTC CTg ATT CCg gT | csp9-Deletion |
| 5o17li1 | TCT TgC TgC ACA gTg CCA gT | csp9-~500bp_int |
| 5o17li2 | CCA TCg gAT gCA ACA gCT TC | csp9-~500bp_int |
| 5p3li1 | AAC CAT CgA CAT ggA gCC Ag | csp5-~500bp_int |
| 5p3li2 | AAT gAg CCg ACC gAg gAg TA | csp5-~500bp_int |

Tab.III.3: Auflistung der verwendeten Primer

3 Medien und Zusätze

3.1 Nährmedien

AEC-Minimalmedium (1 l) (Rossol & Pühlerm 1992):

- Basis: MM1
- AEC-HCl 8,5 g
- L-Threonin 0,5 g
- Substanzen in H₂O ansetzen und sterilfiltrieren

BHIS-Medium (Hirn-Herz-Sorbitol-Medium) (1 l):

- Brain-Heart-Infusion 37 g
- Sorbitol 91 g
- autoklavieren

LB (Luria Bertani):

- Trypton 1 % (w/v)
- Hefe-Extract 0,5 % (w/v)
- NaCl 0,5 % (w/v)
- pH 7,2
- Glucose Monohydrat 0,1 % - 0,5 % (w/v) (bei Bedarf)
- autoklavieren

Minimalmedium 1 (MM1) (1 l) (Katsumata *et al.*, 1984):

- (NH₄)₂SO₄ 1 % (w/v)
- Harnstoff 0,4 % (w/v)
- K₂HPO₄ 0,1 % (w/v)
- in 970 ml H₂O bidest. aufnehmen
- pH 7,2
- autoklavieren
- Zugabe von:
 - Glucose (50%) 50 ml
 - Thiamin 500 µg
 - Biotin 50 µg
 - MM1 Spurenelemente 1 ml

Müller-Hinton-Medium (MIC-Test) (1 l):

- Müller-Hinton Bouillon 21 g
- autoklavieren

PA (Penassay Broth):

- Antibiotic Medium No. 3 17,5 g/l
- autoklavieren

SOC (Regenerationsmedium):

- Hefe-Extract 0,5 % (w/v)
- Trypton 2% (w/v)
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- MgCl₂·6H₂O 10 mM
- MgSO₄·7H₂O 10 mM
- Glucose 20 mM
- autoklavieren

TYG (2x):

- Hefe-Extrakt 1 % (w/v)
- Trypton 1,6 % (w/v)
- NaCl 80 mM
- Glucose Monohydrat 01 % - 0,5 % (w/v)
- pH 7,5
- autoklavieren

3.2 Zusätze zu den Nährmedien

Agar:

- 1,5 % (w/v) für Festmedien

Antibiotika:

- Antibiotika werden als sterile Stammlösungen angesetzt (Sterilfiltration)

| Antibiotikum | Abk. | Lösungsmittel | <i>E. coli</i> | <i>C. glutamicum</i> |
|-----------------|------|--------------------------|----------------|----------------------|
| Ampicillin | Amp | H ₂ O bidest. | 100 | |
| Chloramphenicol | Cm | 98% Ethanol | 50 | 15 |
| Kanamycin | Km | H ₂ O bidest. | 50 | 25 |
| Ethambutol | Et | H ₂ O bidest. | | 12,5 |
| Nalidixinsäure | Nx | 0,4 N NaOH | - | 50 |
| Tetracyclin | Tc | 50% Ethanol | 10 | 8 |

Tab.III.4: Antibiotikakonzentration zur Primärselektion (µg/ml Medium)

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

- 20 mg/ml Stammlösung in Dimethylformamid
- 2 ml zu 1 l Medium geben oder 50 µl pro Festmediumsplatte auf die Oberfläche

Glycin:

- 20 % (w/v) Stammlösung in H₂O bidest.
- Sterilisation durch Autoklavieren

Isopropylthiogalactosid (IPTG):

- 100 mM Stammlösung: 0,238 g/ml
- in H₂O bidest.
- sterilfiltrieren

MM1-Spurenelemente

- FeSO₄ x 7H₂O 20 g/l
- MnSO₄ x 1H₂O 20 g/l
- NaCl 500 g/l
- in H₂O bidest. lösen
- autoklavieren

4 Puffer und Lösungen

4.1 DNA-Isolierung und -Reinigung

HB1:

- Glucose 50 mM
- TrisHCl 25 mM
- EDTA 10 mM
- pH 8,0
- autoklavieren

HB2:

- NaOH 0,2 N
- SDS 1 % (w/v)
- jeweils frisch zusammengeben

HB3:

- Na-Acetat 3 M
- pH 4,8 (mit Eisessig einstellen)

Kirby-Mix:

- Phenol 1 l
- 8-Hydroxychinolin 1,14 g
- m-Kresol 136,4 ml
- gesättigt mit TrisHCl 0,2 M
- pH 8,0

Phenol-Chloroform-Mix:

- 1:1 Mischung Kirby-Mix/Chloroform

SDS-Lösung:

- 20 % (w/v) in H₂O

4.2 DNA-Bearbeitung

Enzymverdünnungspuffer:

- Tris-HCl 10 mM
- NaCl 250 mM
- Dithioerythrit 1 mM
- Glycerin 50 % (w/v)

Ligationspuffer (10X):

- Tris-HCl 660 mM
- MgCl₂ 50 mM
- Dithioerythrit 10 mM
- ATP 10 mM
- pH 7,5

RNase-Lösung:

- 10 mg/ml RNase in H₂O-bidest
- 20-30 min kochen
- bei 4 °C aufbewahren

TA-Restriktionspuffer (10x):

- Tris-HCl 330 mM
- K-Acetat 660 mM
- Mg-Acetat 100 mM
- Dithiotreitol 5 mM
- BSA 0,1% (w/v)
- pH 7,5

TE-Puffer:

- Tris-HCl 10 mM
- EDTA 1 mM
- pH 7,5

TES-Puffer:

- Tris-HCl 50 mM
- EDTA 5 mM
- NaCl 50 mM
- pH 8,0

4.3 Elektrophorese-Puffer und -Lösungen

Agarose:

- 0,8 % - 4 % in TA-Elektrophoresepuffer

Bromphenolblau-Ladungspuffer (BPB):

- Glycerin 40 % (v/v)
- EDTA 1 mM
- Bromphenolblau 0,05 % (w/v)

Ethidiumbromid-Färbelösung:

- 10 mg/ml EtBr in H₂O

E1-F/Lysozym

- Saccharose 25 % (w/v)
- Ficoll 400 3 % (w/v)
- in TA-Elektrophorese ansetzen
- autoklavieren
- RNase (DNase-free) 10 µl/ml (frisch zugeben)
- Lysozym 2 mg/ml (frisch zugeben)

TA-Elektrophoresepuffer (50x):

- Tris-HCl 40 mM
- Na-Acetat 10 mM
- EDTA 1mM
- pH 7,8 (mit Eisessig einstellen)
- autoklavieren

4.4 Lösungen zur DNA-Amplifizierung durch PCR

dNTP-Mix (Stammlösung):

- dATP 2,5 mM
- dTTP 2,5 mM
- dGTP 2,5 mM
- dCTP 2,5 mM (↓ nächste Seite)

- in H₂O bidest. steril

Alle anderen Puffer werden den Kits der entsprechenden Polymerasen entnommen

4.5 DNA-Transfer

10 % Glycerin:

- 57,5 ml 87% Glycerin in 500ml H₂O bidest.
- Sterilisation durch Autoklavieren

15% Glycerin:

- 86,2 ml 87% Glycerin in 500ml H₂O bidest.
- Sterilisation durch Autoklavieren

TG-Puffer:

- TrisHCl 1 mM
- Glycerin 10 %
- in H₂O bidest.
- pH 7,5
- autoklavieren

4.6 Puffer und Lösungen für Vakuum-Blot und Hybridisierung

Antikörperkonjugat-Lösung:

pro Filter:

- Puffer 2 20 ml
- Anti-DIG-AP-Konjugat 4 µl bei NBT/X-Phosphat
 2 µl bei Chemielumineszenz

Blockingreagenz (10%-Stammlösung):

- Blockinreagenz 10% (w/v) in Puffer 1
- kurz aufkochen, autoklavieren und bei 4°C aufbewahren

Blotting-Puffer A (Depurinierung):

- HCl 0,25 N

Blotting-Puffer B (Denaturierung):

- NaOH 0,5 N
- NaCl 1,5 M
- jeweils frisch 1:1 aus doppelt konzentrierten Stammlösungen zusammensetzen

Blotting-Puffer C (Neutralisierung):

- Tris-HCl 1 M
- NaCl 2 M
- pH 7,0

Blotting-Puffer D/20fach SSC (Transfer):

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

Dehybridisierungs-Lösung:

- NaOH 0,2 M
- SDS 0,1 % (w/v)

Färbelösung:

- Puffer 3 10 ml
- NBT-Lösung 45 µl
- X-Phosphat-Lösung 35 µl

Puffer 1:

- Maleinsäure 0,1 M
- NaCl 0,15 M
- NaOH 7g (fest)
- pH 7,5

Puffer 2:

- 1% Blockinreagenz (1/10 Volumen 10%ige Stammlösung) in Puffer 1, je frisch ansetzen

Puffer 3:

- Tris-HCl 0,1 M
- NaCl 0,1 M
- MgCl₂·6H₂O 20 mM
- pH 9,5

Hybridisierungs-Lösung:

- SSC 5fach
- N-Lauroylsarkosin 0,1% (w/v)
- SDS 0,02% (w/v)
- Blockingreagenz 1%
- Lösung bei -20°C lagern

Lumigen-Lösung:

- Puffer 3 10 ml
- CSPD 100 µl
- bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

Stripping-Puffer:

- NaP_i 5 mM
- SDS 0,1 % (w/v)

Waschlösung A:

- 20fach SSC 100 ml/l
- 20% SDS 5 ml/l

Waschlösung B:

- 20fach SSC 10 ml/l
- 20% SDS 5 ml/l

Waschpuffer:

- Tween-20 0,3% (v/v) in Puffer 1

4.7 Lösungen für Proteinextrakte

Aufschlußpuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer):

- 49,7 ml 1M K₂HPO₄-Lösung
- 50,3 ml 1M KH₂PO₄-Lösung
- mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen
- pH 6,8
- Puffer autoklavieren
- 0,5 mM Dithiotreitol (DTT) zugeben

DNaseI-Lösung:

- 1 mg/ml DNaseI in H₂O bidest. lösen
- Lösung sterilfiltrieren

Extraktionspuffer (100 ml):

- TrisHCl 10 mM
- CHAPS 4 %
- in H₂O bidest.
- pH 6,8
- autoklavieren

Extraktionspuffer (b) (100 ml):

- TrisHCl 60 mM
- SDS 4 %
- in H₂O bidest.
- pH 6,8
- autoklavieren

4.8 Lösungen für Protein-Darstellung

Equilibrierungspuffer 1 (EB1):

- Tris HCl 50 mM
- Harnstoff 6 M
- Glycerol 30 % (v/v)
- SDS 2 %
- DTT 1 % (frisch dem Aliquot vor Gebrauch zugeben)
- in H₂O bidest. ansetzen
- pH 6,8
- nicht über 30 °C erwärmen
- Aliquots (40 ml) bei -20 °C lagern

Equilibrierungspuffer 2 (EB2):

- Tris HCl 50 mM
- Harnstoff 6 M
- Glycerol 30 % (v/v)
- SDS 2 %
- Iodoacetamid 4,5 % (frisch dem Aliquot vor Gebrauch zugeben)
- Bromphenolblau Spuren
- in H₂O bidest. ansetzen
- pH 8,8
- nicht über 30 °C erwärmen
- Aliquots (40 ml) bei -20 °C lagern

Fixierer (1 l):

- Ethanol 300 ml
- Eisessig 100 ml
- mit H₂O auffüllen

Färbelösung (1 l):

- Coomassie Brilliant Blue R250 2,0 g
- Coomassie Brilliant Blue G250 0,5 g
- Ethanol 425 ml
- Methanol 50 ml (↓ nächste Seite)

- Essigsäure 100 ml
- H₂O dest. 425 ml
- Über Nacht unter rühren lösen, gegebenenfalls vor dem Gebrauch filtrieren

Langsam-Entfärber (1 l):

- Essigsäure 7 %
- mit H₂O auffüllen

Probenpuffer PBJR (5x) (50 ml):

- Tris HCl (pH 6,8) 10,6 ml
- EDTA 0,372 g
- Glycerin (87 %) 10,49 ml
- SDS 5 g
- β -Mercaptoethanol 20 ml
- Bromphenolblau 0,025 g
- in H₂O bidest. ansetzen
- Aliquots in Eppis bei -20 °C lagern

Rehydrationpuffer:

- Harnstoff 9 M
- CHAPS 2 %
- Pharmalyte 2% (frisch dem Aliquot vor Gebrauch zugeben)
- Bromphenolblau Spuren
- DTT 0,28 % (frisch dem Aliquot vor Gebrauch zugeben)
- in H₂O bidest. ansetzen
- nicht über 30 °C erwärmen
- Aliquots (500 μ l) bei -20 °C lagern

SDS-Laufpuffer (1 l):

- Tris Base 3,025g
- Glycin 14,4 g
- SDS 1 g

Schnell-Entfärber (1 l):

- Ethanol 45 %
- Essigsäure 10 %
- H₂O dest. 75 %

4.9 Lösungen für Semi-Dry-Blot / Western-Blot

Towbin-Transferpuffer:

- TrisBase 48 mM

- Glycin 39 mM (↓ nächste Seite)
- Methanol 20 % (v/v)
- SDS 0,04 % (w/v)
- mit H₂O dest. auffüllen

PBS (10 x):

- NaCl 1,4 M
- KCl 27 mM
- Na₂HPO₄ 10 mM
- KH₂PO₄ 18 mM
- mit H₂O dest. auffüllen
- pH 7,3

TBS (10 x):

- NaCl 1,5 M
- TrisHCl 200 mM
- mit H₂O dest. auffüllen
- pH 7,5

Färbelösung:

- 1 Tablette DAB (Di-Amino-Benzidin) in 20 ml TBS (1x) auflösen
- Lösung 10 min im Dunkeln inkubieren
- Zugabe von 30 µl H₂O₂
- Zugabe von 2 mM NiCl₂

Stopplösung:

- Natriumazid 2 mM
- in H₂O bidest.

4.10 Lösungen für „in Gel“ tryptischer Verdau

T-Wasch-A:

- CH₃CN 50 % (v/v)
- in H₂O dest.

T-Wasch-B:

- CH₃CN 50 % (v/v)
- NH₄HCO₃ 50 mM
- in H₂O

T-Wasch-C:

- CH₃CH 50 % (v/v)
- NH₄HCO₃ 10 mM
- in H₂O

5 Enzyme, Chemikalien und anderes Material

5.1 Enzyme, Marker

Alle hier nicht aufgeführten Enzyme entstammen einem der verwendeten Kits.

| | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Anti-Rabbit-HRP | Roche |
| DNA molecular weight marker X | Roche |
| Klenow-DNA-Polymerase | Roche |
| Lysozym | Serva |
| MALDI-Längenstandard | Sigma |
| PronaseE | Serva |
| Protein Marker 12 | Novex |
| Pwo-Polymerase | Roche |
| Pfu-Polymerase | Stratagene |
| Red-Taq-DNA-Polymerase | Sigma |
| Restriktions-Endonukleasen | Amersham, NEB, Roche, Stratagene |
| RNase DNase-free | Roche |
| Taq-DNA-Polymerase | Qiagen |
| Trypsin (modified) | Promega |
| T4-DNA-Ligase | Roche |

5.2 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen oder entstammen einem der verwendeten Kits.

| | |
|---|-----------|
| α-Cyano-4-Hydroxycimtsäure-Lösung | Sigma |
| 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid (X-Gal) | GIBCO BRL |
| Agar | GIBCO BRL |
| Agarose (Standard) | GIBCO BRL |
| Antibiotic Medium No. 3 | Oxoid |
| Antischaummittel Clerol (silikonfreier Methylester) | Degussa |
| Brain-Hearth-Infusion | Merck |

| | |
|--|-----------------|
| Bromphenolblau (BPB) | Serva |
| Coomassie®Billiant Blue G250 | Serva |
| Coomassie®Billiant Blue R250 | Serva |
| Diaminobenzidin-Tabletten | Sigma |
| Dithiotreitol (DTT) | Serva |
| dNTP | Roche |
| Etidiumbromid (EtBr) | Serva |
| Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) | Amersham |
| IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) | Serva |
| Li-Salz (4-Methylumbelliferyl-Phosphat | Sigma |
| Magermilchpulver | Glücksklee |
| Müller-Hinton-Bouillon | Merck |
| β-Mercaptoethanol | Roth |
| Pharmalyte | Amersham |
| Phenol | Roth |
| Ponceau-S-Lösung | Sigma |
| Rinder-Serumalbumin (BSA) | Serva |
| Sephadex G50 | Amersham |
| Tris | Sigma, Amersham |
| Tween20 | Sigma |

5.3 Kits

| | |
|---------------------------------|------------|
| Bradford Proteinbestimmung | BioRad |
| QIAEX II Agarose Gel Extraction | QIAGEN |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | QIAGEN |
| PCR-Purifikation Kit | QIAGEN |
| Topo-TA-Cloning Kit | Invitrogen |
| Topo-Blunt-Cloning Kit | Invitrogen |

5.4 Materialien

| | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 3MM Papier | Whatman |
| buffer-stripes (+ / -) | Amersham |
| Dialyseschläuche | Spectrum Laboratories, Inc. |
| Eppis | Greiner |
| Electroporations-Küvetten (0,2 cm) | BioRad |
| Glaswaren | Schott |
| HPTLC-Platten (G60) | Merck |
| IPG-Streifen (alle pH-Bereiche) | Amersham |
| Mikrotiterplatten | Greiner |

| | |
|--|----------------------------|
| Nitrocellulose Filter | Sartorius, Gelman-Sciences |
| PE-Röhrchen (12 u. 50 ml) | Greiner |
| Petrischalen | Greiner |
| Photometer Küvetten | Greiner |
| Pipettenspitzen | Greiner |
| Polystar PE-Schlauchfolien | Rische und Herfurth GmbH |
| SDS-PA-Gradientengele (Excel-Gel für 2D) | Amersham |
| Sterilfilter | Sartorius |
| Ultrafree®-4-Centrifugal Filter | Millipore |
| Ultrafree®-15-Centrifugal Filter | Millipore |

5.5 Geräte

| | |
|---|--------------------------|
| Biofuge | Haraeus |
| Brutschränke | Memmert |
| Tischzentrifuge | Eppendorf |
| Tischkühlzentrifuge | Eppendorf |
| Feinwaagen | Sartorius |
| Gene Pulser™, Pulse Controller | BIO RAD |
| Hybridisierungsöfen | Bachofer, shell lab |
| IPGPhor | Amersham |
| Kühlzentrifuge J2-21 | Beckmann |
| Luftschüttler | New Brunswick, Gerhardt |
| MALDI-TOF | Bruker |
| Mighty Small SE260b Dual Gel Caster | Hoefler |
| MultiphorII | Amersham |
| pH-Meter | Knick |
| Photometer λ -3 | Perkin-Elmer |
| Pipettman | Gillson |
| Powersupply | Amersham |
| Ribolyser | Hybaid |
| Schweißgerät Polystar 242 | Rische und Herfurth GmbH |
| Shaker Swip | Edmund Bühler |
| Spectro-Photometer 4060 | LBK Biochrom |
| Thermocycler (PCR) | MJ Research |
| Tischzentrifuge | Hermle |
| Trans-Blot®Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell | BioRad |
| UV-Transilluminator | UVP |
| Vakkum-Blot-Kammer | Amersham |
| Videoprinter P67E | Mitsubishi |
| Wasserbäder | Kottermann |

6 Kultivierung von Bakterien und mikrobiologische Tests

6.1 Anzucht von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien auf Festmedien erfolgt durch Ausstreichen von Einzelkolonien und anschließender Inkubation im Brutschrank. Dabei liegt die Inkubationstemperatur und Dauer von *E. coli* bei 37°C ü/N, von *C. glutamicum* bei 30°C für 2-4 d.

Zum Anlegen von Stammpplatten auf Festmedien wird auf einer Hälfte einer Agarplatte mit einer sterilen Glas-Pipette eine Einzelkolonie ausgestrichen. Mit einer neuen sterilen Pipette wird senkrecht zum ersten Strich und ausgehend von diesem ein weiterer Strich gezogen, senkrecht zu diesem ein dritter. Auf diese Weise werden die Bakterien soweit verdünnt, daß man nach Inkubation bei entsprechenden Bedingungen Einzelkolonien erhält.

Die Kultivierung der Bakterien in Flüssigmedien erfolgt durch Animpfung einer Einzelkolonie vom Festmedium. Kulturen von 5-10ml werden im Reagenzglas im Roller, größere Mengen im Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei ca. 150-200 rpm angezogen. *E. coli* wird ü/N bei 37°C bis zur Stationärphase inkubiert. Für *C. glutamicum* wird ü/N bei 30°C eine Vorkultur angezogen, die 1:100 in frischem Medium als Hauptkultur 1-2 d bei 30°C zur stationären Phase wächst.

6.2 Lagerung von Bakterien

Festmedium-Platten mit Bakterienkulturen können einige Wochen bei 4°C gelagert werden, wobei sie mit Parafilm vor dem Austrocknen geschützt werden sollten. Durch regelmäßiges Umimpfen auf entsprechende Selektionsplatten kann die Aufbewahrungsdauer verlängert werden.

Eine dauerhafte Lagerung der Bakterien erfolgt in Glycerinkultur. Dazu werden 1,5 ml frische stationäre Flüssigkultur pelletiert (bzw. eine Einzelkolonie von Selektionsplatte abgenommen), in einem Eppendorfgefäß in 200 µl LB/G resuspendiert und mit 500 µl sterilem 87 %igem Glycerin vermischt. Die Kulturen können so bei -20°C gelagert werden.

6.3 Bestimmung des Bakterientiters

Das Wachstum von Bakterien in einer Flüssigkultur wird durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm in einem Spektralphotometer verfolgt. Als Referenz dient steriles Nährmedium. Dabei entspricht eine $o.D._{580}$ von 1 bei *C. glutamicum* erfahrungsgemäß einem Lebenditer von ca. $1 \cdot 10^8$ Zellen pro ml, bei *E. coli* von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml.

Um den exakten Lebendtiter zu bestimmen, muß eine Verdünnungsreihe angelegt, ausplattiert und nach Inkubation ausgezählt werden.

6.4 MIC-Test

Beim MIC-Test handelt es sich um einen international anerkannten klinischen Test, bei dem die minimale inhibierende Konzentration eines bestimmten Antibiotikums auf einen zu untersuchenden Bakterienstamm bestimmt wird. Mit dieser Methode läßt sich die Sensitivität eines Mikroorganismus auf beliebige Antibiotika eindeutig quantifizieren, indem festgestellt wird, ab welcher Antibiotikumkonzentration der Stamm praktisch kein Wachstum mehr aufweist (= MIC-Wert).

- Vorkultur in Müller-Hinton-Medium (MH)
- Vorbereiten von Reagenzgläsern mit je 10 ml MH-Medium
- Anlegen einer geeigneten Konzentrationsreihe mit den gewünschten AB's in vorgelegtem MH-Medium
 - Konzentration beginnend mit 0,125 µg/ml (oder nach Bedarf) AB
 - nächste Konzentrationsstufe enthält doppelte Menge AB
 - letzte Konzentrationsstufe je nach Bedarf
- Reagenzgläser aus der Vorkultur animpfen ($5 \cdot 10^5$ Zellen / ml)
- Anzucht ü/N im Roller
- messen der o.D.₅₈₀
- für die Auswertung wird der o.D.₅₈₀-Wert der Kontrolle ohne AB jeweils auf 100% gesetzt

7 Isolierung von DNA

7.1 HB-Lyse zur Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* (modifiziert nach Ish-Horowitz & Burke, 1981)

Durch Detergenz und NaOH-Behandlung wird die Zellwand aufgelöst (bei gram-positiven Bakterien muß diese zuerst durch Lysozymbehandlung aufgelöst werden) und der Zellinhalt freigesetzt, wobei die DNA aufgrund des alkalischen Milieus denaturiert. Durch nachfolgende Zugabe von 3 M Na-Acetat wird der pH-Wert abgesenkt, was zum Ausfällen der Proteine und zur Renaturierung der DNA führt. Die chromosomale DNA vernetzt dabei und wird mit den Proteinen abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA kehrt in ihre superhelicale Form zurück und wird mit Alkohol gefällt.

- Kultur ü/N bei 37°C selektiv anziehen (Flüssig- oder Festmedium)
- bei Flüssigkultur:
 - 3 ml Kultur im Eppi bei 13.000 rpm für 3 min pelletieren
 - Überstand vollständig abziehen
 - Pellet in in 200 µl HB1-Lösung resuspendieren
- bei Festmedium:
 - Platte mit 0,1-Glaspipette abkratzen

- in 200 µl HB1-Lösung resuspendieren
- 400 µl HB2-Lösung zugeben, Eppi sofort invertieren (bis die Lösung aufklart)
- 5 min Inkubation bei RT
- 300 µl HB3-Lösung zugeben, Eppi sofort invertieren
- 15 min bei 13.000 rpm abzentrifugieren (optimale Temp.: 10°C)
- Überstand in neues Eppi überführen
- bei Bedarf 1-2mal phenolisieren
- DNA mit Isopropanol (-20°C) fällen (Eppi auffüllen, optimal 1 ml)
- 20 min bei 13.000 rpm abzentrifugieren, Überstand abgießen
- DNA mit 0,5 ml 70 % EtOH waschen (vortexen)
- 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugieren, Überstand quantitativ entfernen
- DNA ca. 3 min bei 60°C im offenen Eppi trocknen und in 50 µl sterilem H₂O lösen

7.2 Gesamt-DNA-Isolierung aus *C. glutamicum*

(nach Altenbucher & Cullum, 1984)

Durch eine kombinierte Behandlung mit Lysozym und einem Detergenz werden die Zellen sphäroblastiert und dann lysiert. Mittels PronaseE-Einwirkung und Phenolisierung werden die Proteine extrahiert, die DNA wird anschließend durch Ethanol-fällung aufgereinigt.

- 25 ml LB/G-Medium mit einer Einzelkolonie animpfen und ü/N bei 30°C im Roller selektiv inkubieren
- 10 ml Kultur in 10 ml PE-Röhrchen überführen
- 5 min bei 3000 rpm in Hermle-Tischzentrifuge pelettieren
- Pellet in 10ml TES resuspendieren, erneut 5min bei 3000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 3 ml HB1 mit 20 mg/ml Lysozym (frisch ansetzen) resuspendieren
- 2 h bei 37°C im Roller inkubieren
- 200 µl 20% SDS zugeben und vorsichtig invertieren, bis Lösung aufklart
- 5 min auf Eis
- Spatelspitze PronaseE zugeben, 1-2 h bei 37°C im Roller inkubieren
- 3ml Phenol/Chloroform zugeben und vorsichtig invertieren
- 10 min bei 8.000 rpm bei 4°C im JA20-Rotor abzentrifugieren
- Überstand vorsichtig mit abgeschnittener blauer Spitze abnehmen und in neues PE-Röhrchen überführen
- Phenolisierungsvorgang nochmals mit 2 ml Phenol/Chloroform wiederholen
- Überstand mit 98% EtOH (-20°C) auf 12 ml auffüllen, invertieren bis DNA ausfällt
- 15 min bei 10.000 rpm bei 4°C im JA20-Rotor abzentrifugieren
- Pellet in 5 ml 70% EtOH waschen
- 15 min bei 10.000 rpm im JA20- Rotoer abzentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen und verwerfen
- Pellet bei 60°C trocknen und ein 100-300 µl H₂O oder TE lösen, DNA bei 4°C lagern

7.3 Isolation von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA mit Hilfe von „Kits“

Bei der Isolation von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA werden auch häufig käufliche „Kits“ verwendet. Der Vorteil dieser „Kits“ liegt neben der Zeitersparnis in der besonders reinen DNA-Aufreinigung. Die Funktionsweise „Kits“ beruht auf dem der alkalischen Lyse, wobei nach einer alkalischen Lyse der Zellen die Proteine und Zellwandbestandteile gefällt und die DNA somit extrahiert werden kann. Der Plasmid bzw. Cosmidhaltige wäßrige Überstand wird dann durch eine Anionenaustauschersäule nochmals gründlich aufgereinigt.

Die Isolierungsprozedur erfolgt entsprechend der jeweiligen Herstellerprotokolle.

8 Reinigung von DNA

8.1 Phenolisierung

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die mit Proteinen verunreinigte DNA wird in zwei Schritten mit 1:1 bis 1:3 Volumen Kirby-Mix und Phenol/Chloroform versetzt. Nach gutem Durchmischen liegen die Proteine in der phenolischen Phase vor. Durch Zentrifugation werden die Phasen getrennt, danach kann die obere DNA-haltige Phase abgezogen werden. Durch Alkoholfällung oder Sephadex G50 Säulenchromatographie werden die Phenolreste entfernt.

8.2 Sephadex G50 Säulenchromatographie

(Sambrook *et al.*, 1989)

Mit Hilfe dieser Methode können Substanzen aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts getrennt werden. Durch das Ausschlußvolumen der Poren des Säulenmaterials können kleinere Moleküle wie Salze, Nukleotide oder Phenol, im Gegensatz zu den DNA-Makromolekülen (> 80 Nukleotide), in das Material eindringen. Auf diese Weise wird die DNA von den Verunreinigungen bei Durchfluß durch die Säule getrennt.

- ca, 2,5 Löffel Sephadex G50 Pulver in H₂O bidest quellen lassen und auto-klavieren
- zur Silikonisierung von Glaskügelchen (Ø ca. 1 mm):
- in Silikonlösung tränken, Lösung anschließend abgießen
- Kügelchen 1 h in offenem Gefäß bei 100°C backen
- silikonisiertes Kügelchen in blaue Spitze geben, diese in Weichagarröhrchen stellen
- 500 µl Sephadex G50 zugeben
- 10 min bei 3.000 rpm in Hermle-Tischzentrifuge zentrifugieren (Entfernen der Flüssigkeit)
- Spitze in neues Röhrchen stellen, DNA-Lösung auf das trockene Sephadex geben

- erneut für 10-15 min zentrifugieren, durchgeflossene DNA-Lösung weiterverwenden

8.3 Entfernen von RNA

Häufig ist es notwendig (z.B. bei der Restriktionsanalyse) die bei der DNA-Isolierung mit isolierte RNA zu entfernen. Dazu wird die DNA mit 1 U RNase / μg DNA versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die RNase-Behandlung kann auch schon bei der HB-Lyse erfolgen, indem man HB1 mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase (frisch ansetzen) verwendet, oder zusammen mit der Restriktionsspaltung durchgeführt werden.

8.4 DNA-Konzentration durch Alkoholfällung

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die DNA wird entweder mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2,5fachem Volumen 98% EtOH oder mit 3 M NaAC pH 4,8 und einfachem Volumen Isopropanol gefällt (RT oder -20°C) und durch Zentrifugation pelletiert. Durch Waschen mit 70% EtOH werden mitgeführte Salze entfernt. Nach erneuter Zentrifugation und quantitativem Entfernen des EtOH kann die DNA bei RT getrocknet, in einem geeigneten Volumen H₂O oder TE resuspendiert und 2 min bei 65°C gelöst werden.

9 DNA-Analysen

9.1 Agarose-Gelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente. Dabei wandert die DNA als negativ geladenes Molekül im elektrischen Feld, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig ist von der Molekülgröße, der DNA-Konformation, der Agarosekonzentration und der angelegten Feldstärke. Nach Versetzen mit Bromphenolblau-Ladungspuffer kann die DNA in die Taschen gefüllt werden, wobei BPB auch als Anhaltspunkt über die zurückgelegte Laufstrecke dient. Nach Färbung mit Ethidiumbromid kann das Gel im UV-Durchlicht fotografiert werden.

- 0,4 - 4% Agarose (je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente) in TA-Elektrophoresepuffer aufkochen
- Agarose in Gelkammer füllen und geeigneten Kamm einsetzen
- Gel nach dem Auspolymerisieren mit TA-Elektrophoresepuffer überschichten und Kamm entfernen
- DNA-Probe mit ca. 3 μl BPB-Mix versetzen und in Geltaschen füllen

- Gel bei 50-100 V laufen lassen
- Gel ca. 5 min in EtBr-Lösung (5 µg/ml) färben, wässern und unter UV-Durchlicht fotografieren

9.2 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Laufstrecke eines linearen DNA-Fragmentes ist umgekehrt proportional zum natürlichen Logarithmus des Molekulargewichts. Durch Laufstreckenvergleich mit einem als Referenz auf das Gel aufgetragenen Längenmarker (z.B. „DNA Molecular Weight Marker X“ von Boehringer) kann die Größe von DNA-Fragmenten bis auf ca. 100 bp genau bestimmt werden.

9.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit Hilfe dieser Methode können definierte DNA-Fragmente nach der Auftrennung im Agarosegel wieder isoliert werden. Dazu wird das Gel zunächst leicht mit EtBr angefärbt und die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die anschließende Trennung erfolgt mit einem entsprechenden Kit wie z.B. „QIAEX II Agarose Gel Extraction“ (QIAGEN) oder „Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids“ (Macherey-Nagel). Dabei verfährt man entsprechend der Herstellerprotokolle.

9.4 Eckhardt-Lyse von *E. coli* (Eckhardt 1978, modifiziert)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine modifizierte Agarose-Gelelektrophorese, mit der sehr schnell der Plasmidgehalt und die Plasmidlänge rekombinater Klone untersucht werden kann. Durch Lysozym und SDS-Einwirkung erfolgt die Lyse der Zellen erst in den Geltaschen. Während die Plasmid-DNA bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung in das Gel einlaufen kann, bleibt die chromosomale DNA in den Taschen zurück. Durch Auftragen einer Kontrollsuspension von Stämmen mit Plasmiden bekannter Größe, können Rückschlüsse auf die Größe der untersuchten Plasmide gemacht werden.

Gelvorbereitung:

- 0,8-1% Agarose in TA-Elektrophoresepuffer aufkochen
- SDS in einer Endkonzentration von 0,2% zugeben
- Gel mit großen Taschen gießen und auspolymerisieren lassen

Lyse der Zellen:

- pro Lyse 10 µl TA-Elektrophoresepuffer in Mikrotiterplatte geben

- wenige Zellen einer *E. coli* Einzelkolonie mit einem Zahnstocher von der Platte abnehmen und in dem Puffer resuspendieren
- 20 µl E1-F/Lysozym-Lösung zugeben, vermischen und in Taschen pipettieren
- BPB in zwei Taschen als Laufmarker einfüllen
- Gel-Vorlauf für 15-30 min bei 20 V bis Taschen völlig klar
- Gel-Hauptlauf für 2-3 h 120 V

10 Klonierungsexperimente

10.1 DNA-Restriktion

Bei dieser Methode wird DNA von Restriktionsendonukleasen (TypII) innerhalb bestimmter palindromischer Sequenzen gespalten. Dabei entstehen entweder glatte („blunt-ends“) oder versetzte Enden („sticky-ends“).

Die Spaltung der DNA mit einer solchen Restriktionsendonuklease erfolgt nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen unter Verwendung des mitgelieferten Restriktionspuffers. Alternativ können auch TA-Restriktionspuffer oder „One-Phor-All Buffer PLUS“ eingesetzt werden. Die Inaktivierung des Enzyms kann durch Hitzebehandlung, Einfrieren oder Phenolisieren erfolgen.

10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“ – PCR) ist eine *in-vitro* Methode zur gezielten enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Diese wird durch sich wiederholende, automatisierte Zyklen erreicht, wobei sich pro Durchgang die Anzahl der DNA-Kopien idealerweise verdoppelt. Dies führt zu einer exponentiellen Anreicherung des durch die *Primer* eingegrenzten *Target*-Fragmentes.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten. Durch Hitzedenaturierung wird die DNA im ersten Schritt in Einzelstränge zerlegt. Es folgt das *Annealing*, bei dem durch Absenkung der Temperatur die *Primer* an ihre spezifische Zielsequenz binden. Im dritten Schritt katalysiert eine thermostabile Polymerase bei 72 °C die Polymerisierung des neuen DNA-Strangs. In der PCR werden spezifische *Primer* eingesetzt, die jeweils komplementär zu den Enden eines gewünschten DNA-Fragmentes sind. Die Orientierung der *Primer* wird so gewählt, daß das zwischen ihnen liegende DNA-Fragment durch Polymerisierung an den *Primern* synthetisiert und somit amplifiziert wird. Neben *Primern* und einer thermostabilen Polymerase (hier *Taq* / *Pfu* / *Pwo*) werden für den PCR-Reaktionsansatz Desoxynukleotide, ein magnesiumhaltiger Puffer und die *Template*-DNA benötigt.

Eine Besonderheit der *Taq*- und *Pfu*-DNA-Polymerase ist, daß sie matrizenunabhängig stets einen Adenosinrest an das Amplifikat anhängt. Das erleichtert das Klonieren in spezielle linearisierte Vektoren, welche einen 3'-T-Überhang an der Insertionsstelle besitzen (z.B. pCR2.1). Das PCR-Produkt kann so direkt über das 3'-A-sticky-end in den Vektor kloniert werden. Die *Pwo*-Polymerase erzeugt dagegen *blunt-ends*, so daß das PCR-Produkt auch *blunt* kloniert werden muß. *Pwo* und *Taq* verfügen im Gegensatz zur *Taq* über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proof-reading*), wodurch die Fehlerrate bei der Amplifikation deutlich geringer liegt.

10.3 Primer Design

Die Qualität der *Primer* spielt für die Effizienz und Qualität der PCR eine wichtige Rolle. Deshalb sollte bei der Auswahl der *Primer* einige Regeln beachtet werden (McPherson *et al.*, 1995). Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, sollten die *Primer* eine Länge von mindestens 18 Nukleotiden (nt) haben, ab einer Länge von 30 nt ist jedoch keine Zunahme der Spezifität zu erwarten. Länge und *Annealing*-Temperatur beider *Primer* sollten möglichst identisch sein, wobei der GC-Gehalt zwischen 50 und 60 % liegen sollte. Zur einfachen Berechnung der *Annealing*-Temperatur kann folgende Formel verwendet werden:

$$T_m \text{ } ^\circ\text{C} = [(\sum G + C) * 4 \text{ } ^\circ\text{C} + (\sum A + T) + 2 \text{ } ^\circ\text{C}] - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Extensionen (wie z.B. Schnittstellen) werden am 5'-Ende angehängt. An beiden Enden des *Primers* sollte sich kein Poly-T-Bereich befinden, da Thymidin-Reste zur Ausbildung unspezifischer Bindungen neigen. Um diese und weitere Kriterien, wie die Bildung von Haarnadelstrukturen und *Primerdimeren*, berücksichtigen zu können, werden spezielle Computerprogramme (z.B. *Primer-Designer 2.2*) verwendet.

10.4 PCR-Reaktionen

Taq- / *Pfu*-Polymerasen:

PCR-Ansatz (50 µl):

- Polymerasepuffer (mit Mg) 5 µl
- d-NTP-Mix 2 µl
- Primer 0,5 µl (je)
- Template-DNA 0,5 µl
- Polymerase 0,25 µl – 0,5 µl
- auffüllen mit sterilem H₂O bidest.

PCR-Programm:

1. 3 min 94 °C Vorlauf

- | | | | |
|----|--------------|------------------|--|
| 2. | 15 sec | 94 °C | Denaturierung des DNA-Doppelstranges |
| 3. | 20 sec | 50-60 °C | <i>Annealing</i> der <i>Primer</i> (Angaben beachten) |
| 4. | 1 min | 72 °C | Polymerisation (Polymer.geschw. u. Amplifikatlänge beachten) |
| 5. | Schritte 2-4 | 32 x wiederholen | |
| 6. | 3 min | 72 °C | Extensionsschritt |
| 7. | ∞ | 4 °C | Kühlen |

Pwo-Polymerase:

PCR-Ansatz (100µl):

- *Pwo*-Puffer (mit Mg) 10 µl
- d-NTP-Mix 4 µl
- Primer 0,5 µl (je)
- Template-DNA 1 µl
- *Pwo*-Polymerase 0,5 µl
- auffüllen mit sterilem H₂O bidest.

PCR-Programm:

- | | | | |
|-----|--------------|---|--|
| 1. | 2 min | 94 °C | Vorlauf |
| 2. | 15 sec | 94 °C | Denaturierung |
| 3. | 20 sec | 50-60 °C | <i>Annealing</i> der <i>Primer</i> (Angaben beachten) |
| 4. | 1 min | 72 °C | Polymerisation (Polymer.geschw. u. Amplifikatlänge beachten) |
| 5. | Schritte | 2-4 | 9 x wiederholen |
| 6. | 15 sec | 94 °C | Denaturierung |
| 7. | 20 sec | 50-60 °C | <i>Annealing</i> der <i>Primer</i> (Angaben beachten) |
| 8. | 1 min | 72 °C | Polymerisation (Polymer.geschw. u. Amplifikatlänge beachten) |
| 9. | Schritte 6-8 | 14 x wiederholen (+ 20 sec / Zyklus bei Schritt 8.) | |
| 10. | 10 min | 72 °C | Extensionsschritt |
| 11. | ∞ | 4 °C | Kühlen |

Eppendorf-Taq-Polymerase:

Verfahren wie Taq-Polymerase. Zusätzlich wird jedoch „Eppendorf-Taq-Enhancer“ zugegeben (1:5), die Amplifikation erfolgt dabei wesentlich sensitiver (z.B. für Integrations-Deletion-Schnelltests).

10.5 DNA-Ligation

Bei der Ligationsreaktion werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts von DNA-Molekülen mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen miteinander

verknüpft. Auf diese Weise können beliebige DNA-Fragmente mit kompatiblen „sticky-ends“ oder „blunt-ends“ ligiert werden.

- ggf. Restriktionsenzyme mit geeigneten Methoden inaktivieren
- ca. 1 µg gespaltene Vektor-DNA
- x µg Insert-DNA (molares Insert-Vektor-Verhältnis sollte zwischen 2:1 und 10:1 liegen)
- 3 µl 10x Ligationspuffer (Endkonzentration ATP: 1 mM)
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- mit sterilem H₂O auf 30 µl auffüllen
- die Ligation erfolgt ü/n bei 4°C in einer Thermoskanne, die mit normal temperiertem Leitungswasser gefüllt ist

10.6 Identifizierung rekombinanter Plasmide durch α -Komplementation (Sambrook *et al.*, 1989)

Diese Methode macht sich zunutze, daß die Umsetzung des Indikatorsubstrates 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-gal) durch das *lacZ*-Genprodukt β -Galactosidase zu einer Blaufärbung führt. Die verwendeten Wirtsstämme (*E. coli* DH5 α oder *E. coli* DH5 α MCR) sind aufgrund einer Mutation im *lacZ* α -Genfragment nicht mehr in der Lage eine funktionstüchtige β -Galactosidase zu synthetisieren. Da die Kloniervektoren jedoch ein *lacZ* α -Genfragment tragen, kann das α -Peptid mit dem chromosomal codierten *lacZ* Δ M15-Genprodukt reassoziieren, wodurch wieder eine funktionstüchtige β -Galactosidase zur Verfügung steht. Durch die Klonierung eines Fragmentes in die „multiple-cloning-site“ eines solchen Kloniervektors wird jedoch das *lacZ* α -Genfragment unterbrochen. Auf diese Weise lassen sich rekombinate Klone auf X-gal-haltigem Medium leicht erkennen, da sie keine Blaufärbung aufweisen.

10.7 Gen-Deletion mittels „Gene-SOEing“ (Horton, 1995)

Um Deletionen möglichst rasch, gezielt und einfach im Genom zu etablieren, wurde die Methode des *Gene-Splicing by Overlap Extension*, kurz „Gene-SOEing“ angewendet. Dabei handelt es sich um eine Technik zur *in vitro*-Neukombination von DNA-Fragmenten während der PCR. Sie basiert auf einer Erweiterung am 5'-Ende des zweiten *Primers* (b), die das reverse Komplement eines dritten *Primers* (c') darstellt, der an einer anderen Stelle auf dem ersten *Template* oder auch auf einem völlig anderen *Template* binden kann. In einer zweiten PCR fungiert dann das Produkt der ersten PCR als *Primer* (c), zusammen mit einem vierten *Primer* (d) entsteht so ein Fusionsprodukt (Abb.III.1). Diese Technik kann eingesetzt werden, um Gene (oder Genabschnitte) zu fusionieren, oder um Deletionen gezielt zu setzen. Für Deletionen werden die Bereiche vor und hinter dem zu deletierenden Bereich fusioniert und

das Produkt mittels des pK18*mobsacB*-Systems gegen den intakten Abschnitt des Chromosoms vertauscht. Dabei wird durch Selektion auf Km^r zunächst auf die Integration des Vektors identifiziert, die über eine der beiden Flanken erfolgt. Für die Selektion auf das zweite *Crossover*-Ereignis wird das *sacB*-Systems des Vektors verwendet, welches eine Sensitivität gegenüber Sucrose (10%) vermittelt. Sucrose-resistente Zellen müssen also diesen Vektor wieder verloren haben (Replikation in *C.g.* nicht möglich). Dieser Verlust kann auf zwei Arten erfolgen. Im ersten Fall erfolgt eine homologe Rekombination über dieselbe Flanke wie bei der Integration, der Genotyp *revertiert* und es entstehen wieder Wildtyp-Kolonien. Im zweiten Fall erfolgt die Rekombination über die zweite Flanke. Auf diese Weise verbleibt das Deletionskonstrukt im Chromosom, während das native Gen mit dem Vektor verloren geht.

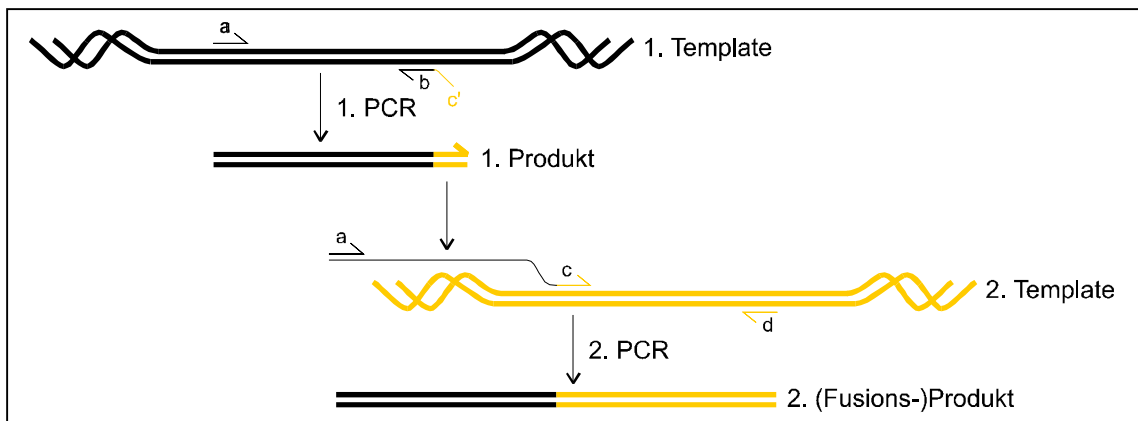


Abb.III.1: Schematische Darstellung des „Gene-SOEing“

10.8 PCR-Schnelltest für Integrationen / Deletionen in *C. glutamicum*

Integrationen und Deletionen im Chromosom können bei richtiger Wahl der Primer sehr leicht durch PCR nachgewiesen werden (Abb.III.2).

Integrationsnachweis:

Es werden drei *Primer* benötigt:

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

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

Deletionsnachweis:

Es werden vier Primer benötigt:

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

Bei erfolgter Deletion muß die Primerkombination Pa/Pb ein Fragment einer bestimmten Größe ergeben, die nur nach der Deletion auftreten kann. Die Primer Pc/Pd dürfen dagegen kein Amplifikat ergeben. Sollte das komplette Deletionskonstrukt (vgl. GeneSOeing) noch integriert vorliegen, würden beide Primerkombinationen ein PCR-Produkt ergeben.

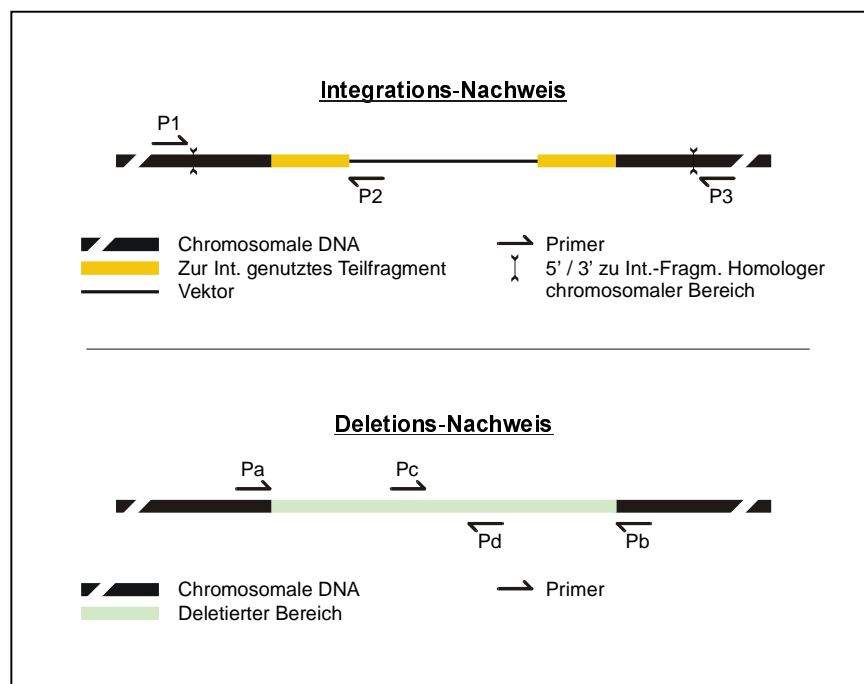


Abb.III.2: Schematische Darstellung des Integrations- / Deletionsnachweises

Herstellung der *Template*-DNA für Integrations- / Deletionsschnelltest:

Durch Aufkochen der zu untersuchenden *C. glutamicum*-Klone mit der Mikrowelle werden die Zellen aufgeschlossen und die DNA PCR-Analysen zugänglich gemacht. Auf diese Weise kann in kurzer Zeit eine große Anzahl Klone auf ein erfolgtes Integrations-/ Deletionereignis untersucht werden.

- ca. ¼ eines normalen Stöcherstriches in 100 µl sterilem H₂O bidest. resuspendieren (in einem 1,5 ml Eppi)
- Zellen für 2 x 35 sec in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzen

- Zellen sofort auf Eis stellen
- ca. 0,5 – 1 µl der Suspension als *Template* für PCR-Nachweis (Eppendorf-Taq mit *Enhancer* verwenden) einsetzen

11 DNA-Transfertechniken

11.1 Schnelltransformation nach *E. coli*

Diese Methode dient zur schnellen Transformation von unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen mit bereits vorhandenen Plasmiden. Die Kompetenz zur DNA-Aufnahme erhalten die *E. coli*-Zellen dabei durch eine Behandlung mit Polyethylenglycol (PEG) und Calciumchlorid.

- 15-10 frische *E. coli*-Kolonien in 100 µl 0,1 M CaCl₂ + 10 mg/ml PEG resuspendieren
- Zellen 5 min auf Eis lagern
- 5 - 10 µl Plasmid-DNA zugeben
- Zellen 5 min auf Eis lagern
- 30 sec Hitzeschock bei 42°C
- 900 µl LB/G oder SOC zugeben und 1 h bei 37°C regenerieren
- auf Selektionsmedium ausplattieren

11.2 Elektroporation nach *E. coli*

Bei der DNA-Transformation durch Elektroporation werden speziell vorbehandelte Zellen mit der DNA-Lösung vermischt und einem definierten elektrischen Puls mit einer Feldstärke von über 10 kV/cm ausgesetzt, wodurch es zur Aufnahme der DNA in die Zellen kommt (Dower *et al.*, 1988). Die Entladezeiten des elektrischen Pulses sollten dabei optimalerweise über 5 msec liegen, wofür die Zellsuspension möglichst ionenfrei und konzentriert sein muß.

Die Arbeiten wurden nach dem „Gene-Pulser“-Manual durchgeführt.

- kompetente Zellen (siehe 10.3) in Eis auftauen, Küvetten und DNA auf Eis stellen
- Pulsbedingungen einstellen:
 - Kapazität: 25 µF
 - Parallelwiderstand: 400 Ω
 - Spannung: 2,5 kV (bei 0,2 cm Küvetten)
1,8 kV (bei 0,1 cm Küvetten)
- zur Elektroporation 50-100 µl *E. coli* Zellen mit ca. 1/20 Volumen ionenfreie DNA in H₂O vermischen und 30-60 sec auf Eis stellen
- Suspension nach unten in eine Küvette geben
- Küvette gut abtrocknen, in Pulser stellen und Puls auslösen
- sofort 1 ml SOC-Medium zugeben und kurz durchmischen
- Zeit-Konstante kontrollieren (optimal 6-8 bei 400 Ω)
- Zellen in Eppi geben und 60 min bei 37°C regenerieren
- Zellen auf geeignetes Selektionsmedium plattieren

11.3 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen

(nach „Gene Pulser“-Manual)

- *E. coli* Einzelkolonie in 5 ml LB/G animpfen und ü/n im Roller bei 37°C inkubieren
- Vorkultur 1:100 in LB/G-Medium überimpfen und im Luftschüttler bei ca. 150 rpm bis zu einer o.D.₅₈₀ von 0,5-0,7 anziehen
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen, alle weiteren Schritte bei 0°C (Lösungen und Rotoren gekühlt)
- 250 ml Kultur 15 min bei 6.000 rpm im JA10-Rotor pelletieren
- Überstand vollständig abziehen
- Becher 2 mal vorsichtig mit ca. 20 ml H₂O-bidest spülen ohne das Pellet zu lösen
- Pellet in 5 ml H₂O-bidest lösen, dann 250 ml H₂O-bidest zugeben
- Zellen 15 min bei 5.000 rpm pelletieren
- Überstand sofort abgießen und Zellen im Rücklauf resuspendieren
- Suspension in zwei JA20-Becher aufteilen und jeweils 25 ml 15% Glycerin zugeben
- Zellen 15 min bei 5.000 rpm abzentrifugieren, Überstand vollständig abziehen
- Pellet in 0,5-1 ml (1,5 faches Volumen) 15% Glycerin aufnehmen
- Zellen portionsweise (ca. 100 µl) in vorgekühlte Eppis geben
- bei -80°C schockgefrieren und lagern

11.4 Elektroporation nach *C. glutamicum*

(Kirchner, 1999)

- Wasserbad auf genau (!) 46 °C erwärmen
- Reagenzglas mit 4 ml BHIS-Medium mind. 5 min im Wasserbad temperieren
- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- 0,1 – 10 µg DNA hinzufügen
- Pulsbedingungen einstellen:
 - Kapazität: 25 µF
 - Parallelwiderstand: 200 Ω
 - Spannung: 2,5 kV
- Suspension 2-3 mal auf- und abpipettieren, ganz nach unten in eine 0,2 cm Gene Pulser-Küvette überführen und vorsichtig mit 0,8 ml eiskalten Glycerin 10 % überschichten (schichten dürfen sich dabei nicht durchmischen)
- Küvette gut abtrocknen, in Halterung stecken und Puls auslösen
- die Zeitkonstante sollte zwischen 3,5 und 4,0 msec liegen
- nach dem Puls die Zellen mittels steriler Pasteurpipette sofort in das mit 4 ml BHIS gefüllte, vorgewärmte Reagenzglas überführen und vermischen
- für 6 min (!) bei 46 °C im Wasserbad inkubieren
- für 50 min bei 30 °C im Schüttler (!) regenerieren
- auf BHIS oder LBG-Selektionsmedium ausplattieren

Anmerkung:

Der Hitzeschock kann bei der Elektroporation replikativer Plasmide in restriktiondefekte Stämme (z.B. *C.g.* RES167) weggelassen werden. Die Transformationseffizienz sinkt dabei jedoch auf ca. 20%.

11.5 Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen

(Kirchner *et al.*, 1999)

- *C. glutamicum* Vorkultur in 50 ml BHIS-Medium animpfen (250 ml Kolben) und ü/n bei 30°C im Luftschüttler bei 200 rpm inkubieren
- 2 x 5 ml der Borkultur in 2 x 250 ml BHIS-Medium (auf 30 °C vorgewärmt) überimpfen (1000 ml Kolben) und bei 30 °C im Luftschüttler bei 200 rpm bis zu einer o.D.₅₈₀ von 1,75 inkubieren
- alle folgende Schritte der Prozedur werden auf Eis durchgeführt
- die Kultur in 4 x 125 ml aufteilen und in 4 sterile, vorgekühlte JA14-Zentrifugenbecher überführen
- 20 min mit 6000 rpm bei 4 °C abzentrifugieren
- Überstand restlos abziehen
- Pellet in 2 ml eiskaltem TG-Puffer resuspendieren und in sterile JA17-Zentrifugenbecher überführen
- je 20 ml TG-Puffer zugeben und durchmischen
- 10 min mit 6000 rpm bei 4 °C abzentrifugieren
- folgende Schritte zweimal durchführen:
 - Pellet in 2 ml eiskaltem TG-Puffer resuspendieren
 - 20 ml TG-Puffer zugeben und durchmischen
 - 10 min mit 6000 rpm bei 4 °C abzentrifugieren
 - Überstand restlos abziehen
- folgende Schritte zweimal durchführen
 - Pellet in 2ml eiskaltem Glycerin 10 % resuspendieren
 - 20 ml Glycerin 10 % zugeben und durchmischen
 - 10 min mit 6000 rpm bei 4 °C abzentrifugieren
 - Überstand restlos abziehen
- Pellet in 1 ml eiskaltem Glycerin 10 % resuspendieren
- Aliquots von 150 µl in vorgekühltes Eppi überführen (ergibt ca. 40 – 50 Kompis)
- Kompetente Zellen bei –80 °C lagern

11.6 Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach coryneformen Bakterien (Schäfer *et al.*, 1990)

Bei dieser Methode handelt es sich um ein effektives Verfahren zur Übertragung mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* nach coryneformen Bakterien. Da der eingesetzte Donorstamm *E. coli* S17-1 die zum Transfer benötigten Mobilisierungsfunktionen „in trans“ zur Verfügung stellt, müssen die eingesetzten Plasmide nur über eine RP4-spezifische *mob*-Region verfügen. Durch die der Konjugation vorgeschalteten Hitzebehandlung der Rezipientenstämmen zur weitgehenden Inaktivierung des Restriktionssystems kann eine hohe Transferrate erreicht werden (Schäfer *et al.*, 1994b)

Anzucht des Donorstammes:

- *E. coli* Einzelkolonie als Vorkultur selektiv in 10 ml LB/G-Medium animpfen und ü/n bei 37°C im Roller inkubieren
- Vorkultur 1:100 unselektiv in 100ml LB/G umimpfen und im Luftschüttler bei 200 rpm bis zu einer o.D.₅₈₀ von 1-1,5 anziehen

Anzucht des Rezipientenstammes:

- *C. glutamicum* Einzelkolonie von LB/G animpfen und im Luftschüttler mit 150-200 rpm bis zu einer o.D.₅₈₀ von 3-4 anziehen
- 10 ml Rezipientenkultur in Reagenzglas überführen und auf RT abkühlen lassen
- Hitzeschock für 9 min bei 48,5 °C durchführen

Konjugativer Plasmidtransfer

- je $4 \cdot 10^8$ Donorzellen und Rezipientenzellen in Eppi überführen und durch kurze Zentrifugation pelletieren
- Rezipientenpellet in 200 µl LB/G Medium resuspendieren und mit dem Donorpellet mischen
- Kreuzungsgemisch auf einen Nitrozellulose-Filter (0,45 µm Porengröße, Ø 2,5 cm) auf LB-Festmedium aufbringen
- Gemisch antrocknen lassen und 20 h bei 30°C inkubieren
- Kreuzungsgemisch mit 1 ml LB/G Medium abspülen
- geeignete Verdünnungsstufe auf entsprechendes Selektionsmedium ausplattieren und 2-3 Tage bei 30°C inkubieren

12 Hybridisierung von DNA

(nach Southern, 1975)

Mit Hilfe der Hybridisierung können homologe DNA- (RNA-) Sequenzen nachgewiesen werden. Dazu wird die zu testende DNA (RNA) gelelektrophoretisch aufgetrennt, denaturiert und an einen Filter gebunden. Nach Zugabe einer markierten DNA/RNA-Hybridisierungsprobe kommt es zu einem „annealing“ der homologen Bereiche. Dabei wird die Stringenz der Hybridisierung durch die Hybridisierungs- und Waschttemperatur und den Salzgehalt der Waschpuffer bestimmt. Die DNA-Markierung kann sowohl nicht-radioaktiv als auch radioaktiv erfolgen. Durch geeignete Nachweisverfahren können anschließend die Bereiche sichtbar gemacht werden, an denen es zu einem „annealing“ homologer DNA gekommen ist.

12.1 DNA-Transfer durch Vakuum-Blotting

(nach „LKB 2016 VacuGene-Blot“ Manual)

Gegenüber dem Kapillarblot bietet diese Methode den Vorteil, daß weniger Puffer benötigt werden und der Zeitaufwand deutlich geringer ist.

- gespaltene DNA und Marker im Gel auftrennen
- Gel mit EtBr färben und mit Lineal unter UV-Durchlicht fotografieren
- Nylonmembran (Hybond-N Nylon, 0,45 micron, Amersham) passend zur Blot-Maske schneiden
- Vakuum-Blot nach Vorschrift aufbauen
- Gel genau und luftblasenfrei auf Maskenausschnitt legen
- Vakuum von ca. 50 mbar anlegen
- Gel nacheinander mit folgenden Puffern überschichten, diese anschließend wieder absaugen
 - ca. 5 min Blotting-Puffer A (Depurinierung)
 - ca. 5 min Blotting-Puffer B (Denaturierung)
 - ca. 5 min Blotting-Puffer C (Neutralisierung)
 - ca. 20 min 20fach SSC (Transfer der DNA)
- Membran kurz antrocknen, mit Frappan umwickeln und DNA-Seite 5 min mit UV belichten (crosslinking der DNA)
- Membran sofort zur Hybridisierung einsetzen oder in 3MM-Papier lagern

12.2 Nicht-radioaktive DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP

(„DNA-labeling and Detection Kit Nonradioactive“ Manual)

Die DNA wird durch „random-primed“ Einbau von dUTP, welches über einen Spaver mit einem Steroid-Hapten verbunden ist, markiert. Nach der Hybridisierung werden die Hybride

unter Verwendung eines Antikörper-Konjugates (Antidigoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat) und einer anschließenden vom Enzym katalysierten Reaktion visualisiert.

- DNA in ca. 30 µl H₂O aufnehmen (bzw. Gelblöckchen in Eppi überführen)
- DNA 5-10 min in kochendem Wasser denaturieren
- sofort min. 10 min auf Eis-EtOH (-20°C) abkühlen
- 1/10 Volumen Hexanucleotidgemische zugeben
- 1/10 Volumen dNTP-Markierungsmix zugeben
- 2 µl Klenow-Polymerase (2 U/µl) zugeben, vermischen
- min. 2 h, besser ü/n bei 37 °C inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 0,25 M EDTA (pH 8,0) und 1/19 Volumen 4 M LiCl abstoppen
- 2,5-faches Volumen 98% EtOH (-20°C) zugeben
- DNA fällen, waschen, trocknen und in 50 µl H₂O aufnehmen

12.3 Nicht-radioaktive Hybridisierung

(„DNA-labeling and Detection Kit Nonradiative“ Manual)

Die Hybridisierung dient dem „annealing“ der Sonden mit homologen DNA-Bereichen auf der Nylon-Membran. Der eigentlichen Hybridisierung wird eine Vor-Hybridisierung mit einem Casein-haltigen Puffer vorgeschaltet, wodurch freie Bindungsstellen auf dem Filter abgesättigt und eine unspezifische Bindungen der Sonde verhindert werden.

Vorhybridisierung:

- Nylon-Membran mit DNA-Seite nach innen in Hybridisierungskolben geben
- ca. 20 ml Hybridisierungs-Lösung (68 °C) zugeben
- 1-3 h bei 68 °C rollern

Hybridisierung:

- markierte DNA in 10 ml Hybridisierungs-Lösung geben und 5 - 10 min im Wasserbad aufkochen
- Probe min. 10 min auf Eis-EtOH (-20 °C) abkühlen
- Vorhybridisierungs-Lösung abgießen, Membran darf dabei nicht austrocknen
- Probe in Kolben geben und mind. 2 h, besser ü/n, bei 68 °C rollern
- Hybridisierungs-Probe in PE-Röhrchen geben und zur erneuten Verwendung bei -10 °C aufbewahren

Waschung:

- Filter 2 mal für 5 min in Wasch-Lösung A bei RT rollern
- Filter 2 mal für 15 min in Wasch-Lösung B bei 68 °C rollern

12.4 Digoxigenin-Nachweis

(„DNA-labeling and Detection Kit Nonradioactive“ Manual)

Dieser Nachweis ist notwendig um die bei der nicht-radioaktiven Hybridisierung erhaltenen DNA-Hybride zu visualisieren. Dazu werden sie zunächst an ein Antikörper-Konjugat gebunden und über eine anschließende enzymatisch katalysierte Reaktion sichtbar gemacht. Bei dieser Reaktion kann es sich entweder um eine direkte Farbreaktion mit X-Phosphat (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz) oder um Chemilumineszenz mittels CSPD (3-(4-methoxy Spiro [1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decan]-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz) (Lichtemission bei einem Maximum von 477 nm durch den Zerfall des metastabilen Phenolations) (Bronstein *et al.*, 1991), handeln. Vorteile bei der Chemilumineszenz sind die variablen Belichtungszeiten und die einfache Regeneration der Filter, die so mehrmals verwendet werden können.

12.5 Antikörpernachweis durch NBT / X-Phosphat:

- alle Schritte erfolgen bei RT
- Filter 1 min in Puffer 1 schüttel/rollern
- 30 min in 30 ml Puffer 2 rollern
- 30 min in Puffer 2 + 4 µl Antikörperkonjugat rollern
- 2 mal 15 min mit je 20 ml Puffer 1 rollern
- Filter 2 min in flacher Schale mit Puffer 3 äquilibrieren
- Filter mit 10 ml Färbelösung im Dunkeln färben
- erfolgte Färbe-Reaktion mit TA-Elektrophorese-Puffer abstoppen
- gefärbte Filter zwischen 3MM-Papier trocknen und aufbewahren

12.6 Antikörpernachweis durch Chemilumineszenz

- Bis zur Äquilibrierung mit Puffer 3 wie bei NBT / X-Phosphat verfahren, jedoch anstelle von Puffer 1 Waschpuffer (Puffer 1 + 0,3% Tween20) und nur 2 µl Antikörperkonjugat statt 4 µl verwenden
- Membran 5 min in ca. 10 ml CSPD-Substrat-Lösung inkubieren
- Membran luftdicht verpacken, in Belichtungskassette legen und 5 - 15 min bei 37°C vorinkubieren
- anschließend mit geeigneter Belichtungszeit auf Röntgenfilm exponieren

Regeneration:

- Membran kurz in flache Schale mit H₂O geben
- Membran 2 mal für ca. 15 min bei 37°C in Rehybridisierungs-Lösung waschen
- kurz mit 2-fach SSC waschen
- Filter anschließend in 2-fach SSC bis zur nächsten Hybridisierung aufbewahren

13 Extraktion, Darstellung und Analyse von Proteinen

13.1 Herstellung von *C. glutamicum* Gesamtprotein-Rohextrakten

- Einzelkolonie in gewünschtem Selektiv-Medium (MM1) animpfen und ü/N bei 30°C im Luftschüttler bei 150 rpm anziehen
- 40 Selektivmedium mit dieser Vorkultur mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 animpfen
- Inkubation im Luftschüttler bei 30 °C und 150 rpm
- Zellen werden nach ca. 18 Std. geerntet, die o.D.₅₈₀ sollte dann ca. 15-18 betragen
- Zellen werden während der gesamten folgenden Prozedur auf Eis gehalten
- Zellsuspension in 250 ml Becher (JA14-Rotor) in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 6000 rpm für 10 min abzentrifugieren
- Becher mit Zellpellet 1x vorsichtig mit H₂O bidest. ausspülen
- Pellet in 10 ml H₂O bidest. resuspendieren und in 40 ml Becher (JA17-Rotor) überführen
- für 7 min bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugieren
- Überstand quantitativ abziehen und Bakterien-Pellet in 1 ml Aufschlußpuffer resuspendieren
- je 1,2 ml der Zellsuspension in Ribo-Tubes füllen und 2 µl DNaseI (1 mg / ml) zugeben
- vortexen und in RiboLyser-Gerät spannen
- Zellen 2 x mit einer Geschwindigkeit von 6,5 für 30 sec. aufschließen
- 5 min auf Eis abkühlen
- Zelltrümmer in Biofuge 15 min bei 15.000 rpm abzentrifugieren
- Überstand in neues Eppi überführen und erneut 20 min bei 15.000 rpm abzentrifugieren
- fertigen Proteinextrakt (klarer Überstand) in neues Eppi füllen und bei -20 °C lagern

13.2 Herstellung von *C. glutamicum* Zellhüllenprotein-Extrakten (nach Chami, 1997)

Die Extraktion der Zellhüllenproteine erfolgt in möglichst salzfreien Puffern, damit die Extrakte später problemlos für 2D-Gel-Elektrophorese eingesetzt werden können. Aus dem gleichen Grund wird auch das Detergenz CHAPS verwendet, welches als Zwitterion über eine neutrale Nettoladung verfügt.

- Zellen in geeignetem Medium (MM1) selektiv animpfen und ü/N bei 30 °C und 150 rpm im Luftschüttler bis ca. o.D.₅₈₀ von 4 anziehen (ggf. vorher Vorkultur herstellen)
- alle Schritte der folgenden Prozedur erfolgen auf Eis
- 10 ml Kultur (für 2D-Gele 250 ml) im JA17-Rotor bei 4 °C mit 6000 rpm für 10 min abzentrifugieren
- Pellet mit eiskalten H₂O bidest. waschen
- Suspension 10 min bei 4 °C mit 6000 rpm abzentrifugieren
- Waschvorgang ein zweites Mal wiederholen

- Überstand quantitativ entfernen
- Pelletgröße durch Auswiegen bestimmen (wichtig, da Proteinmengen in Relation zur Zellmasse stehen soll)
- gleiche Menge eiskalten Extraktionspuffer zugeben
- vorsichtig durchmischen und 15 min auf Eis inkubieren
- Extrakt 20 min bei 15.000 rpm und 4 °C abzentrifugieren
- Überstand in neues Eppi überführen und erneut 20 min bei 15.000 rpm abzentrifugieren
- fertigen Proteinextrakt (gelblicher Überstand) in neues Eppi füllen und bei -20 °C lagern
- etwa 20 µl des Extraktes enthalten die für ein 1D-SDS-PAGE benötigte Menge

Für die *S-layer*-Analysen wurde SDS statt CHAPS im Extraktionspuffer (b) eingesetzt (Original-Protokoll von Chami (1997)). Die Extraktion erfolgte für 5 min bei 100°C.

13.3 Herstellung eines Proteinkonzentrates aus dem Kulturüberstand

Um die Proteine des Kulturüberstandes in ausreichenden Mengen in Proteingelen darstellen zu können, müssen diese zunächst aufkonzentriert werden (ca. 1:60).

- Zellen in gewünschtem Medium (MM1) bis zu einer o.D.₅₈₀ von ca. 4 im Luftschüttler bei 30 °C und 150 rpm anziehen
- Zellen im 250 ml Becher (JA14-Rotor) bei 4 °C mit 12.000 rpm abzentrifugieren
- Überstand in neuen 250 ml Becher überführen und erneut bei 4 °C mit 12.000 rpm abzentrifugieren (Zellmaterial muß vollständig entfernt werden)
- Überstand portionsweise (15 ml) in Ultrafree-15-BioMax-5K Röhrchen überführen und mit maximaler rpm (vgl. Säulenspezifikation) bei 4 °C abzentrifugieren
- Säulen regelmäßig mit Überstand nachfüllen, bis gewünschte Konzentration erreicht (durchzentrifugierte Lösung verwerfen)
- ggf. mit Tris-Puffer waschen (10 mM, pH 6,8)
- Protein durch Auf- und Abpipettieren vom Filter lösen
- Konzentrat in Eppi überführen und bei -20 °C aufbewahren

13.4 Dialyse der Proteinextrakte

Damit die Zellhüllenprotein-Extrakte und die aufkonzentrierten Proteine des Kulturüberstandes für die isoelektrische Fokussierung (IEF) von 2D-Gel-Elektrophoresen eingesetzt werden können, müssen zunächst die Salze weitgehend aus der Lösung entfernt werden. Zu diesem Zweck werden die Proteinlösungen 4 Tage gegen Millipore-H₂O bei 4 °C dialysiert, wobei alle 24 h das Dialysewasser gewechselt wird. Zur Dialyse wurde ein Schlauch mit einer Ausschlußmasse von 1000 Dalton gewählt.

13.5 Bestimmung des Proteingehaltes

(Bradford, M., 1976)

Der Proteingehalt in einer Lösung wurde mit Hilfe eines „Bradford Assay“ der Firma BioRad bestimmt. Er basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des blauen Säurefarbstoffes Coomassie-Brilliantblau in Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm auf 595 nm. Der Farbstoff bindet dabei an kationische und nichtpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine. Es handelt sich um einen sehr empfindlichen quantitativen Färb-Assay mit einer Sensitivität von 1 µg Protein

Zusammensetzung eines Ansatzes:

- 200 µl BioRad-Reagenz
- 700 µl H₂O bidest.
- 100 µl Protein (je nach Proteingehalt entsprechend verdünnt)

- Ansatz mischen und 5 min inkubieren
- in Küvette überführen und bei einer Wellenlänge von 595 nm o.D. gegen Leerwert (s.u.) messen

Zusammensetzung Leerwert:

- 200 µl BioRad-Reagenz
- 700 µl H₂O bidest.
- 100 µl Protein-Puffer (entsprechend verdünnt wie Protein)

Berechnung des Proteingehalts:

$$\text{o.D.}_{595\text{nm}} * \text{Stg.} * \text{Verdünnungsstufe} * 10^{-3} = \text{Proteingehalt mg} * \text{ml}^{-1}$$

Stg. = Steigung der Eichgeraden

Die Eichgerade wird mit dem BioRad-Assay und bekannten Mengen des Standardproteins BSA (Rinderserumalbumin) hergestellt.

13.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

(Laemmli, 1970; modifiziert)

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Größe getrennt. Die größenabhängige Wanderung der Proteine im elektrischen Feld wird dadurch ermöglicht, daß das im Puffer und im Polyacrylamidgel enthaltene SDS im konstanten Verhältnis an die Proteine bindet. Dadurch erhalten die Proteine eine gleichartige negative Ladung pro Masseneinheit (1,4 g SDS pro 1 g Protein), wobei die Eigenladung der Proteine unerheblich wird. Zusätzlich führt das anionische Detergenz SDS zur Auflösung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Die länglichen negativ

geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dabei umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts. Das diskontinuierliche System nach Laemmli bewirkt eine Konzentrierung der Proben an der Übergangsstelle zwischen Sammel- und Trenngel, wodurch gut definierte Banden entstehen. Außerdem wird die Aggregation und Präzipitation der Proteine während des Eintritts in die Gelmatrix verhindert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts unbekannter Proteine werden zusätzlich Eich- oder Markerproteine aufgetragen (Eichgerade).

Die Porengröße der Gele wird durch das Verhältnis der Konzentrationen an Acrylamid zum Quervernetzer N-N'-Methylencisacrylamid bestimmt. Um kleine Proteine aufzutrennen, werden Gele mit einem hohen Acrylamidanteil benutzt.

13.6.1 Herstellung diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgele

- Glasplatten, Aluminiumplatten, Spacer, Probenkämme und Gießkammer gründlich mit H₂O dest. und EtOH säubern
- Gelgießstand mit gewünschter Anzahl Platten zusammenbauen, senkrecht aufstellen
- Trenngel der gewünschten Konzentration (Tab.III.5) frisch ansetzen (Anzahl Gele beachten) und in Gießstand bis ca. 1 cm unter oberen Rand der Aluminiumplatte füllen
- sofort mit wassergesättigtem Butanol überschichten (für glatte Oberfläche)
- mindestens 30 min auspolymerisieren lassen, dann Butanol abgießen
- Sammelgel-Lösung frisch ansetzen (Tab.III.6) und auf das Trenngel geben
- Probenkämme sofort einsetzen
- mindestens 30 min auspolymerisieren lassen
- das Gel kann sofort verwendet werden oder ca. 14 Tage bei 4°C (in luftdichter Verpackung) gelagert werden

| Trennbereich (in kDa) | 30 – 120 | 18 – 75 | 15 – 60 | 15 – 45 |
|----------------------------------|----------|---------|---------|---------|
| Acrylamidkonz. | 7,5 % | 10 % | 12,5 % | 15 % |
| Acryl.-Stamm (in ml) | 2 | 2,7 | 3,35 | 4 |
| 1,88 M Tris/HCl (pH 8,8) (in ml) | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 |
| 0,5 % SDS (in ml) | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 |
| H ₂ O dest. (in ml) | 2,8 | 2,1 | 1,45 | 0,8 |
| TEMED (in µl) | 6,7 | 6,7 | 6,7 | 6,7 |
| APS (in µl) | 40 | 40 | 40 | 40 |

Tab.III.5: Zusammensetzung für Trenngel diskontinuierliche SDS-PAGE (8 ml / Gel)

Acryl.-Stamm = 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung

APS = 10 % Ammonium Persulfat in H₂O (frisch ansetzen)

| | |
|---------------------------------|------|
| Acrylamidkonz. | 5 % |
| Acryl.-Stamm (in ml) | 0,33 |
| 0,625 Tris/HCl (pH 6,8) (in ml) | 0,4 |
| 0,5 % SDS (in ml) | 0,4 |
| H ₂ O dest. (in ml) | 0,87 |
| TEMED (in µl) | 2 |
| APS (in µl) | 10 |

Tab. III.6: Zusammensetzung Sammelgel (2ml / Gel)

13.6.2 Probenvorbereitung und Elektrophoreselauf

- Proben je nach Proteingehalt verdünnen und 5:1 mit PBJR-Probenpuffer (5x) mischen
- Proben 5 min aufkochen, anschließend auf Eis stellen
- Gel mittels Klammern in Apperatur einspannen
- SDS-Laufpuffer in oberen und unteren Tank der Gelkammer füllen
- Probenkamm ziehen
- Probe auftragen (bei Zellhüllenextrakt 20 µl, bei Gesamtein ca. 8 µg)
- Lauf mit zunächst 100 V starten, bis Bromphenolblau-Bande sich gesammelt hat
- Spannung auf 200 V erhöhen, bis Bromphenolblau-Bande aus dem Gel läuft
- Platten aus Gelkammer entfernen und mit Hilfe der Spacer vorsichtig öffnen
- Gel färben oder zum Immunoblotting einsetzen

13.7 2D-Gel-Elektrophorese

(nach Klose, 1975; O'Farrel, 1975)

Für die Analyse komplexer Proteingemische wird die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Unter denaturierenden Bedingungen durch Harnstoff und β -Mercaptoethanol können mit dieser Methode mehrere hundert Proteine in Form von sogenannten *Spots* aufgetrennt werden. Die Proteine werden dabei nach zwei unterschiedlichen Parametern separiert. In der ersten Dimension erfolgt eine isoelektrische Fokussierung. Dabei werden die Proteine in einem auf Folie polymerisierten IPG-Streifen mit immobilisiertem pH-Gradienten entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (pI) sortiert, indem bei niedriger Leitfähigkeit hohe Feldstärken erzeugt werden. In der zweiten Dimension erfolgt eine Auftrennung entsprechend der elektrophoretischen Beweglichkeit der Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengel.

13.7.1 Acetonfällung der Proteinextrakte

Bevor die Proteinextrakte für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden können, müssen sie erst mit Aceton gefällt werden. Auf diese Weise werden die Proteine nochmals aufgereinigt, ggf. aufkonzentriert und in den für die IEF (Isoelektrische Fokussierung) notwendige Puffer umgepuffert.

- Proteine 1:4 (besser 1:9) mit eiskaltem Aceton fällen
- ü / N bei -20 °C lagern
- ca. 1 h in Kühlzentrifuge (0 °C) bei 15.000 rpm abzentrifugieren
- Überstand vollständig abziehen
- Proteinpellet lufttrocknen (Aceton muß restlos verdampfen)
- Protein in 400 µl Rehydrationspuffer aufnehmen
- ggf. erneute Proteinbestimmung

13.7.2 Gellauf

Isolelektrische Fokussierung:

- gewünschte Menge Protein in 350 µl Rehydrationspuffer (max. 250 µg Gesamtmenge Protein) bringen
- Strip-Holder (18 cm) mit Detergenz, anschließend mit H₂O bidest. reinigen, gut trocknen lassen
- Rehydrations-Puffer gleichmäßig in Strip-Holder verteilen
- IPG-Strip auflegen
 - Schutzfilm entfernen
 - IPG-Strip „upside down“ auf Lösung in Strip-Holder legen
 - Orientierungsmarkierungen beachten
 - Strip muß komplett mit der Lösung in Kontakt stehen
 - Luftblasen vermeiden
- IPG-Strip komplett mit IPG-Cover-Fluid bedecken (1 ml Gesamtvolumen)
- Stripholder mit verschließen und auf IPG-Phor legen (Orientierung beachten)
- IEF starten (IEF-Programm)

| | | |
|----------------|------|--------|
| Rehydrierung : | 1 h | 0 V |
| | 12 h | 30 V |
| | 2 h | 60 V |
| Fokussierung : | 1 h | 500 V |
| | 1 h | 1000 V |
| | 10 h | 8000 V |
- fertige Stripes können bei -80°C eingefroren werden

IPG-Strip-Equilibration:

- fokussierte IPG-Strips „upside-up“ in Reagenzglas oder Equilibrationskammer legen
- 10 ml Equilibration-Puffer 1 zugeben
- 15 min auf Schütteltisch schütteln
- Equilibration-Puffer 1 abgießen und 10 ml Equilibration-Puffer 2 zugeben
- 15 min auf Schütteltisch schütteln
- Equilibrierte IPG-Strips ca. 10 min hochkant auf Whatman-Papier legen (zum Entfernen von Equilibration-Puffer 2)

SDS-Polyacrylamid-Gradientengel:

- MultiphorII mind. 30 min auf 15 °C vortemperieren
- 2,5 – 3 ml Petroleumbenzin auf Kühlplatte pipettieren
- ExcelGel entnehmen und Schutzfilm entfernen
- Gel auf Kühlplatte legen (Elektrophoreserichtung beachten)
- Luftblasen und Petroleumbenzin auf Geloberseite vermeiden
- „anodic buffer stripe“ auflegen
 - Schutzfolie entfernen
 - mit weicher Seite auf (+)-Kante des ExcelGels legen
 - Luftblasen vermeiden
- „cathodic buffer stripe“ auflegen
 - Schutzfolie entfernen
 - mit weicher Seite auf (-)-Kante des ExcelGels legen
 - Luftblasen vermeiden
- Equilibrierten IPG-Stripe „upside down“ 2-3 mm parallel zum „cathodic buffer strip“ legen (Kontakt zwischen beiden auf ganzer Länge)
- neben IPG-Strip „application-piece“ auf Excelgel auflegen: 15-20 µl Proteinmarker auftragen
- Elektroden vorsichtig auf „Buffer-Stripe“-auflegen
- Gellauf starten:
 - 35 min: 1000 V / 20 mA / 30 W
 - IPG-Strip und „application-piece“ entfernen
 - „cathodic-buffer-strip“ und Elektrode an diese Stelle setzen
 - 2:40 h: 1000 V / 40 mA / 40 W
- Gel abnehmen, 45 min fixieren, 90 min färben (Coomassie), dann entfärben

13.8 Proteinfärbung im Gel

Im SDS-Gel aufgetrennte Proteine können durch Coomassie Blue gefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Es sind zwei Farbtypen erhältlich, Coomassie Brilliant Blue R250 und Coomassie Brilliant Blue G250, wobei letzteres insbesondere kleine Proteine und Peptide anfärbt. In einem Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine werden durch eine Ethanol/Eis-

essig-Fixierlösung präzipitiert, bevor sie mit einer Coomassie Blue R250/G250-Lösung gefärbt werden. Da sich das komplette Gel blau anfärbt, muß ein Entfärbeschritt durchgeführt werden, bevor das Gel digitalisiert werden kann.

- Gel in Fixierlösung geben
- 5 min schütteln
- Lösung abgießen
- Zugabe der Coomassie –Färbelösung
- Gel 60 min unter Schütteln färben
- Lösung durch Schnell-Entfärber ersetzen
- ca. 5 min entfärben
- Entfärber abgießen
- Schnellentfärbevorgang wiederholen
- Langsam-Entfärber zugeben und mehrfach wechseln, bis nur noch die angefärbten Proteinbanden zu sehen sind

13.9 Immunoblotting (Westen-Blot)

(Khyse-Andersen, 1984)

Mittles Immunoblotting (Western-Blot) können bestimmte Proteine aus größeren bis komplexen Proteingemischen äußerst effizient nachgewiesen werden. Dabei werden die Proteingemische zunächst mittels analytischer SDS-DISK-PAGE oder 2D-PAGE aufgetrennt und dann in einem nachfolgenden Arbeitsschritt mit einer „Semi-Dry-Blotting“-Methode auf eine Membran transferiert. Die immobilisierten Proteine sind anschließend einer Antigen/Antikörper-Reaktion zugänglich und können so spezifisch nachgewiesen werden.

13.9.1 Semi-Dry-Proteinblot

Bei dem Semi-Dry-Elektroblot wird das SDS-Gel und die PVDF- oder Nitrocellulose-Membran zwischen mit Transferpuffer getränkte Filterpapierbögen gelegt. Dieses „Blotsandwich“ wird zwischen die horizontalen Graphitplatten einer Blotapparatur gelegt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (konstanter Strom von 0,8-2 mA / cm²) werden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert.

- Proteingel fahren
- Gel nicht färben oder fixieren
- nach dem Lauf Sammelgel abtrennen und Orientierung/Laufrichtung markieren
- Gel 15 min in Towbin-Transferpuffer waschen
- in einer anderen Schale 6 Blatt Whattman-Papier und die PVDF- bzw. Nitrocellulosemembran (je 8 x 8 cm) in Towbin-Transferpuffer tränken

- auf der unteren Graphitplatte (Anode) der Blottingapparatur (TransBlot®Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell) folgenden „Sandwich“ aufbauen:
 - 3 Blatt Whattmannpapier (getränkt)
 - PVDF- oder Nitrocellulose-Membran
 - Proteingel (auf Orientierung achten)
 - 3 Blatt Whattmannpapier (getränkt)
- eventuelle Luftblasen sorgfältig aus Sandwich entfernen (mit Greiner-Röhrchen herausrollern)
- obere Graphitplatte (Kathode) auflegen, Deckel schließen
- 1 h bei 15 V transferieren (ca. 0,8 mA / cm²) transferieren (2D-Gele 2 h bei 15 V)
- Transfer kann mittels Ponceau-Färbung kontrolliert werden

13.9.2 Ponceau-Färbung

- 30 ml PBS (1x) in eine Schale geben
- 2 ml Ponceau S zugeben
- Membran in der Lösung färben, bis Banden erkennbar sind
- ggf. einscannen (zwischen zwei Folien)
- anschließend durch Waschen mit PBS (1x) entfärben

13.9.3 Immunologische Detektion geblotteter Proteine

Spezifische Proteine werden auf der Nitrocellulose-Membran durch ein indirektes immunologisches Verfahren nachgewiesen. Zunächst bindet der unmarkierte Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird in einem zweiten Schritt von einem Sekundärantikörper detektiert, der den Primärantikörper der verwendeten Spezies erkennt (z.B. Kaninchen IgG). An den Sekundärantikörper ist ein Meerettich-Peroxidase-Komplex gekoppelt, welcher Diaminobenzidin umsetzt und so in einer Farb-reaktion das gesuchte Protein visualisiert.

- Membran 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpuffer in PBS (1x) inkubieren (blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran)
- 1 h mit Primärantikörper (geeignete Verdünnung in PBS (1x) mit 0,25 % (w/v) Magermilchpulver) bei RT inkubieren (oder ü/n bei 4 °C)
- 2 x 15 min in PBS (1x) waschen
- 1 h in mit Sekundärantikörper (1:1000 in TBS (1x)) bei RT inkubieren
- 3 x 15 min mit TBS (1x) waschen
- Membran in geeigneter Menge Entwicklerlösung (bei Minigel ca. 20 ml) legen, bis die Banden deutlich sichtbar sind
- zum Abstoppen der Reaktion Membran in Stopplösung überführen
- Membran zwischen Filterpapier trocknen und gegebenenfalls einscannen

13.10 Tryptischer „In Gel“ Verdau

Der tryptische „In Gel“ Verdau dient der Erstellung der definierten Peptidfragmente, mit denen der *fingerprint* zur massenspektrometrischen Identifikation des Proteins erstellt wird. Bei jedem tryptischen Verdau sollte eine Positivkontrolle (Probe mit bekanntem Protein) und eine Leerwertkontrolle (Gelstreifen ohne Protein) mit bearbeitet werden. Mit der Leerwertkontrolle können später die Hintergrundsignale aus dem Massespektrum eliminiert werden.

- ausreichende Menge 1,5ml Eppis mit je 500µl 0,1% Triflour-Essigsäure (TFA) / 60% CH₃CN waschen
- Gelbände (Coomassiegefärbt) ausschneiden, in gewaschenes Eppi überführen und in kleine Stückchen schneiden
- Zugabe von 250 µl T-Wasch A
- 5 min bei RT auf Schütteltisch waschen
- Waschlösung entfernen
- Zugabe von 250 µl T-Wasch B
- 30 min Schütteltisch bei RT
- Waschlösung entfernen
- Zugabe von 250 µl T-Wasch C
- 30 min Schütteltisch bei RT
- Waschlösung entfernen
- Proben in der Speedvac bei RT komplett trocknen
- Zugabe von 0,1 µg (pro 15 mm³ Gel) modifiziertem Trypsin (Promega) in 15 µl 10 mM NH₄HCO₃
- 5-10 min bei RT (Aufnahme der Enzym / Puffer-Lösung in das Gel)
- Zugabe von 20 µl 10 mM NH₄HCO₃ ohne Enzym
- Inkubation bei 37 °C für 24 h
- Aufbewahrung der Proben bei 4 °C
- durch anschließende Ultraschallbehandlung (20 min in Eiswasser) kann die Peptidkonzentration im Überstand erhöht werden

13.11 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Massen der Proteinfragmente des tryptischen Verdaus werden mit Hilfe des MALDI-TOF-MS von Bruker ermittelt.

Damit durch Massenspektrometrie große Moleküle wie Proteine oder Peptide identifiziert werden können, müssen diese zunächst in eine Matrix aus kleinen organischen Molekülen eingebettet werden (Karas and Hillenkamp, 1988). Die Matrix sollte dabei mit einem 1.000-10.000 fachen molaren Überschuss verwendet werden. Mit einem gepulsten Laser (Stickstoff) werden die Peptide zunächst aus der Matrix heraus ionisiert (MALDI = Matrix Assistierte Laser Desorption Ionisation). Anschließend werden die Ionen in einem elektrischen Feld mit sehr hoher Spannung (einige kV) beschleunigt, woraufhin sie durch den Flugzeitanalysator fliegen (TOF = Time Of Flight). Kleinere Peptide werden dabei auf eine höhere Geschwindigkeit beschleunigt als größere, d.h. sie durchqueren den Flugzeitanalysator schneller und treffen eher auf den Detektor. Aus der Flugdauer kann nach (automatischem) Abgleich mit einem Standard das Molekulgewicht der Peptide ermittelt werden. Die Gesamtheit der tryptischen Fragmente eines Proteins ergeben dann den *MS-fingerprint*, mit dem das Protein in geeigneten Datenbanken identifiziert werden kann.

13.11.1 Probenvorbereitung für MALDI-Analyse

Zu Analyse von Peptiden verwendet man α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure, welche bei einer Wellenlänge von 337 nm/355 nm absorbiert. Durch die Einbettung erhöht sich die Intensität der Analytmoleküle, während störende Fragment-Ionen praktisch nicht mehr auftreten.

- Herstellung einer gesättigten α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Lösung in 60% CH₃CH/0,1% TFA (in H₂O) (immer frisch ansetzen)
- Matrix 1:1 (v/v) mit Probe mischen
- 1 μ l vom Gemisch auf Probenhalter (26 Positionen) auftragen und sofort mit dem Fön trocknen
- nochmals 1 – 2 x 1 μ l auftragen

13.11.2 Erstellung des Peptid-Massespektrums

Zum Erstellen der Massespektren wird das Target automatisch in die Hochvakuum-Ionisationskammer des MALDI-Gerätes eingefahren. Nachdem sämtlich Parameter im Analyseprogramm „XACQ“ eingestellt worden sind (vgl. Tab.III.7), muß das Gerät mit einem geeigneten Standard aus mindestens drei Peptiden bekannter Größe geeicht werden. Diese Eichung sollte ca. alle 15 Proben wiederholt werden, bei Verwendung des Deflector-Modus häufiger (alle 5 Proben). Neu geeicht werden muß auf jeden Fall nach jeder Änderung der Meßparameter und nach Einführung eines neuen *Targets*.

Jede Messung sollte mit einer Laser-Blendeneinstellung von ca. 60 (= niedrige Laserenergie) beginnen. Sollten keine befriedigenden Spektren zu erkennen sein, sollte die Blende verringert werden (mehr Energie), bis entsprechend gute Spektren erzeugt werden können. Nachdem die Spektren mit ungefähr 100 Einzelpulsen erzeugt worden sind, können diese mit dem Programm „XMASS“ bearbeitet werden. Mit diesem Programm werden die für die Auswertung mit „MASCOT“ notwendige Listen der *Peaks* erstellt.

Parameter:

| Parameter | Einstellung | Parameter | Einstellung |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------|
| POLARI | POS | REPHZ | 3.00 [Hz] |
| AQOP_m | Reflector | ATTEN | ca. 50.0 – 60.0 |
| TD | 60000 | ML1 | 726803.238 |
| NoShots | ca. 100 (je 20/Serie) | ML2 | 357.804 |
| SMONUM | 0 | ML3 | 0 |
| SMOPTS1 | 0 | HITURBO | no |
| SMOPTS2 | 0 | GDEON | yes |
| SMOPTS3 | 0 | GDEDLY | medium |
| DW | 1.00 [ns] | DEFLON | yes |
| Delay | 20000 [ns] | RLNSBND | no |
| Uis1 | 19.00 [kV] | LLNSBND | no |
| Uis2 | 14.40 [kV] | UIS2BND | no |
| Urefl | 20.00 [kV] | DPCAL1 | 342.75 |
| Uens | 7.00 [kV] | DPMASS | 50.00 [Da] |
| Uhimass | 10.00 [kV] | RBNDVAL | 0.33 |
| RefFull | 20.00 [kV] | LBNDVAL | 0.28 |
| UdetL | 1.45 [kV] | IS2BNDV | 0.91 |
| UdetR | 1.70 [kV] | CMT1 | |
| Udefl | 2.00 [kV] | CMT2 | |

Tab.III.7: Tabelle der MALDI-TOF-MS Parameter für die Analyse von Peptiden

13.11.3 Auswertung der Massespektren mit „MASCOT“

Die Auswertung der Massespektren erfolgt computergestützt mit dem Programm „MASCOT“. Dabei werden die ermittelten Massen der tryptischen Peptidfragmente des zu analysierenden Proteins mit den theoretisch errechneten Fragmenten von Proteinen aus verschiedenen Datenbanken (*C. glutamicum*-Genomprojekt oder dem z.B. öffentlich zugänglichen TREMBL). Aus dem Grad der Übereinstimmung der tatsächlichen mit den theoretischen Fragmenten wird die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der das Analytprotein identifiziert wurde. Als signifikant gilt ein Suchergebnis, wenn die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um eine zufällige Übereinstimmung handelt, kleiner als 0,05 ist.

Zur Analyse werden der *C. glutamicum* Proteine werden folgende Parameter verwendet:

- *type of digest* : Trypsin
- *missed cleavages* : 0 – 1
- *variable modifications* : Oxidation (M)
- *peptide tolerance* : 0.2 – 0.8 %

14 Analyse der extrahierbaren Lipide (Mycolsäureverbindungen)

14.1 Isolierung extrahierbarer Lipide (und Mycolsäureverbindungen)

(Puech *et al.*, 2000)

- Anzucht der Zellen ü/N in MM1
- Zellen abzentrifugieren
- Pellet 2x in H₂O-bidest. waschen
- Zellen in geeigneter Menge CHCl₃/CH₃OH (1:1 (v/v)) aufnehmen
- 16h bei RT rühren
- abzentrifugieren (Phasentrennung)
- extrahierbare Lipide (und Mycolsäuren) befinden sich in organischer Phase

14.2 Auftrennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie (TLC)

- Probenvolumen unter Stickstoff auf geeignetes Volumen eindampfen
- geeignete Probenmenge auf HPTLC-Platten (Kieselgel) aufbringen
- Platte in Laufmittel CHCl₃/CH₃OH/H₂O (30:8:1 (v/v/v)) stellen
- Lauf abbrechen, sobald die Laufmittelfront kurz vor dem Plattenende ist

14.3 Nachweis von Doppelbindungen durch Jod

Beim Nachweis durch Jod werden ungesättigte Doppelbindungen angefärbt und die Substanzen so auf der TLC-Platte sichtbar gemacht. Verbindungen, die keine Doppelbindungen enthalten, können mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Da Mycolsäuren aus *C. glutamicum* aus einem homogenen Gemisch ungesättigter Ketten bestehen, ist die Methode u.a. zum Nachweis extrahierbarer Mycolsäuren geeignet.

- DC-Platte abdampfen lassen (Laufmittel)
- kleine Menge Jod großes Becherglas geben und mit Deckel schließen
- Behältnis leicht erhitzen (bis Joddampf zu sehen ist)
- Platte in Behälter stellen, bis Anfärbung in gewünschter Intensität erreicht ist

- TLC-Platte herausnehmen, etwas warten bis sich die Hintergrundfärbung reduziert hat
- Platte schnell dokumentieren, da Reaktion reversibel
- Färbereaktion kann beliebig oft wiederholt werden

14.4 Anthron-Nachweis der Glycolipide

Mit Hilfe des Anthron-Nachweises lassen sich die in die Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Glycoproteine anfärben. Auf diese Weise ist es ebenfalls möglich, u.a. die Trehalosemycolate zu visualisieren und Informationen über weitere in der DC aufgetrennte Substanzen zu sammeln.

- DC-Platte nach Lauf abdampfen lassen (Laufmittel)
- Platte mit 0,2% Anthron in konzentrierter H_2SO_4 besprühen (! Abzug !)
- Erhitzen auf 110 °C, bis Veraschung vollständig
- Glycolipide bleiben als schwarze Flecken auf Glasplatte zurück

14.5 Phospholipidnachweis mit Molybdänblau

(Dittmer & Laster, 1964)

Phospholipide werden durch Besprühen mit Molybdänblaureagenz nachgewiesen. Während des Besprühens bei Zimmertemperatur erscheinen die Phosphatide blau auf weißem Grund.

- DC-Platte nach Lauf abdampfen lassen (Laufmittel)
- dünn mit Molybdänblaureagenz besprühen (! Abszug !)
- wenn die Banden ausreichend gefärbt sind: DC dokumentieren

14.6 Lipidnachweis mit Molybdänblau

Als weiterführendes Experiment des Phospholipidnachweises mit Molybdänblau lassen sich mit dieser Methode auch Lipide nachweisen.

- DC-Platte mit Molybdänblau besprühen
- Platte bei 100°C erhitzen
- blaue Farbe verschwindet
- Lipide werden stark verkohlt, blaue Farbe verschwindet

14.6 R_f-Wert-Bestimmung

(Gänshirt, 1966)

Der R_f-Wert gibt bei der Dünnschichtchromatographie die Wanderungsweite der Substanzen an. Mit Hilfe R_f-Wertes können unterschiedliche DC's miteinander verglichen werden, da der Quotient aus dem Abstand des Bandenmittelpunktes und der Laufmittelfront eine von der Laufzeit und damit der Auftrennungsweite unabhängige Größe widerspiegelt. Dabei wird R_f wie folgt berechnet:

$$R_f = \frac{\text{Entfernung des Bandenmittelpunktes vom Startpunkt}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Start}}$$

IV Ergebnisse

1 Identifizierung von PS2/*cspB*

Am Anfang der Untersuchungen stand zum einen die Identifizierung des Gens *cspB* im Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, welches bereits aus *C. glutamicum* ATCC17965 („*C. melassecola*“) bekannt war und für das *S-layer*-Protein PS2 kodiert (Peyret *et al.*, 1993). Für den Nachweis des Gens bzw. des Proteins wurden unterschiedliche Methoden angewandt.

1.1 Homologe Hybridisierung mit *cspB*

Um festzustellen, ob das Gen *cspB* auch in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 lokalisiert ist, wurden homologe Hybridisierungsexperimente mit dem markierten Gen aus *C. glutamicum* ATCC17965 durchgeführt.

Dabei wurde gegen folgende Filter hybridisiert:

| | |
|--------------|--|
| PFGE-Filter | (<i>Swal</i> -, <i>Pacl</i> -, und <i>Pmel</i> -gespaltene Gesamt-DNA, Diplomarbeit S. Brand, 1998) |
| Cosmidfilter | (1800 Cosmidklone, die das Gesamtgenom ca. 20fach abdecken, Diplomarbeit O. Brockmann-Gretza, 1998) |

Bei keiner der Hybridisierungen konnte ein positives Signal detektiert werden. Auch ein Absenken der Temperatur auf 50 °C, um heterologe Hybridisierung zu ermöglichen, ergab keinen Hinweis auf die Existenz von *cspB* in *C. glutamicum* ATCC13032.

1.2 PCR-Experimente mit *cspB* spezifischen *Primern*

Als weitere Möglichkeit zur Identifikation des Gens *cspB* auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 wurden PCR-Experimente durchgeführt (Abb. IV.1). Zu diesem Zweck wurden Primer generiert, die an verschiedenen internen bzw. den direkt angrenzenden DNA-Bereichen des *cspB*-Gens binden können (*csp2_1-csp2_6*; vgl. Material und Methoden: Tab.III.3). Mit keiner der 9 möglichen *Primer*-Kombinationen konnte eine Amplifikat erzeugt werden, obwohl die Temperatur u.a. weit unter den normalen *Annealing*-Vorgaben lag. Als Positiv-Kontrolle diente der Stamm *C. glutamicum* ATCC17965, bei dem mit den eingesetzten Primern ein entsprechendes Amplifikat erzeugt werden konnte.

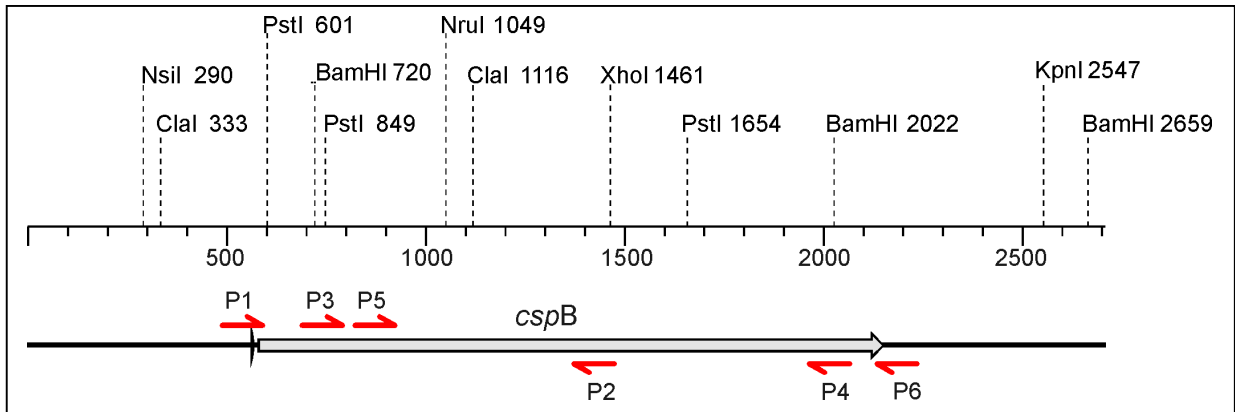


Abb.IV.1: Schematische Darstellung der Primer-Positionen auf dem *C. glutamicum* ATCC17965 *cspB*-Gen. P1-P6 = Primer *cspB*_1 – *cspB*_6 (Tab.III.3).

1.3 Suche nach *cspB* im *C. glutamicum* Genomprojekt

Seitdem das *C. glutamicum* ATCC13032-Genom am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld Ende 1999 zu 85 % sequenziert worden ist, war eine Datenbanksuche nach *cspB* bzw. *cspB*-homologen Genen auf Sequenzebene möglich. Die mit dem Programm „MAGPIE“ durchgeführte automatische Annotation (BLAST), bei der insgesamt 8902 *orf*'s (eine spätere Annotation durch „Pedant Pro“ der Firma BIOMAX reduzierte die Anzahl auf 3287) erfaßt wurden, konnte jedoch keine *orf*'s identifizieren, die Ähnlichkeit zu *cspB* aus *C. glutamicum* ATCC17965 oder Genen von *S-layer*-Proteinen anderer Bakterien-Stämme aufweisen. Spätere Untersuchungen an der vollständigen *C. glutamicum* ATCC13032 Genomsequenz, welche von der Firma Kiowa Hako veröffentlicht wurde (Nakagawa *et al.*, 2001), konnten diese Ergebnisse bestätigen.

1.4 Identifikation von PS2 im Zellhüllenproteinextrakt

Da auch nach den vorangegangenen Analysen die Möglichkeit bestand, daß *C. glutamicum* ATCC13032 ein *S-layer* Protein mit einer bisher nicht in Datenbanken erfaßten Sequenz trägt, wurde untersucht, ob auf der Zellhülle ein Protein in ähnlich großer Menge vorkommt wie PS2 in *C. glutamicum* ATCC17965. Zu diesem Zweck wurden die durch Detergenzbehandlung (Extraktion der gewaschenen Zellen mit 4% SDS bei 100 °C für 5 min (Chami, 1997)) erstellten Zellhüllenproteinextrakte beider Stämme miteinander verglichen. Die Kulturen wurden zuvor, entsprechend der Literaturvorgaben, in Flüssig-Vollmedium (LBG bis ca. o.D.₅₈₀ = 5) angezogen (Koval & Murray, 1986; Sleytr, 1978). Es zeigte sich im 10%igen

SDS-PAGE, daß beim Zellhüllenproteinextrakt von *C. glutamicum* ATCC13032 keine Bande bei 63 kD (apparentes Molekulargewicht von PS2) zu erkennen war (Abb.VI.2). Außerdem ist im Bereich der tatsächlichen PS2-Proteinmasse von ca. 52,5 kD keine prominente Bande im Gel detektierbar. Insgesamt konnte kein Protein identifiziert werden, das in PS2-entsprechender Menge vorkommt und somit in der Lage wäre, eine die Zelle umgebende *S-layer*-Schicht auszubilden. Ein Hinweis auf die Existenz von PS2 war dieser Analyse also nicht zu entnehmen.

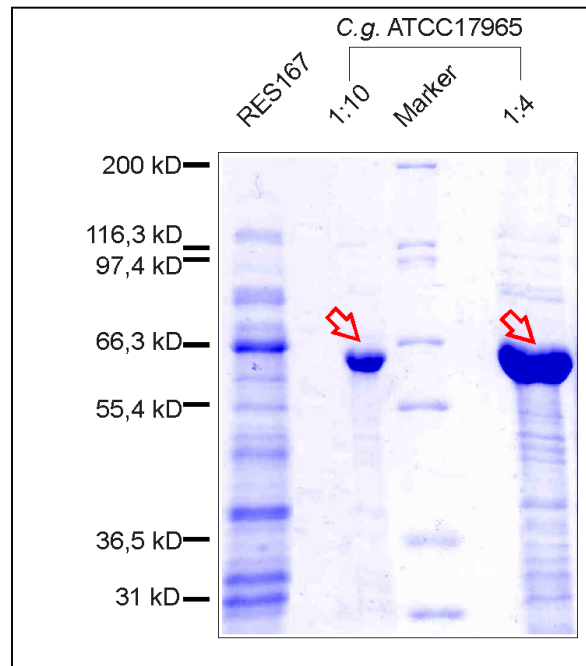


Abb.VI.2: 10%-SDS-PAGE extrahierter *C. glutamicum* Zellhüllenproteine. Die von *C.g.* ATCC17965 aufgetragenen Extrakte sind entsprechend der Beschriftung verdünnt. Der Pfeil markiert die PS2-Bande. (RES167 = restriktionsdefekter *C. glutamicum* ATCC13032 Wildtyp.

1.5 *cspB*/PS1 in *C. glutamicum* ATCC13032

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, daß es in dem Stamm *C. glutamicum* ATCC13032, anders als in *C. glutamicum* ATCC17965 („*C. melassecola*“), kein *cspB*/PS2 und damit auch kein die Zellhülle umgebenden *S-layer* gibt. So konnte auf experimenteller Ebene und auf Basis des Genomprojektes weder *cspB*, noch ein ähnliches Gen identifiziert werden. Zusätzliche Analysen der Zellhüllenproteine konnten die Existenz eines Proteins, bei dem es sich um einen *S-layer* Protein handeln könnte, nahezu ausschließen.

1.6 Untersuchung anderer *C. glutamicum*-Stämme auf das Vorhandensein eines *S-layer*s

Analysen der extrahierbaren Zellhüllenproteine anderer *C. glutamicum* Stämme sollten klären, ob nur *C. glutamicum* ATCC13032 nicht über einen *S-layer* verfügt bzw. *C. glutamicum* ATCC17965 als einziger *C. glutamicum*-Stamm einen *S-layer* trägt. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien 28 weiterer *C. glutamicum*-Stämme (Tab. IV.1) in Flüssig-Vollmedium angezogen (LBG bis ca. o.D.₅₈₀ = 5), die jeweiligen Zellhüllen-Proteinextrakte erstellt (4 %ige SDS Behandlung bei 100°C für 5 min) und in einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. IV.3). Dabei wurde immer dieselbe Menge Extrakt/Zellpellet eingesetzt (v/v), damit die Mengen extrahierbarer Proteine direkt miteinander vergleichbar waren. Es zeigte sich, daß die Extrakte von 12 (+ evtl. 2) Stämmen (entspricht ca. 43 % (evtl. 50 %)) im Gel eine Proteinbande mit PS1-entsprechender Menge aufwiesen, diese Stämme verfügen demnach vermutlich ebenfalls über einen *S-layer*. Damit ist *C. glutamicum* ATCC13032 kein Einzelfall, da ca. die Hälfte aller untersuchten *C. glutamicum* Stämme ebenfalls über keine *S-layer*-Schicht verfügt.

| Stamm | <i>S-layer</i> | Stamm | <i>S-layer</i> |
|------------|----------------|------------|----------------|
| ATCC 13058 | - | ATCC 17966 | - |
| ATCC 13744 | + | ATCC 19223 | - |
| ATCC 13745 | - | ATCC 19240 | - |
| ATCC 14017 | - | ATCC 21341 | - |
| ATCC 14020 | - | ATCC 21645 | + |
| ATCC 14067 | + | ATCC 31808 | +/- |
| ATCC 14068 | - | ATCC 31830 | + |
| ATCC 14747 | + | ATCC 31832 | + |
| ATCC 14751 | + | DM 447 | - |
| ATCC 14752 | - | DSM 20137 | - |
| ATCC 14915 | +/- | DSM 20598 | - |
| ATCC 15243 | + | DSM 46307 | - |
| ATCC 15354 | + | 22220 | + |
| ATCC 17965 | + | 22243 | + |

Tab. IV.1: Liste der *C. glutamicum*-Stämme, die auf eine mögliche Existenz von *S-layer*-Proteinen untersucht wurden. + = *S-layer* tragend; - = kein *S-layer*; +/- = eindeutige Aussage nicht möglich

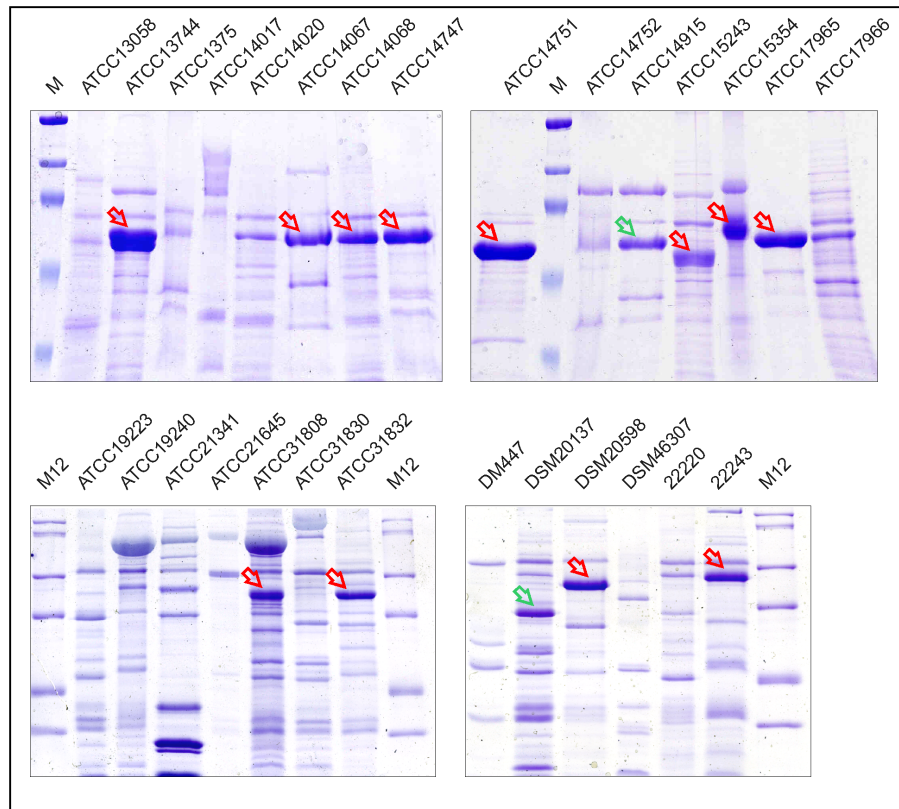


Abb.IV.3: SDS-PAGE (10%) mit durch Behandlung mit 4% SDS bei 100°C extrahierten Zellhüllenproteinextrakten verschiedener *C. glutamicum*-Stämme.

Der rote Pfeil deutet auf ein Protein in *S-layer* ausreichender Menge hin, der grüne Pfeil auf ein in möglicher Weise ausreichender Menge.

C. glutamicum ATCC17965 stellt die *S-layer* tragende Positivkontrolle dar.

M = Proteinmassen-Standard (201; 130; 94; 48,6; 36,4; 29,8; 20,6 kD)

M12 = Mark12 (116,3; 97,2; 66,3; 55,4; 36,5; 31,0 kD)

2 Identifizierung von *csp1*

Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit war die Identifizierung und Analyse von *csp1* in *C. glutamicum* ATCC13032, welches ebenfalls aus *C. glutamicum* ATCC17965 („*C. melassecola*“) bekannt war (Joliff *et al.*, 1992). Das Gen kodiert dort für das Protein PS1, welches als Mycolyltransferase Mycolylreste von einem Trehalosemonocorynemycolat (TMCM) auf ein weiteres Molekül TMCM überträgt und so Trehalosedicorynemycolat (TDCM) synthetisiert.

2.1 Homologe Hybridisierung von *csp1*

Zur Identifizierung von *csp1* auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde, analog zu *cspB*, mit einer markierten Probe des Gens aus *C. glutamicum* ATCC17965 gegen PFGE- und Cosmidfilter hybridisiert (Brand, 1998). Dabei konnte das Gen auf dem Chromosom eindeutig identifiziert und dem *Swal*-Fragment Nr. 2 der physikalischen Makrorestriktionskarte und dem Cosmid 5b22 der minimalen Cosmidkarte zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Einordnung in die später erstellte Contigkarte (Tauch, 2000) erfolgte im Contig C2 (Abb. IV.4).

2.2 Suche nach *csp1* im *C. glutamicum* ATCC13032 Genomprojekt

Im Rahmen des *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Genomprojektes konnte der *orf* 5b22_63 der MAGPIE-Annotation als *csp1*-Gen identifiziert werden. Dabei weist das Gen eine 99%-ige Identität zu *csp1* aus *C. glutamicum* ATCC17965 (*C. melassecola*) auf. So konnten beim translatierten Protein lediglich neun Aminosäureaustausche festgestellt werden (Anhang, Abb.VII.1), 3 davon zu ähnlichen Aminosäuren. Neben *csp1* konnten im Genom acht weitere *orf*'s identifiziert werden, deren translatierten Proteine eine Homologie zu PS1 (Tab. IV.2) und damit zum Teil zu Proteinen des Antigen85-Komplexes aus *Mycobacterium* aufweisen. Entsprechend der Nomenklatur von *csp1* wurden die Gene *csp2-csp9*, die kodierten Proteine PS1B-PS1I genannt. Das ursprünglich schon aus *C. glutamicum* ATCC17965 bekannte PS1 wurde zur Einreihung in diese Nomenklatur in PS1A umbenannt (Tab.IV.2). Nach Einordnung der Gene in die physikalische Contigkarte zeigte sich, daß die Gene nicht in Clustern organisiert vorliegen, sondern über das ganze Chromosom verteilt sind (Abb.IV.4). Lediglich *csp1* und *csp3* befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft. Bei Betrachtung der Genumgebung (Abb.IV.5) wird nochmals die Nähe der Gene *csp1* und *csp3* deutlich, wobei der Abstand nur ca. 2 kb entspricht. Ansonsten sind in der direkten

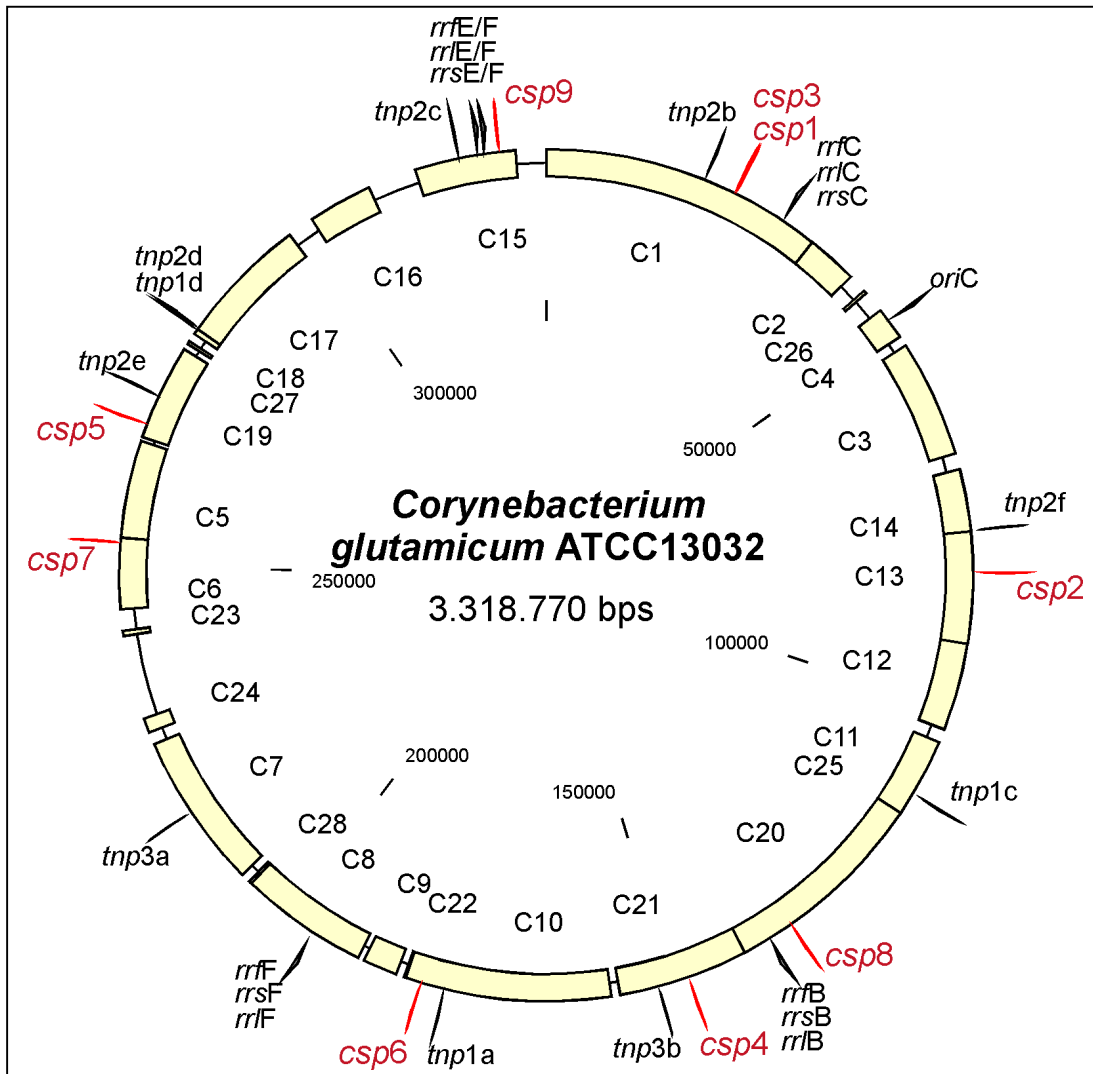


Abb.IV.4: Physikalische Contigkarte von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Neben Genen für IS-Elemente (*tnp*), *rrm* (*rrf/rrl/rrs*) und dem Replikationsursprung (*oriC*) sind die Gene *csp1-csp9* für die PS1-Proteine eingetragen.

| Bez. | orf | bp | AS | SP (AS) | Hom1 (%) | Hom2 (%) |
|--------------------|----------|------|-----|---------|-------------|--------------|
| <i>csp1</i> / PS1A | 5b22_063 | 1974 | 657 | 43 | | |
| <i>csp2</i> / PS1B | 4m8_018 | 1182 | 365 | 29 | 16,0 / 34,2 | 29,0 / 62,7 |
| <i>csp3</i> / PS1C | 5b22_054 | 1026 | 341 | 37 | 17,2 / 33,6 | 33,4 / 65,4 |
| <i>csp4</i> / PS1D | 1m15_069 | 1452 | 483 | 31 | 17,4 / 37,9 | 25,0 / 55,5 |
| <i>csp5</i> / PS1E | 5p3_059 | 1452 | 483 | 31 | 17,9 / 37,7 | 26,4 / 57,5 |
| <i>csp6</i> / PS1F | 2k5_039 | 1236 | 411 | 26 | 18,1 / 36,9 | 30,9 / 63,0 |
| <i>csp7</i> / PS1G | 3f13_090 | 681 | 226 | nein | 11,3 / 19,0 | 31,9 / 53,5 |
| <i>csp8</i> / PS1H | 4n21_045 | 1584 | 527 | 24 | 12,0 / 26,2 | 17,26 / 37,8 |
| <i>csp9</i> / PS1I | 5o17_026 | 1623 | 540 | 27 | 11,2 / 22,5 | 17,8 / 35,7 |

Tab.IV.2: Auflistung der *csp*-Gene. Angegeben werden *orf*-Nummer in der MAGPIE-Annotation des *C. glutamicum* ATCC13032-Genomprojektes (*orf*), *orf*-Länge (bp), Größe des translatierten Proteins (AS), Länge des Signalpeptides falls vorhanden (SP (AS)), Identität/Ähnlichkeit des Proteins zu PS1A nach „Clustal W“ (Hom1 (%)) und Anzahl der identischen/ähnlichen Aminosäuren des homologen Proteins zu PS1A (Hom2 (%)).

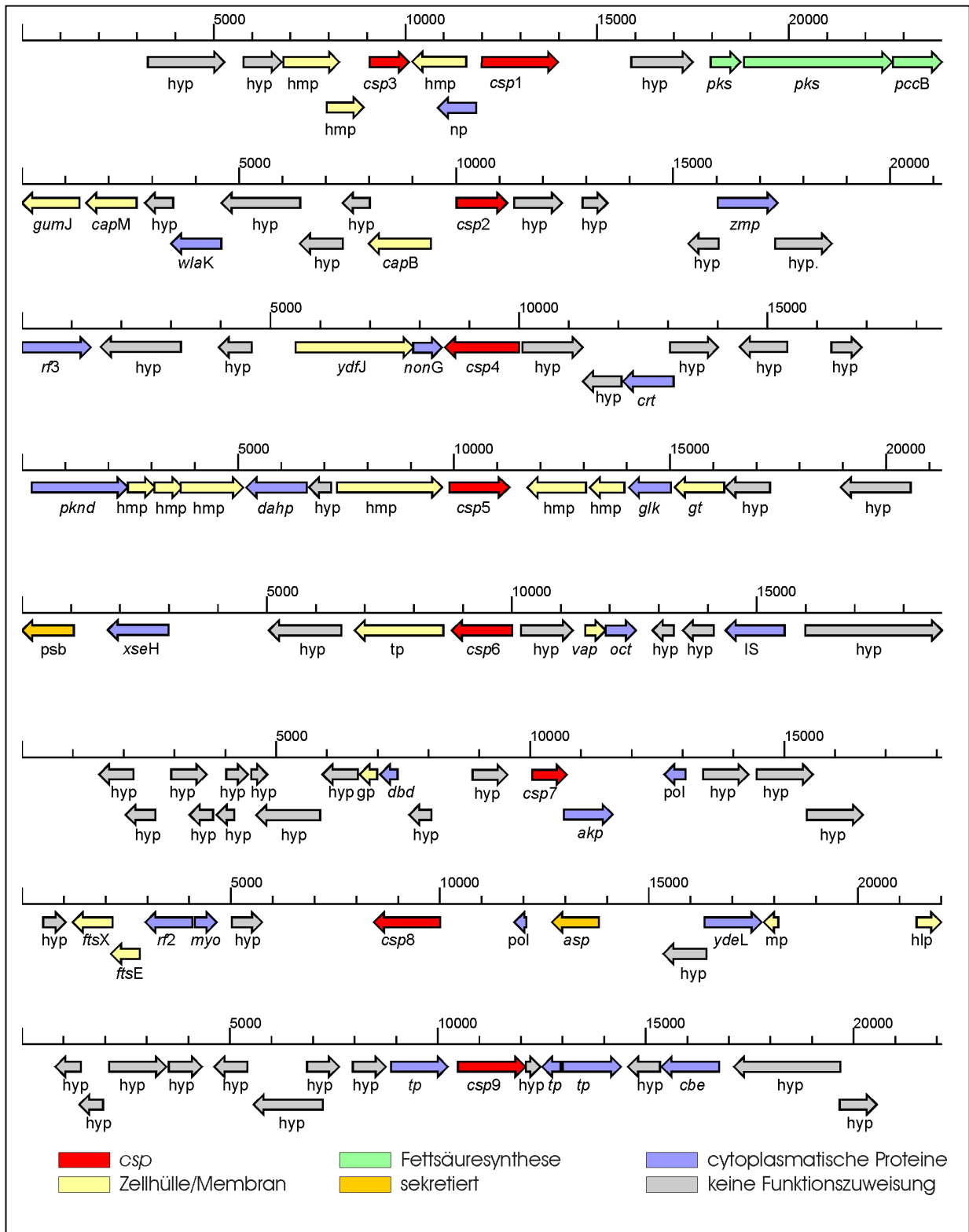


Abb.IV.5: Darstellung der Genumgebung der jeweiligen *csp*-Gene (PS1) von *C. glutamicum* ATCC13032.

akp = Protein der Atmungskette / *asp* = Alkalische Serin Protease / *capB* = Capsid-Synthese / *cbe* = Carboxylesterase / *crt* = Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase / *dahp* = Antibiotikasyntese / *dbd* = Dehydroxybutyrat-Dehydrogenase / *fts* = Zellteilung / *klk* = Glukokinase / *gp* = Glycoprotein / *gt* = Glycosyltransferase / *gumJ* = Polysaccharid-Transporter / *hmp* = Hypothetisches Membranprotein / *hlp* = Hüllprotein / *hyp* = Hypothetisches Protein / *pks* = Polyketidsynthese / *mp* = Membranprotein / *myo* = Myo-Inositol-Monophosphatase / *nonG* = transkriptionaler Repressor / *IS* = IS-Element / *np* = Nuclear Protein / *oct* = Ornithin Carbamoyl-Transferase / *pol* = DNA-Polymerase / *pccB* = Propionyl-CoA-Carboxylase / *pknD* = Threonin Kinase / *psb* = putativ sekretiertes Protein / *rf* = peptide chain release factor / *tp* = Transportprotein (Glycin) / *tp* = Transposase / *vap* = Virulenz assoziiertes Protein / *wlaK* = Aminotransferase / *xseA* = Exonuklease / *ydeL* = Regulatorprotein / *ydfJ* = MMPL1 (integrales Membranprotein) / *zmp* = Zinkmetalloprotease

Umgebung dieser beiden Gene noch einige Gene lokalisiert, die für Membranproteine oder Proteine, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sein können wie z.B. Polyketidsynthasen, kodieren. Eine ähnliche Anhäufung von Genen für möglichen Membran bzw. Zellhüllenproteinen findet man noch bei *csp3* und *csp5*. Eine Anordnung in Operons konnte nicht identifiziert werden. Keines dieser Gene befindet sich in der näheren Umgebung von *csp9* und nur eines bei *csp7*.

2.3 Sequenzanalyse der *csp1*-homologen *orf's*

Die translatierten Aminosäuresequenzen der Gene *csp2-9* wurden mit Hilfe des Computerprogramms "Clustal W" mit der AS-Sequenz von PS1A verglichen (Abb. IV.6; Tab. IV.2). Dabei stellte sich heraus, daß die Proteine PS1B, PS1C, PS1D, PS1E und PS1F, wie auch die Proteine des Antigen85 Komplexes aus *M. tuberculosis*, Ähnlichkeiten zum N-terminalen Bereich von PS1A aufweisen. PS1G, PS1H und PS1I zeigen jedoch Ähnlichkeit zur C-terminalen Hälfte bzw. gehen über den C-Terminus von PS1A hinaus. Mit Hilfe eines phylogenetischen Stammbaums ließen sich die relativen Verwandtschaftsgrade der Antigen-85-homologen Proteine untereinander und zu den Proteinen des Antigen85-Komplexes, errechnet auf Basis der Aminosäuresequenzhomologien, ablesen (Abb. IV.7.). Eine Einteilung in Klassen wie bei den Antigen85-Proteinen von *Mycobacterium* oder eine Zuordnung zu diesen Proteinen war nicht möglich. Lediglich PS1D und PS1F weisen eine extrem hohen Verwandtschaftsgrad auf. Sequenzanalysen konnten zeigen, daß diese beiden Proteine eine Identität von 97% aufweisen. Von den 15 detektierten Aminosäureaustauschen handelt es sich bei 11 um die Ersetzung durch eine ähnliche Aminosäure (Anhang: Abb. VII.2).

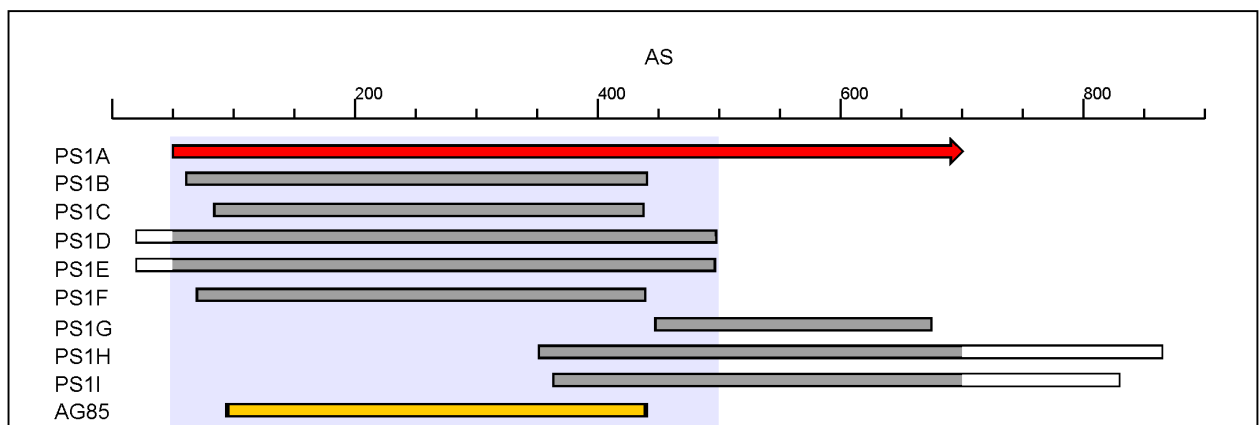


Abb.IV.6: Darstellung der Homologiebereiche der PS1B,C,D,E,F,G,H,I-Proteine aus *C. glutamicum* ATCC13032 und Antigen85 (AG85) aus *Mycobacterium tuberculosis* zu PS1A. Weiße Füllungen markieren Genbereiche außerhalb der Homologie zu PS1A. Die AS-Sequenz von PS1A (bzw. der anderen Proteine), die zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaums verwendet wurde, ist blau hinterlegt.

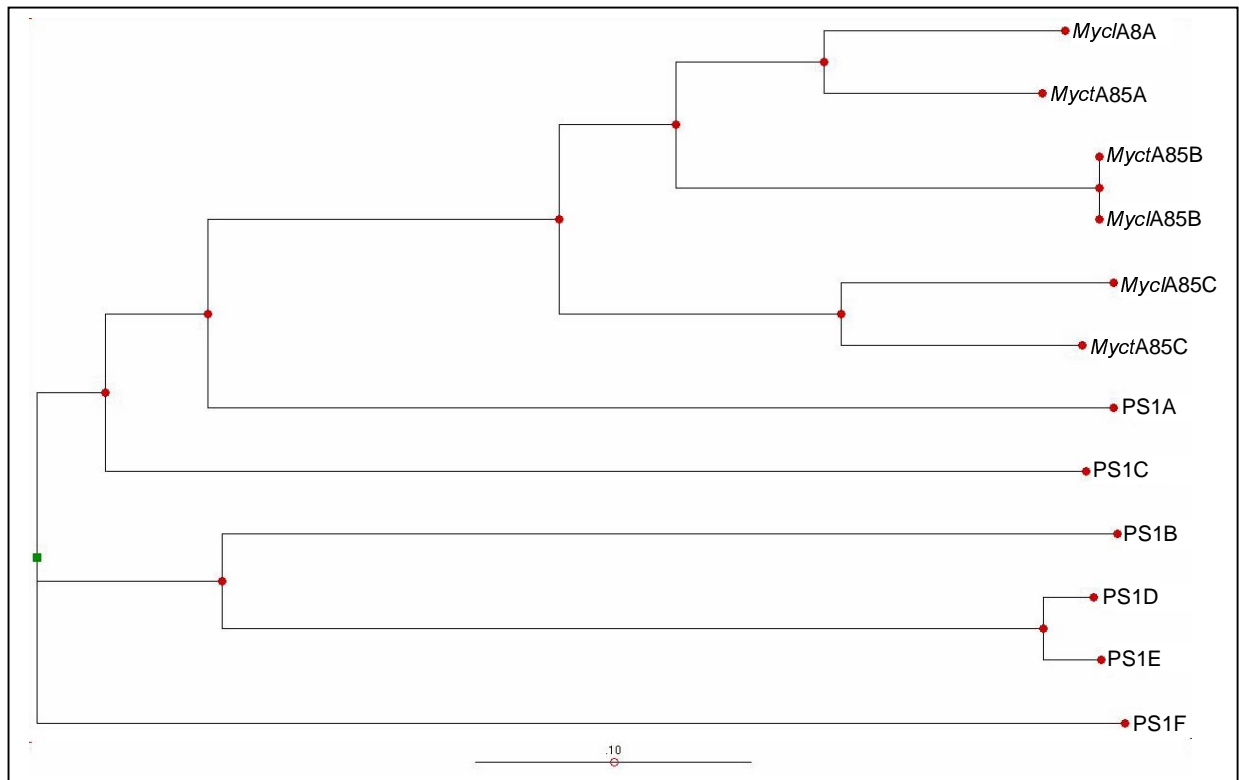


Abb.IV.7: Phylogenetischer Stammbaum von PS1A-F aus *C. glutamicum* ATCC13032 und den Antigen85-Proteinen (A85 A, B, C) aus *Mycobacterium tuberculosis* (*Myct*) und *M. leprae* (*Mycl*).

Desweiteren wurden Analysen mit Hilfe des auf "Hidden-Markov-Modellen" und neuronalen Netzwerken basierenden Computerprogramms "SignalP 2.0" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>) durchgeführt. Diese Untersuchungen ermöglichten die Identifizierung von sogenannten *Leaderpeptiden* (Tab.IV.3). Diese stark hydrophoben *N*-terminalen Abschnitte werden von der Zelle benötigt, damit sie die entsprechenden Proteine aus der Zelle schleusen kann (Heijne, 1990). Auf diese Weise sollte ermittelt werden, welche der durch Genomanalysen in *C. glutamicum* ATCC13032 identifizierten PS1-Proteine tatsächlich Bestandteil der Zellhülle sein können. Dabei zeigte sich, daß lediglich PS1G nicht über die zur Ausschleusung aus der Zelle notwendigen Signalsequenz verfügt. Alle anderen Proteine weisen die typische *N*-terminale Ansammlung von positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren auf (Abb.IV.8).



Abb.IV.8: Darstellung der Signalpeptide von PS1A-I in *C. glutamicum* ATCC13032. Positiv geladene Aminosäuren sind mit einem ⊕ versehen, hydrophobe Bereiche grün hinterlegt. Der rote Doppelpfeil markiert die Signalpeptid-Schnittstelle.

3. Systematische Analyse der extrahierbaren Zellhüllenproteine von *C. glutamicum* ATCC13032

3.1. Identifizierung der extrahierbaren Zellhüllenproteine im eindimensionalen (1D) SDS-PAGE

Um herauszufinden, ob PS1 und welche PS1-homologen Proteine auf der Zellhülle lokalisiert sind, wurden die durch sanfte SDS-Behandlung auf Eis für 5 min (Hermann *et al.*, 2000) hergestellten Zellhüllenproteinextrakte zunächst in einem 1D-SDS-Polycrylamidgel (10%) aufgetrennt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte zuvor in Minimalmedium (MM1) bis zu einer o.D.₅₈₀ 4-5. Die im Gel aufgetrennten Proteinbanden wurden anschließend aus dem Gel geschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die auf diese Weise erhaltenen Peptidfragmente konnten mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer identifiziert werden, so daß für jede Probe ein typischer „*fingerprint*“ erstellt werden konnte. Diese Peptidmuster konnten anschließend mit Hilfe des Computerprogramms MASCOT (Hirosawa *et al.*, 1993) mit der Datenbank des *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Genomprojektes verglichen werden, so daß eine Zuordnung der analysierten Proteine zu den entsprechenden durch MAGPIE annotierten Genen und damit auch einer durch Homologievergleiche vorausgesagten Funktion möglich war (Abb. IV.9; Abb. IV.10, Tab. IV.3).

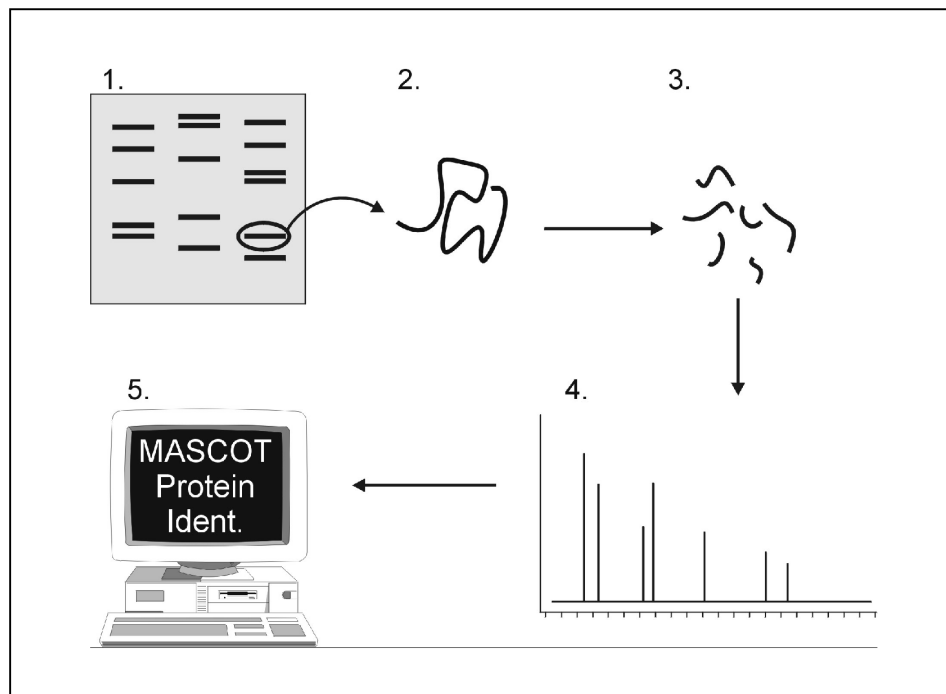


Abb.IV.9: Schematische Darstellung eines Ablaufs zur Identifizierung eines Proteins mittels MALDI-TOF-„*fingerprint*“-Analysen.

SDS-PAGE (1); Ausschneiden der Bande, die das zu untersuchende Protein enthält (2), tryptischer Verdau (3), Erstellung des Massenspektrums der Peptid-Fragmente (4) und anschließende Identifizierung der Proteine durch Abgleich der Peptidfragmente mit der *C. glutamicum* ATCC13032 Gendatenbank durch MASCOT(5).

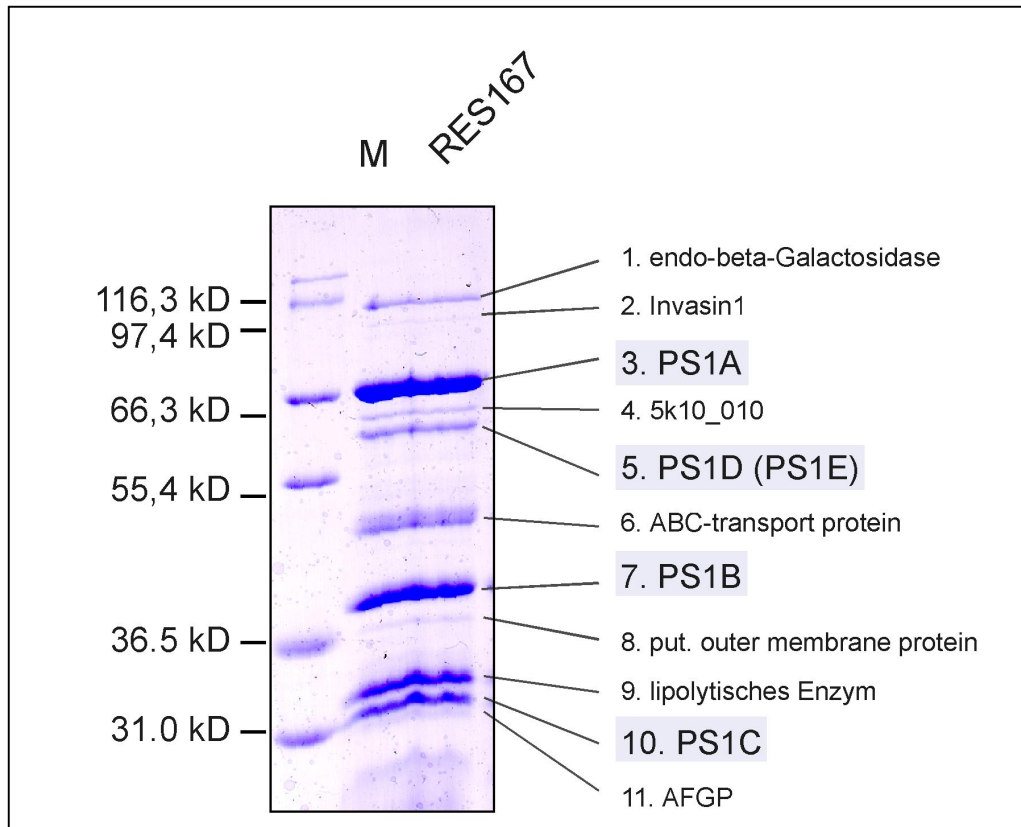


Abb.IV.10: 1D-SDS-PAGE (10%) der durch SDS-Behandlung auf Eis extrahierten *C. glutamicum* ATCC13032 (RES = restriktionsdefekter WT-Stamm) Zellhüllenproteine. Die durch kombinierte MALDI-TOF/MASCOT-Analysen erzielten Funktionszuordnungen der Proteine sind nummeriert neben dem Gel wiedergegeben.

| | Hit | orf | Größe | Funktionszuweisung | SP |
|----|-----|----------|-------|---|----|
| 1 | 77 | 3a19_040 | 79265 | endo-beta-Galactosidase | + |
| 2 | 166 | 1k10_081 | 65936 | Invasin 1 | + |
| 3 | 121 | 5b22_063 | 70634 | PS1A | + |
| 4 | 42 | 5k10_010 | 10981 | keine Homologie öffentlichen Datenbanken | - |
| 5 | 66 | 5p3_059 | 45474 | PS1D/PS1E | + |
| | 63 | 1m15_069 | 53012 | | |
| 6 | 67 | 3k6_080 | 40722 | ABC-Transport-Protein | + |
| 7 | 180 | 4m8_018 | 42652 | PS1B | + |
| 8 | 53 | 3b24_057 | 22856 | putatives Membranprotein (<i>outer membran</i>) | + |
| 9 | 73 | 6d13_083 | 36040 | lipolytisches Enzym | + |
| 10 | 36 | 5b22_054 | 37180 | PS1C | + |
| 11 | 110 | 3k6_039 | 29476 | Antifreeze-Glycoprotein (AFGP) | + |

Tab.IV.3: Auflistung der im 1D-SDS-PAGE identifizierten Proteine des Zellhüllenextraktes von *C. glutamicum* ATCC13032. Hit = Qualität der MASCOT-Identifizierung; orf = orf-Nr. in MAGPIE-Annotation des Genomprojektes; Größe = vorausgesagte Größe aufgrund der Sequenz des zugeordneten orf's (incl. Signalpeptid) ; SP = Existenz eines Signalpeptides (auf Basis der Sequenz).

Die Untersuchungen der Zellhüllenproteinextrakte, aufgetrennt in der 1D-SDS-PAGE, haben ergeben, daß PS1A auf der Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032, wie auch PS1 bei *C. glutamicum* ATCC17965 („*C. melassecola*“), zu finden ist. Von den im Genom identifizierten PS1-Proteinen waren lediglich PS1D (PS1E), PS1B und PS1C zu finden. Für die Existenz von PS1F, PS1G, PS1H und PS1I konnte kein Hinweis gefunden werden. Außerdem war aufgrund der sehr großen Identität von PS1D und PS1E keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Proteinen durch MALDI-TOF/MASCOT-Analysen möglich (Abb. IV.11), so daß eine eindeutige Aussage zu Bande Nr. 5 nicht durchgeführt werden konnte.

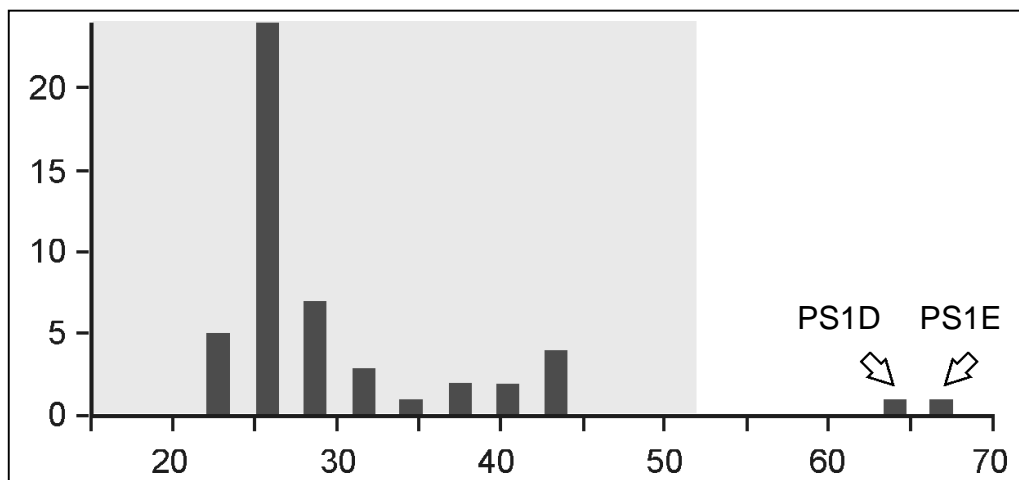


Abb.IV.11: Darstellung einer MASCOT-Identifizierung für die Proteinbande Nr. 5. Balken außerhalb des grauen Bereichs stehen für signifikante Zuordnungen (Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Zuordnung : $p < 0,05$). Deutlich ist zu erkennen, daß die beiden Protein PS1D und PS1E mit ca. gleicher Signifikanz identifiziert werden.

3.2 Identifizierung der extrahierbaren Zellhüllenproteine im zweidimensionalen (2D) Gel

Zusätzlich zum 1D-SDS-PAGE des Zellhüllenproteinextraktes wurden auch 2D-Gele analysiert. Auf diese Weise konnten auch die Proteine identifiziert werden, die sich im 1D-Gel hinter prominenten Banden verbergen bzw. die aufgrund ihrer geringen Konzentration durch Coomassie-Blau-Färbung nicht visualisiert werden konnten. Die Anzucht der Bakterien erfolgte, wie bei der Probenvorbereitung für das 1D-Gel, in Minimalmedium (MM1) bis zu einer o.D.₅₈₀ von 4-5. Die für das 2D-Gel hergestellten Extrakte wurden jedoch mit 4% CHAPS statt 4% SDS als Detergenz erzeugt, da SDS aufgrund seiner Ladung Probleme bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) bereitet und daher für die erste Dimension nicht geeignet ist. Bei CHAPS, welches mit seiner Eigenschaft als Zwitterion auch Bestandteil des Rehydrierungspuffers für die IEF ist, ist das nicht der Fall. Ebenfalls aus Gründen der isoelektrischen Fokussierung mußten die Extrakte einer Dialyse unterzogen und mit Aceton gefällt werden, so daß die Proben möglichst frei von Salzen waren. Vergleichende Untersuchungen mit Hilfe der 1D-SDS-PAGE zeigten keine Unterschiede der Proteinprofile zwischen den mit SDS und mit CHAPS hergestellten Extrakten. Zur Darstellung im 2D-Gel wurden ca. 350 µg Protein eingesetzt. Für die isoelektrische Fokussierung wurde ein Bereich von pH 4 - pH 7 gewählt, die Auftrennung erfolgte in einem Excel-Gradientengel (12% - 14%) (Abb. IV.12).

Im Coomassie-Blau gefärbten Gel ließen sich ca. 120 Proteinspots detektieren. Zusätzlich fielen vier Streifen auf, in denen sich die entsprechende Probe nicht fokussieren ließ. Für die Identifizierung wurden 38 Spots (bzw. Proben der horizontalen Banden) aus dem Gel geschnitten und nach tryptischem Verdau der Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-„fingerprinting“ und MACOT zugeführt (Tab. IV.4; Anhang Tab. VII.6.1). Bei diesen Analysen stellte sich heraus, daß es sich bei den horizontalen Streifen um PS1A, PS1B und PS1C handelt. Der unterste Streifen, der bei ca. 20 kD bandiert, ließ sich nicht identifizieren. Desweiteren konnten keine Ähnlichkeiten zu einem der anderen sechs PS1-Proteinen im 2D-Gel gefunden werden, obwohl PS1D/E im 1D-Gel lokalisierbar waren. Zusätzliche 2D-Proteingel-Analysen von *C. glutamicum*-Zellen, die in Vollmedium (LBG) angezogen wurden, ergaben keine wesentlichen Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Die nicht isoelektrisch fokussierten horizontalen Streifen konnten auch in diesem Fall als PS1A, PS1B und PS1C identifiziert werden.

Zusätzlich wurden Westernblot-Analysen der 2D-Gele von Zellhüllenproteine mit Antikörpern gegen die Zelloberfläche von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (polyklonales Gemisch aus einem Kaninchen, welches mit ganzen *C. glutamicum*-Zellen immunisiert worden ist) durchgeführt (Abb. IV.13). Dabei konnte gezeigt werden, daß der Antikörper lediglich mit den horizontalen „Schmierstreifen“, die aus nicht isoelektrisch fokussierten Proteinen der ersten Dimension bestehen, reagiert. Es erscheint jedoch eine zusätzliche horizontale Bande bei ca. 40-45 kD. Bei dieser Bande könnte es sich um das stark

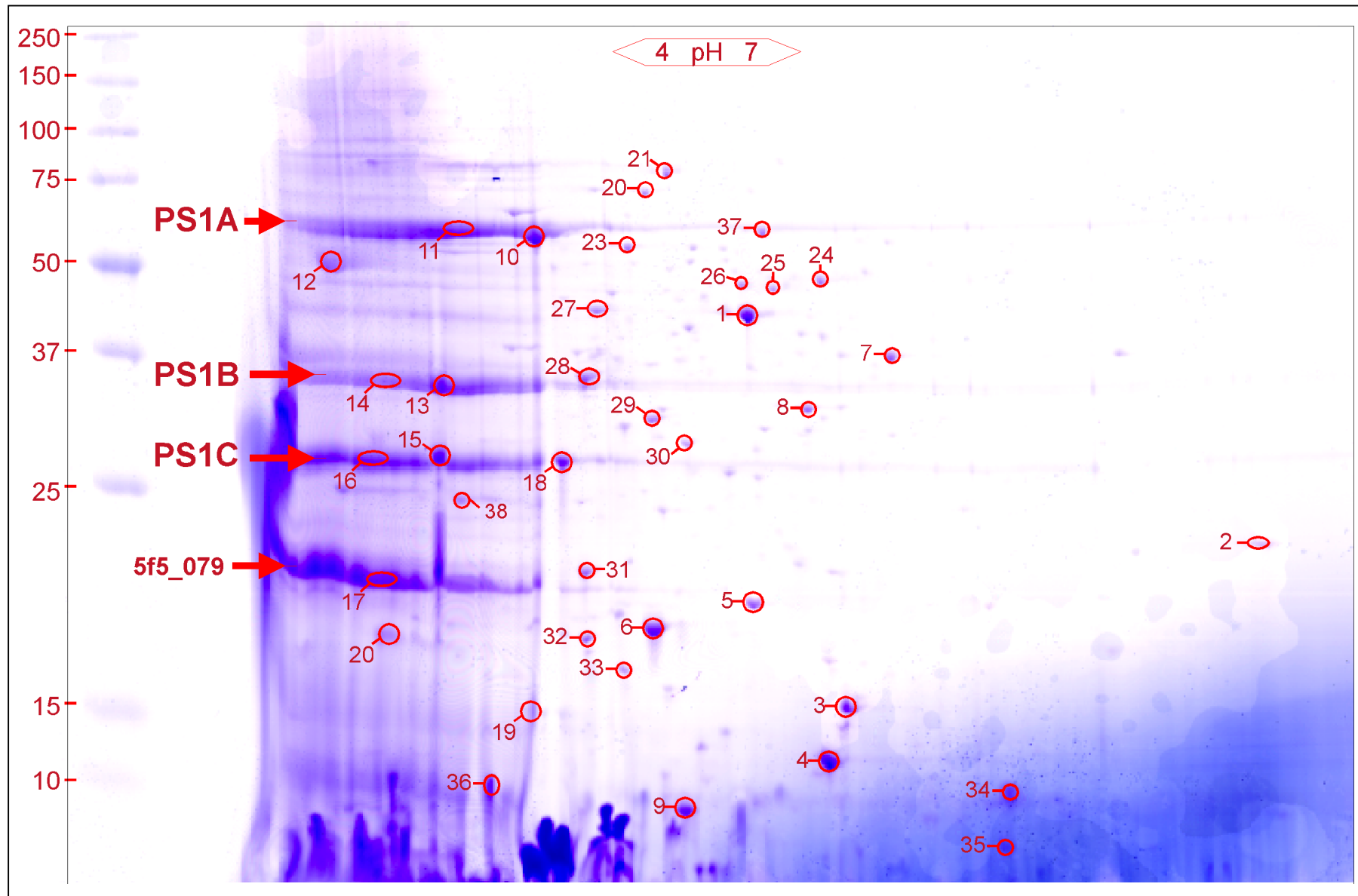


Abb.IV.12: Darstellung der extrahierbaren Oberflächenproteine von *C. glutamicum* ATCC13032 im 2D-SDS-PAGE. Die isoelektrische Fokussierung der ersten Dimension erfolgte im pH-Bereich 4-7. Die analysierten Spots / Proben sind durchnummeriert.

| Nr. | mögliche Funktion | SP | Nr. | mögliche Funktion | SP |
|-----|--------------------------------------|-----|-----|-------------------------------|-----|
| 1 | Elongationsfaktor TU | - | 20 | 2c4_067 | - |
| 2 | Adenylat Kinase | - | 21 | 5g19_057 | - |
| 3 | 5g19_007 (<i>M.tub.</i> Fragment) | +/- | 22 | 5c6_068 | +/- |
| 4 | Pre-mRNA-Splicing Faktor | - | 23 | 4i4_072 | - |
| 5 | 3f13_077 | - | 24 | Thiamin Biosynthese Protein | - |
| 6 | 4i9_037 | - | 25 | Fomarat Hydratase | - |
| 7 | Glycerinaldehyd-3P-Dehydr. | - | 26 | put. Aldehyd Dehydrogenase | - |
| 8 | 1p3_025 | - | 27 | Enolase (2-Phosphoglycerat) | - |
| 9 | Thioredoxin | - | 28 | 4c8_035 | - |
| 10 | PS1A | + | 29 | Cystein Synthase | +/- |
| 11 | PS1A | + | 30 | Elongationsfaktor TS | - |
| 12 | YOAR | - | 31 | 5i15_064 | + |
| 13 | PS1B | + | 32 | put. Dehydronopterin Aldolase | - |
| 14 | PS1B | + | 33 | 6a4_052 | - |
| 15 | PS1C | + | 34 | 5i15:070 | - |
| 16 | PS1C | + | 35 | n.b. | |
| 17 | 5f5_079 (<i>M. leprae</i> Fragment) | - | 36 | n.b. | |
| 18 | RhsE | + | 37 | Acyl-CoenzymA-Carboxylase | - |
| 19 | n.b. | | | | |

Tab.IV.4: Liste der identifizierten Proteine aus dem 2D-Gel der extrahierbaren Zellhüllenproteine von *C. glutamicum* ATCC13032 (Anzucht in MM1). Details zu den Daten sind dem Anhang (Tab.VII.5.1) zu entnehmen. Bei Proteinen ohne mögliche Funktionszuweisung wurde nur der zugeordnete *orf* der MAGPIE Annotation angegeben. SP = Vorhandensein eines Signalpeptides (errechnet durch SignalP auf Basis des zugeordneten *orf*'s) / +/- = Signalpeptid möglich, aber nicht sicher. n.b. = nicht bestimmbar.

immunogene Protein handeln, daß schon von S. Berens (Dissertation, 2000) bei 1D-SDS-PAGE extrahierbarer Zellhüllenproteine bei ca. 49 kD beobachtet werden konnte. An der Position sämtlicher sonst im Coomassie-gefärbten Gel identifizierbaren Spots konnte kein Hybridisierungs-Signal detektiert werden. Es kann also davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Spots nicht um Proteine der äußeren Zellhülle von *C. glutamicum* handeln kann.

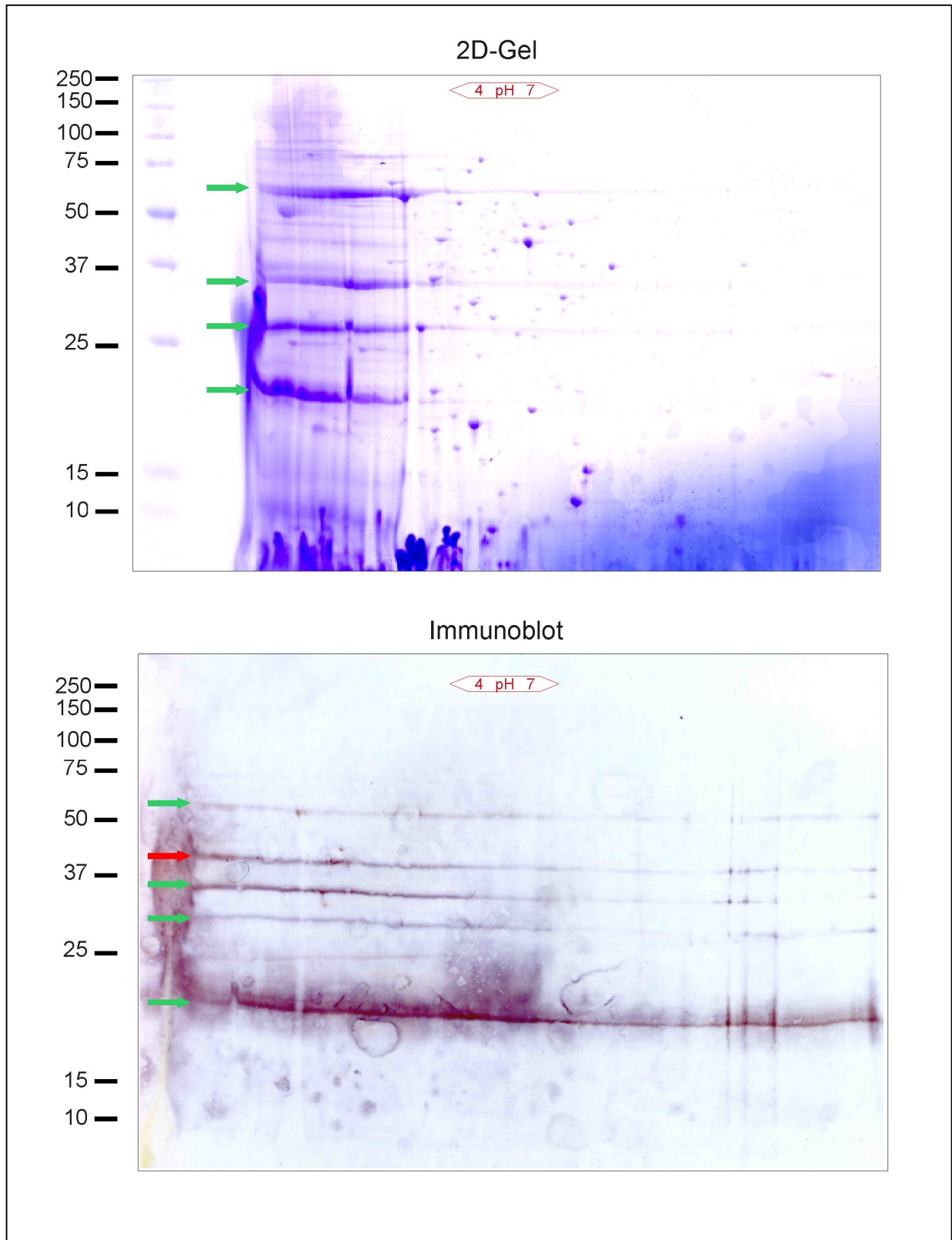


Abb.IV.13: Westernblot eines 2D-Gels extrahierbarer Zellhüllenproteine von *C. glutamicum* ATCC13032 (unten), das korrespondierende Coomassie-gefärbte Gel ist oben abgebildet. Der Nachweis der Antikörper-Antigenreaktion erfolgte über einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper mit anschließender Diaminobenzidin vermittelter Färbereaktion. Dabei konnten nur die horizontalen z.T. als PS1-Proteine identifizierten „Schmierstreifen“ nachgewiesen werden (grüne Pfeile). Der rote Pfeil markiert ein Signal, zu dem es keinen korrespondierende Bande im Coomassie-gefärbten Gel gibt. Links neben den Abbildungen sind die Größen des Proteinstandards angegeben.

3.3 Systematische Analyse der Proteine des Kulturüberstandes von *C. glutamicum* ATCC13032

Da die Möglichkeit bestand, daß die PS1-Proteine, die nicht im 2D-Proteingel des Zellhüllenproteinextrakts identifiziert werden konnten, aufgrund nur schwacher Bindung an die Bakterienoberfläche in größeren Mengen in das umgebende Medium abgegeben werden könnten, wurde der aufkonzentrierte Kulturüberstand einer *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Kultur im 2D-Gel analysiert. Die Bakterien wurden zu diesem Zweck in MM1 bis zur o.D.₅₈₀ von 5 angezogenen. Die Aufkonzentrierung erfolgte in Millipore-Zentrifugations-säulen mit einem Ausschlußvolumen von 5 kD bis zu einem Grad von ca. 100:1. Durch Dialyse und Acetonfällung konnten die Proben weiter aufkonzentriert und weitgehend von Salz befreit werden. Zur isoelektrischen Fokussierung (pH 4-7) und anschließenden Auftrennung im Excel-Gradientengel wurden ca. 250 µg Protein eingesetzt. Im Coomassie-Blau-gefärbten Gel (Abb.IV.14) stellte sich heraus daß die meisten Proteine des Kulturüberstands im sauren pH-Bereich bandierten. Eine ausreichende Trennung der einzelnen Spots, wie sie für die Identifizierung durch die MALDI-TOF-*fingerprint* Analysen notwendig ist, konnte also nicht erreicht werden. Aus diesem Grund wurden sogenannte „Zoom-In“-Gele

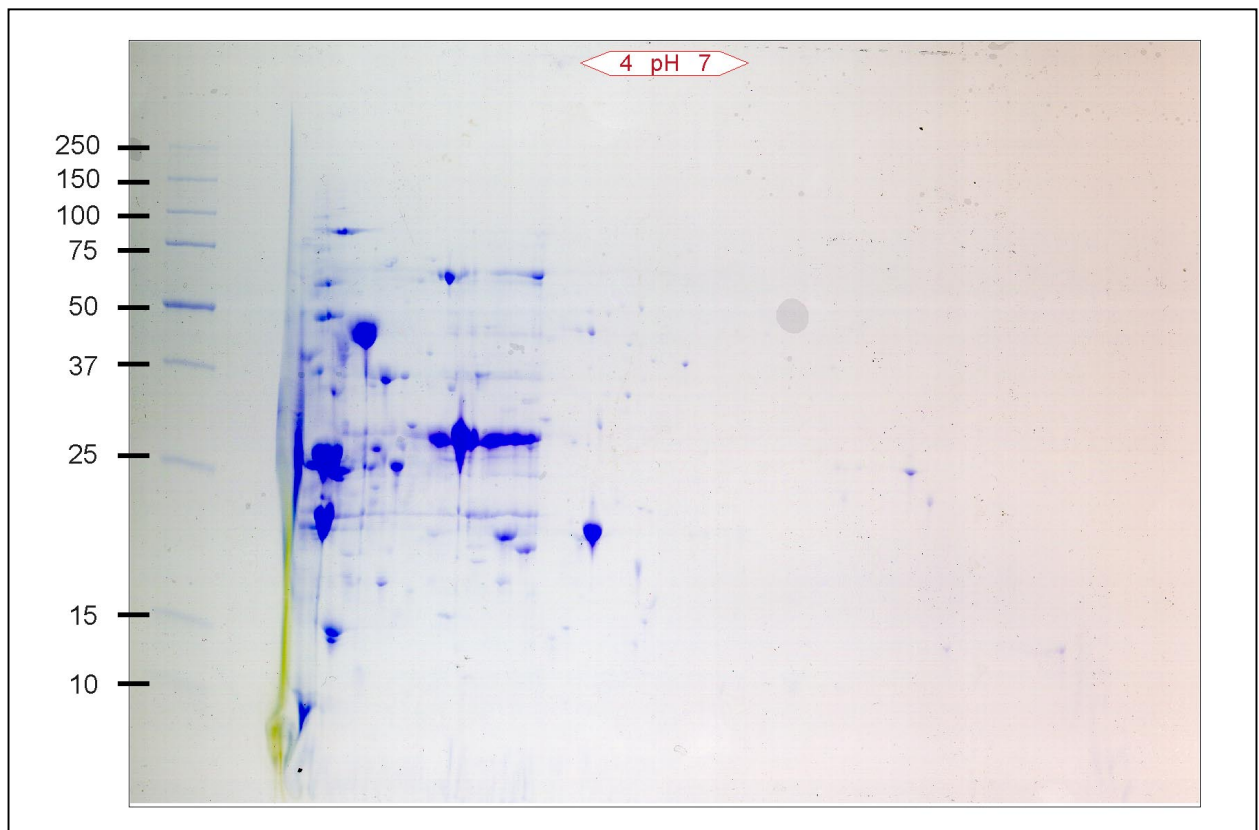


Abb.IV.14: Coomassie-Blau-gefärbtes 2D-Proteingel des aufkonzentrierten MM1-Kulturüberstandes einer *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Kultur. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte im pH-Bereich 4-7. Links neben dem Gel sind die Molekulargewichte des Größenstandards markiert. Deutlich ist zu erkennen, daß die meisten Proteine des Kulturüberstandes im sauren Bereich bandieren.

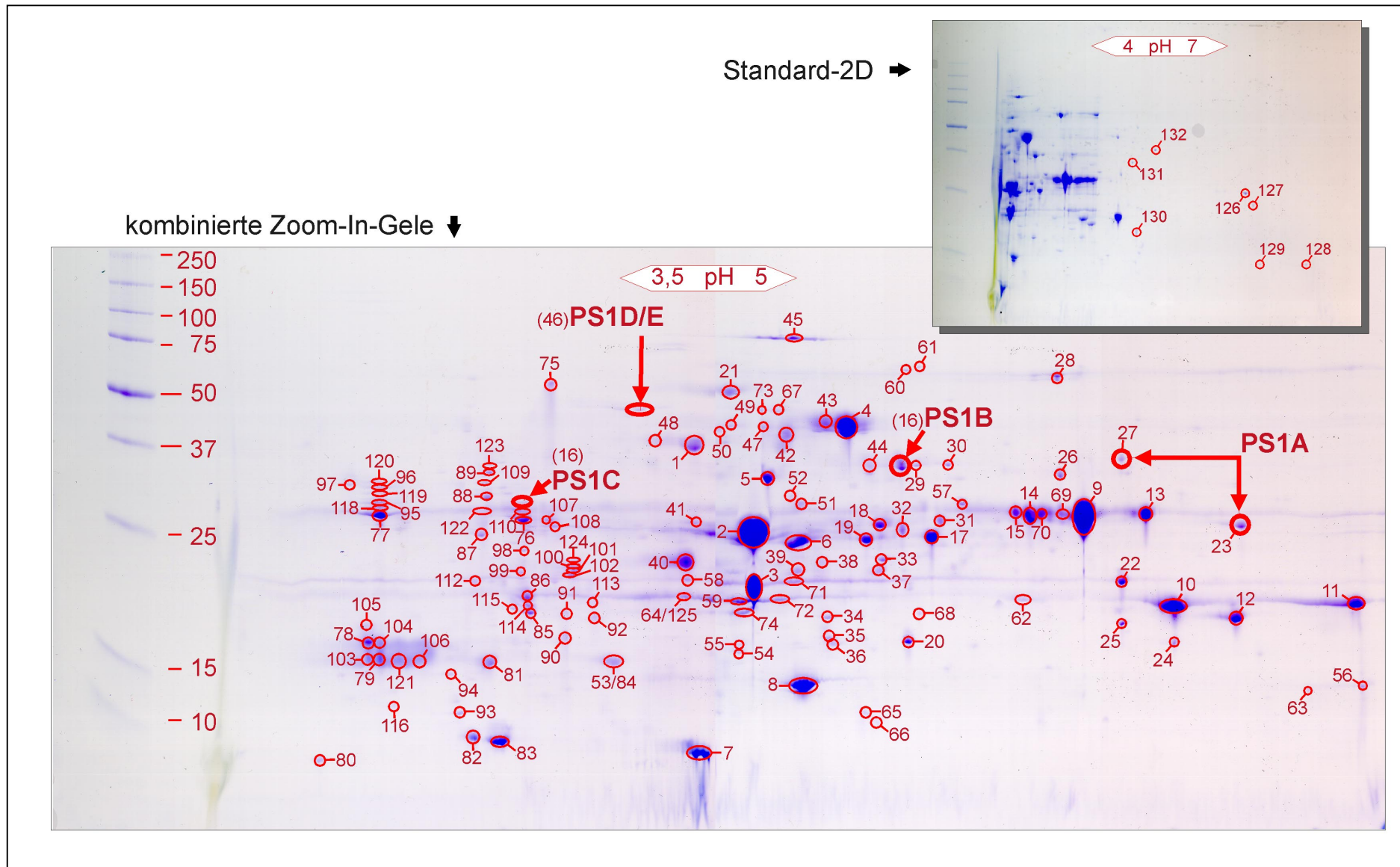


Abb.IV.15: Kombinierte „Zoom-In“-2D-Proteingele des aufkonzentrierten Kulturüberstandes (MM1) von *C. glutamicum* ATCC13032 (Einzelgele mit pH 3,5-4,5) und pH 4-5. Die für MALDI-TOF / MASCOT-Analysen ausgeschnittenen Proben sind durchnummeriert. Sieben zusätzliche Proben im basischen Bereich sind im kleinen Gel (pH 4-7) links oben angegeben. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind links vom Gel markiert.

| Nr. | mögliche Funktion | SP | Nr. | mögliche Funktion | SP |
|-----|--|-----|-----|---|-----|
| 1 | Rpf2 | + | 49 | putativ sekretiertes Protein | + |
| 2 | Hypothetisches Protein | - | 51 | Rpf2 | + |
| 3 | putatives integrales Membranprotein | - | 52 | <i>Corynebacterium glutamicum</i> urease operon | - |
| 4 | Maltose bindendes Protein | + | 60 | putative aromatische Effluxpumpe | - |
| 5 | Rpf2 | + | 61 | putative aromatomatische Effluxpumpe | - |
| 6 | Antifreeze Glycoprotein AFGP | + | 69 | <i>E. coli</i> RhsE | + |
| 7 | <i>Neurospora crassa</i> DNA linkage group II | + | 70 | <i>E. coli</i> RhsE | + |
| 8 | putatives integrales Membranprotein | - | 76 | Protein der äußeren Membran | + |
| 9 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 78 | PS1A-(Fragment) | +/- |
| 11 | <i>M. bovis</i> RplL Ribosomales Protein L7/L12. | +/- | 85 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 12 | Lipoprotein NLPD (Fragment) | + | 89 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 13 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 95 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 14 | Lipolytisches Enzym G-D-S | + | 96 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 15 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 100 | Hüllprotein von <i>Equine anemia virus</i> | +/- |
| 16 | PS1B | + | 101 | Pyridoxal Posphorylase | - |
| 17 | Antifreeze Glycoprotein AFGP | + | 102 | Hüllprotein von <i>Equine anemia virus</i> | +/- |
| 18 | Hypothetisches Protein | +/- | 105 | Antifreeze Glycoproteine (AFGP) | + |
| 19 | Antifreeze Glycoprotein AFGP | + | 107 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 20 | Putative DNA-Helicase | - | 108 | Glutamat bindendes Protein | |
| 21 | Trehalase | - | 109 | Homoserin Dehydrogenase | |
| 22 | Lipoprotein NLPD | + | 111 | PS1C | + |
| 23 | Chymotrypsin-Precursor | + | 114 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 25 | Uracil Phosphoribosyltransferase | - | 116 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 26 | HmuO [<i>Corynebacterium diphtheriae</i>] | - | 117 | PS1D/E | + |
| 27 | PS1A | + | 118 | 4n21_015 | + |
| 28 | PS1A | + | 119 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 29 | putativ sekretiertes Protein (NLP / P60) | + | 120 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 30 | putativ sekretiertes Protein (NLP / P60) | + | 121 | Antifreeze Glycoproteine (AFGP) | + |
| 31 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 123 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 32 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 124 | Pyridoxal Phosphorylase | - |
| 33 | Lipoprotein BLC der äußeren Membran | + | 126 | Antifreeze Glycoprotein (AFGP) | + |
| 36 | 30S Ribosomales Protein S2 | - | 127 | Sequenz 463 von Patent WO0100844 | - |
| 37 | Myo-Inositol-Dehydrogenase | - | 128 | Virulenz assoziiertes Protein | - |
| 39 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 129 | Virulenz assoziiertes Protein | - |
| 40 | Antifreeze Glycoprotein (AFGP) | + | 130 | 1i02_015 | - |
| 43 | <i>E. coli</i> RhsE | + | 131 | putativer ABC-Transporter | - |
| 45 | Lipoprotein BLC der äußeren Membran | + | 132 | Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase | - |
| 46 | PS1D/E | + | | | |

Tab.IV.5 : Tabelle der analysierten Spots der „ZoomIn“-2D-Proteingele (vgl. Abb. IV.13), die entsprechend ihrer Nummerierung (Nr.) wiedergegeben sind. Die mögliche Funktion basiert auf den Homologievergleichen der durch MASCOT identifizierte MAGPIE-*orf*'s. Wenn keine Homologien zu bekannten Genen in den Datenbanken gefunden werden konnte, wird lediglich die *orf*-Nummer angegeben. Bei nicht aufgeführten Spots konnte keine *orf*-Zuweisung durchgeführt werden, da entweder keine ausreichenden MALDI-TOF-Massespektren erzeugt oder keine MASCOT Hits in der *C. glutamicum* ATCC13032 Genbank gefunden werden konnten. Zusätzlich wurde überprüft, ob die entsprechenden *orf*'s über ein Signalpeptid (SP) verfügen (+/- = Signalpeptid möglich, aber nicht sicher). Details sind im Anhang der Tabelle VII.6.2 zu entnehmen.

gefahren. Dabei wurden die Proben in einem Gel mit einem isoelektrischen Fokussierbereich von pH 3,5-4,5 und in einem weiteren Gel mit einem zum ersten überlappenden pH-Bereich der ersten Dimension von 4-5 aufgetrennt. Die auf diese Weise erzielte Separation der Proteine ermöglichte die Erstellung von tryptischen „Peptid-fingerprints“ für 132 Spots. In Abbildung IV.15 sind die durch digitale Bearbeitung kombinierten „Zoom-In“-2D-Gele wiedergegeben, in denen die Proteine des pH-Bereichs 3,5-5 dargestellt werden. Die zur Analyse ausgeschnittenen Spots sind entsprechend durchnummeriert. Nach Auswertung der jeweiligen Massenspektren mit dem Computerprogramm MASCOT konnten im Kulturüberstand sowohl PS1A als auch PS1B, PS1C, und PS1D/PS1E identifiziert werden (Tab. IV.5; mehr Details im Anhang Tab.VII.6.2). Für die restlichen ebenfalls einem *orf* der MAGPIE-Annotation des *C. glutamicum* ATCC13032-Genomprojektes zugeordneten Spots wurde noch mit Hilfe von Signal-P eine computergestützte Analyse über die Existenz eines Signalpeptides durchgeführt (Tab.IV.5). Es konnte festgestellt werden, daß ein Großteil der identifizierten *orf*'s über ein solche *Leadersequenz* verfügen und somit tatsächlich Bestandteil der von *C. glutamicum* ATCC13032 in das Medium sekretierten Proteine sein können.

3.4 PS1A/B/C/D/E als Bestandteil der Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032

Die systematischen Analysen der extrahierbaren Proteine der Zellhülle von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 und der Proteine des Kulturüberstandes des Bakteriums im 1D- und 2D-SDS-PAGE und die anschließende Identifizierung durch MALDI-TOF-*fingerprint*-Analysen haben ergeben, daß neben dem bereits aus *C. glutamicum* ATCC17965 („*C. melassecola*“) bekannten PS1A nur vier (bzw. drei, da PS1D und PS1E sequenzidentisch sind und nicht eindeutig identifiziert werden konnten) der insgesamt neun auf den Chromosom lokalisierten PS1-Proteine Bestandteil der Zellhülle sind. So konnten lediglich die translatierten Proteine der Gene *csp1* (PS1A), *csp2* (PS1B), *csp3* (PS1C) und *csp4/csp5* (PS1D/PS1E) gefunden werden. Spektren mit Ähnlichkeiten zu Proteinen PS1F, PS1G, PS1H und PS1I konnten nicht detektiert werden.

4. Funktionsanalyse der PS1-Proteine von *C. glutamicum* ATCC13032

In einer weiterführenden Analyse dieser Arbeit sollte die Funktion der als Bestandteil der Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032 identifizierten PS1-Proteine bestimmt werden. Bei diesen Untersuchungen wurde von der Vermutung, begründet durch den Funktionsnachweis von PS1 aus *C. glutamicum* ATCC17965 („*C. melassecola*“) als Mycolyltransferase (Puech *et al.*, 2000), ausgegangen, daß es sich bei zumindest einigen der PS1-Proteine ebenfalls um Mycolyltransferasen handeln könnte, die Mycolylreste auf Trehalosemonocorynemycolat (TMCM) übertragen und dadurch Trehalosedicorynemycolat (TDCM) synthetisieren.

4.1 Analyse der *csp*-Einfachmutanten

4.1.1 Konstruktion der *csp*-Einfachmutanten

Um Hinweise auf die Funktion der PS1-Proteine in *C. glutamicum* ATCC13032 zu erhalten, wurden Einzelmutanten hergestellt, bei denen die jeweiligen *csp*-Gene durch „GeneSOEing“ mittels PCR deletiert wurden (Abb.IV.16). Dazu musste jeweils ein ca. 500 bp großes Fragment *upstream* und *down-stream* des zu deletierenden Bereichs amplifiziert und anschließend durch eine weitere PCR aneinandergesetzt werden (Material und Methoden, III.10.7). Das so erzeugte Konstrukt, in dem der entsprechende Bereich nun deletiert vorlag, wurde zunächst in den Vektor pCR2.1 kloniert. Von dort aus wurde es über artifizielle, bei der PCR mit eingefügten Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pK18mobsacB umklont. Mit diesem Vektor, der in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist, wurden die Deletionen durch ein doppeltes *Crossover* im Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 etabliert. Die Verifizierung des *Double crossover* erfolgte durch die positive Selektion des *sacB*-Systems und PCR-Tests (Material und Methoden, III.10.8). Dabei stellte sich heraus, daß eine Deletion von *csp3* nicht gelang. Aus diesem Grund wurde das Gen durch Disruption ausgeschaltet, indem der ebenfalls in *C. glutamicum* nicht replizierbare Vektor pCR2.1, der ein 500 bp großes Fragment des Gens als Insert trägt, in das Gen integriert wurde.

Eine Deletion des zu *csp4* nahezu identischen Gens *csp5* wurde nicht durchgeführt. Aufgrund der Vermutung, daß die Proteine der beiden Gene funktionsidentisch sind, wurde versucht, dieses Gen durch Integration in einem Stamm zu disruptieren, in dem *csp4* bereits deletiert vorliegt. Die Erstellung einer solchen Doppelmutante war in *C. glutamicum* ATCC13032 jedoch nicht möglich.

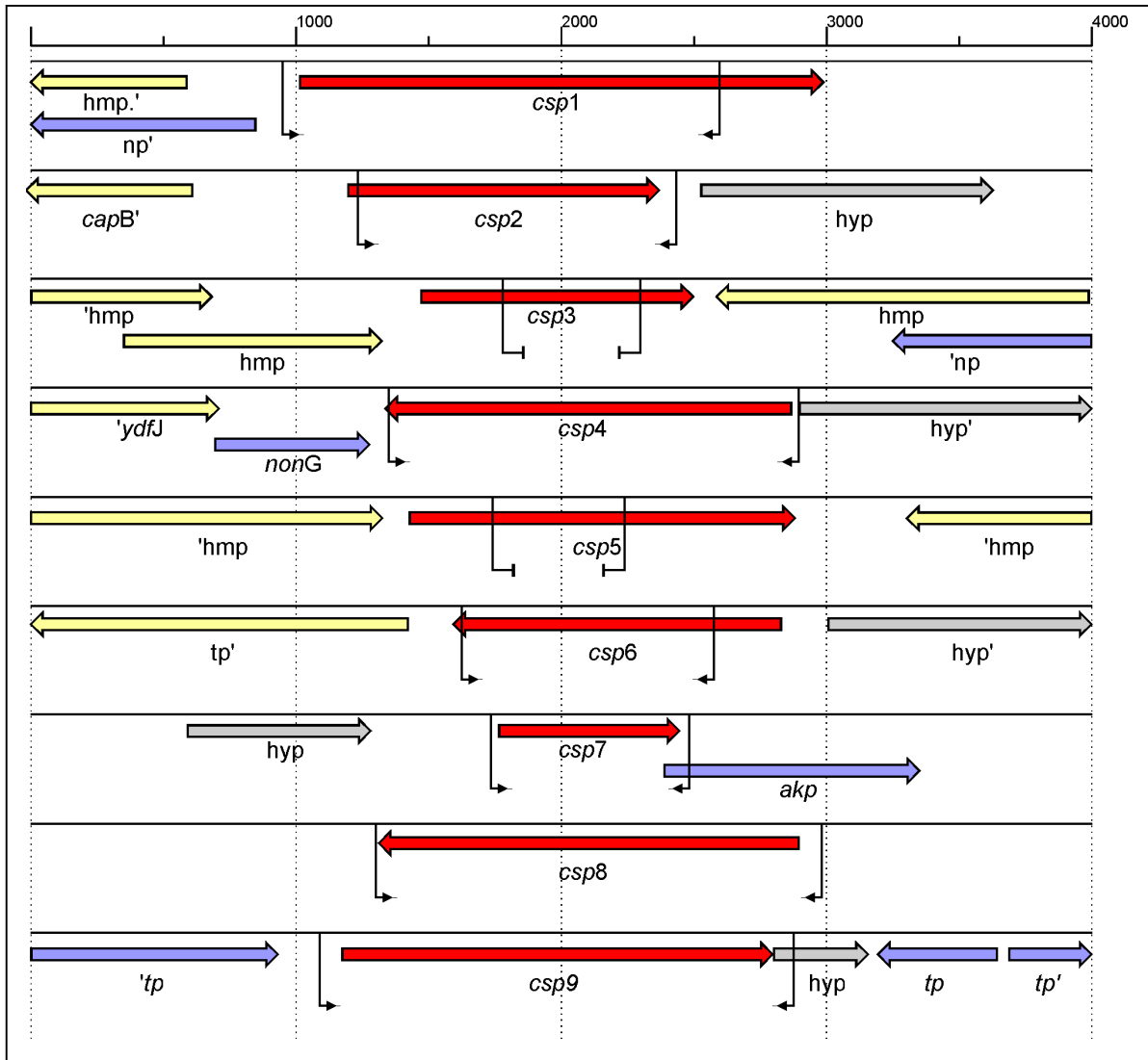


Abb.IV.16: Darstellung der in die *csp*-Gene von *C. glutamicum* ATCC13032 eingeführten Mutationen. (➔) = Deletionsbereich / (–|) = zur Integration genutzter Bereich. Die bei *csp5* eingezeichnete Disruption wurde nur im Stamm $\Delta csp4$ versucht, eine erfolgreiche Integration gelang nicht.

4.1.2 Analyse der Oberflächenproteinprofile der *csp*-Einfachmutanten im SDS-PAGE

Die *csp*-Deletions- bzw. Integrationsmutanten wurden im SDS-PAGE auf Veränderungen im Oberflächenproteinprofil untersucht. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in MM1 bis o.D.₅₈₀ 4-5, die Proteine wurden dafür mit einer 4% CHAPS-Detergenzlösung für 15 min bei 0 °C extrahiert und anschließend in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb.IV.17).

Es zeigte sich erwartungsgemäß, daß bei den Stämmen $\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und $csp3int$ die zuvor auf der Zellhülle identifizierten Proteine, deren Gen jetzt deletiert vorlag, nicht mehr vorhanden waren. Zusätzlich verschwanden bei der $\Delta csp2$ -Mutante zwei Banden bei ca. 32 kD und ca. 42 kD, die durch MALDI-TOF-*fingerprint* Analysen als mögliches lipolytisches Enzym und putatives ABC-Transporterprotein identifiziert werden konnten. Das Protein, welches zuvor knapp oberhalb des Transporterproteins bandierte, ließ sich nicht einem in der Datenbank des Genomprojektes erfaßten *orf* zuordnen. Weiterhin konnten im Extrakt dieses Stammes zwei zusätzliche Banden detektiert werden. Dabei handelt es sich um verkürzte Proteine PS1D/PS1E. Auffällig war, daß bei der $\Delta csp4$ -Mutante das als möglicherweise PS1D identifizierte Protein nicht von der *C. glutamicum* Hülle verschwand. Da es sich dabei jedoch auch um PS1E handeln konnte (Abb.IV.11), wäre eine entsprechende Doppelmutante nötig, die sich jedoch nicht herstellen ließ. Weiterhin konnte bei den Mutanten $\Delta csp6$, $\Delta csp7$, $\Delta csp8$ und $\Delta csp9$ keine Änderung des Oberflächenproteinprofils festgestellt werden.

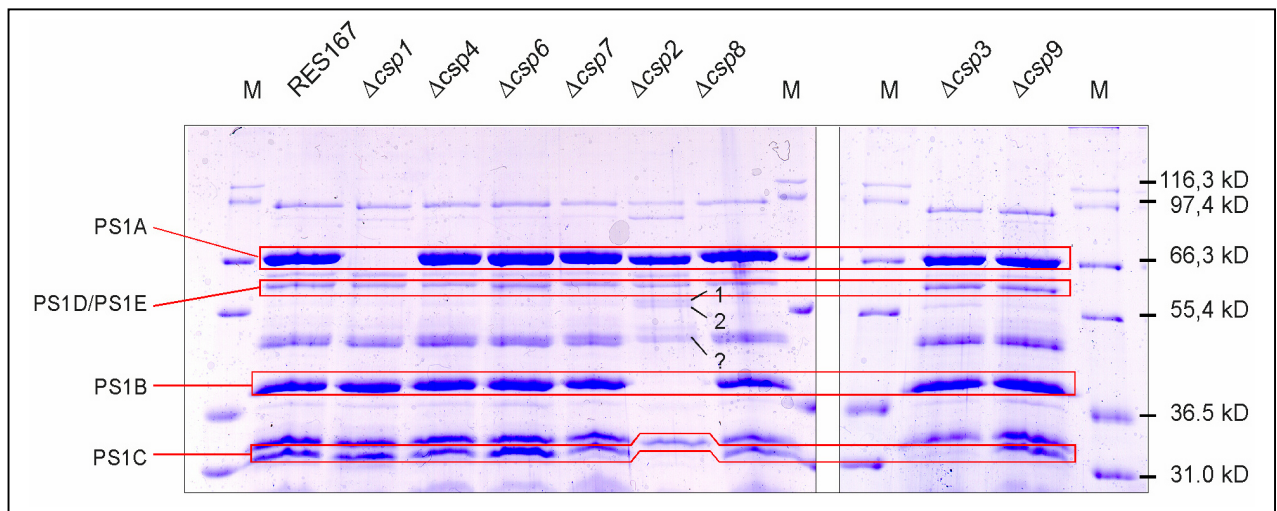


Abb.IV.17: SDS-PAGE (10 %) der mit CHAPS extrahierten Zellhüllenproteine der jeweiligen *C. glutamicum* ATCC13032 *csp*-Mutanten. Die entsprechenden Proteine sind rot umrahmt. (1) und (2) = verkürzte Formen von PS1D bzw. PS1E / ? = konnte nicht durch MALDI-TOF identifiziert werden.

4.1.3 Erstellung einer *csp1*-Überexpressionsmutante

Zur Kontrolle wurde ein Überexpressionsplasmid mit dem *csp1*-Gen hergestellt. Zu diesem Zweck wurde ein 2029 bp großes Fragment, welches das vollständige Gen mit seiner eigenen Ribosomenbindestelle (RBS) enthält, mit der „proof-reading“ Polymerase *Pfu* amplifiziert (Primer „*csp1ex1*“ und „*csp1ex2*“, Tab.III.3) und in pZEROBlunt kloniert. Die Verifizierung erfolgte durch Sequenzierung. Über die bei der PCR mit eingefügten artifiziellen Restriktions-*sites* *Bam*HI und *Sal*I konnte das Gen gerichtet in den induzierbaren Shuttle-

Expressionsvektor pECXK99e (Kirchner, 1999) umkloniert werden. Das fertige Konstrukt wurde anschließend durch Elektroporation in den restriktionsdefekten *C. glutamicum* Wildtypstamm RES167 und in die $\Delta csp1$ -Mutante transferiert. Von den Stämmen wurde ein Zellhüllenproteinextrakt erstellt und in der SDS-PAGE (10%) aufgetrennt (Abb. IV.18). Dabei war deutlich zu erkennen, daß die PS1-Bande in beiden Fällen im Vergleich zum WT deutlich überrepräsentiert sind.

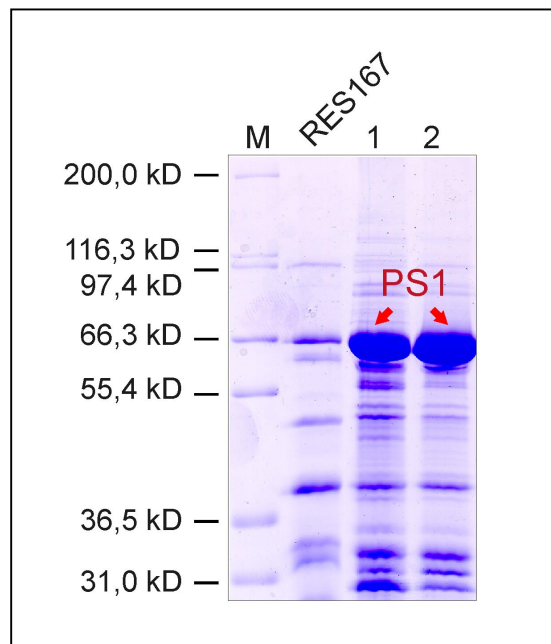


Abb.IV.18: SDS-PAGE (10%) der extrahierten Zellhüllenproteine der *C. glutamicum* Stämme *csp1_exp* (1) und $\Delta csp1$ -*csp1_exp* (2).

4.1.4 Morphologische Analyse der *csp*-Einfachmutanten

Zur morphologischen Charakterisierung der *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 *csp*-Einfachmutanten wurden zunächst lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß der Stamm $\Delta csp1$ wesentlich größere Zellen als der WT-Stamm ausbildet (Abb. IV.19). Im Vergleich zum WT schienen die Zellen ein ca. 10faches Volumen aufzuweisen. Die ebenfalls untersuchten Stämme $\Delta csp2$, *csp3int* $\Delta csp4$, $\Delta csp6$, $\Delta csp7$, $\Delta csp8$ und $\Delta csp9$ zeigten keine Veränderung der Zellgröße. Durch Komplementation des *C. glutamicum* $\Delta csp1$ -Stamms mit pECXK99e_*csp1exp* konnte eine Reversion zur Wildtyp-Morphologie erreicht werden (Abb. IV.19).

Zusätzlich wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bei WT und Mutante $\Delta csp1$ und $\Delta csp2$ durchgeführt (Abb.IV.20). Die Zellen wurden entsprechend der Methode

der „kritischen Punkt Trocknung“ präpariert und anschließend mit Gold bedampft. Es zeigte sich, daß beim *csp1*-Deletionsstamm verschieden große Zellen auftraten, die unterschiedliche Einschnürungen aufwiesen. Dabei waren auch Bakterien mit dem Wildtyp vergleichbarer Größe zu erkennen. Möglicherweise liegt ein Teilungsdefekt vor, der zu den ungewöhnlich großen Zellen führte. Bei der $\Delta csp2$ Mutante sind im wesentlichen nur Bakterien mit normaler Größe zu identifizieren. Man fand jedoch auch hier, allerdings nur vereinzelt, Zellen, die morphologisch denen des $\Delta csp1$ -Stammes sehr ähnlich waren. Es könnte also durch die Mutation von *csp2* ein ähnlicher Effekt wie bei *csp1* erzeugt worden sein, da die Zellmorphologie auch hier eine Teilungsstörung vermuten läßt.

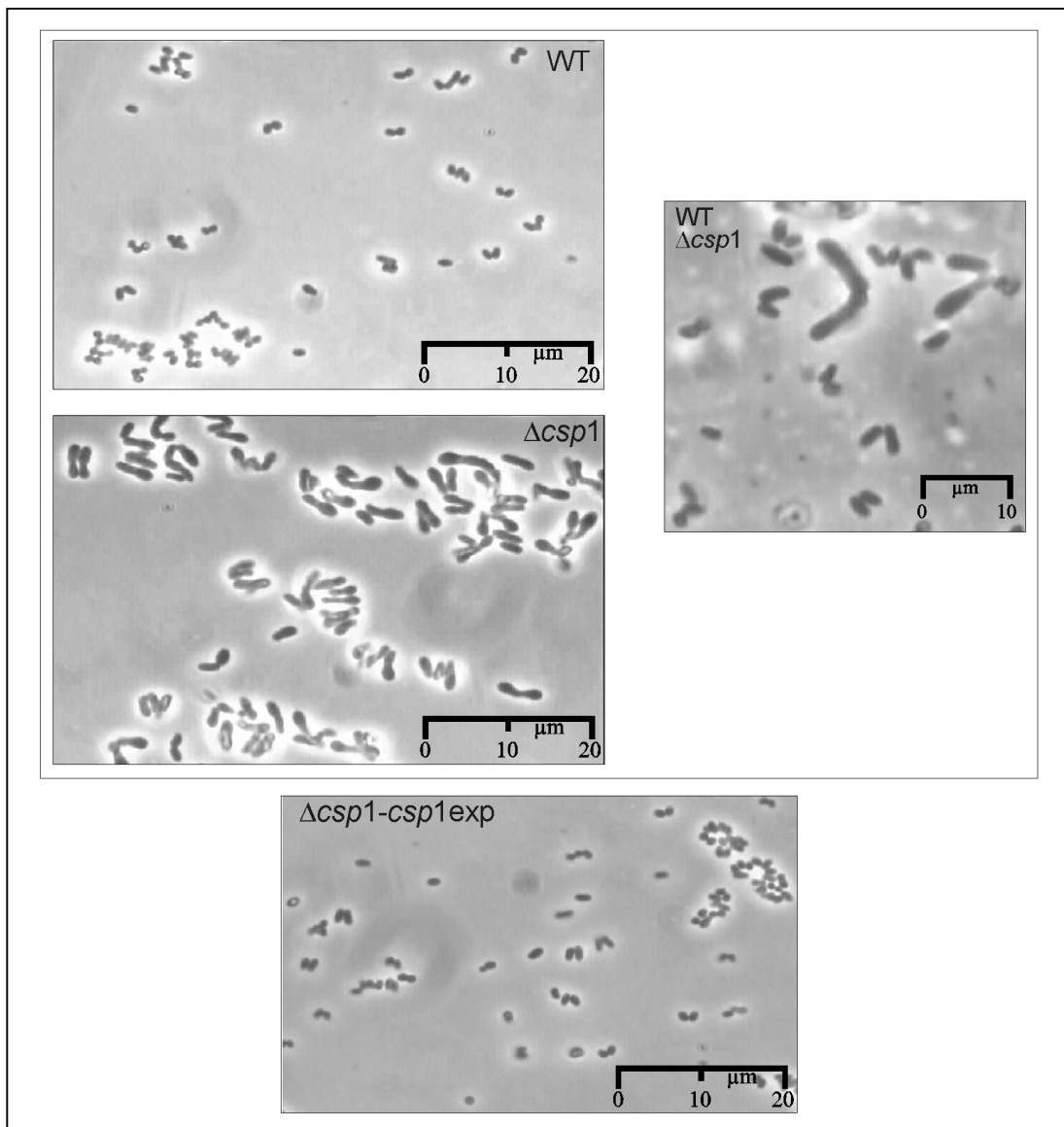


Abb.IV.19: Lichtmikroskopische Untersuchung des *Corynebacterium glutamicum* Wildtyps RES167 (WT), der $\Delta csp1$ - und $\Delta csp1$ -*csp1*exp-Mutante. Im rechten oberen Bild ist eine Mischkultur des WT und des $\Delta csp1$ -Stammes abgebildet, wodurch das bis zu ca. 10fache Volumen der Mutante gegenüber dem Wildtyp besonders deutlich wird.

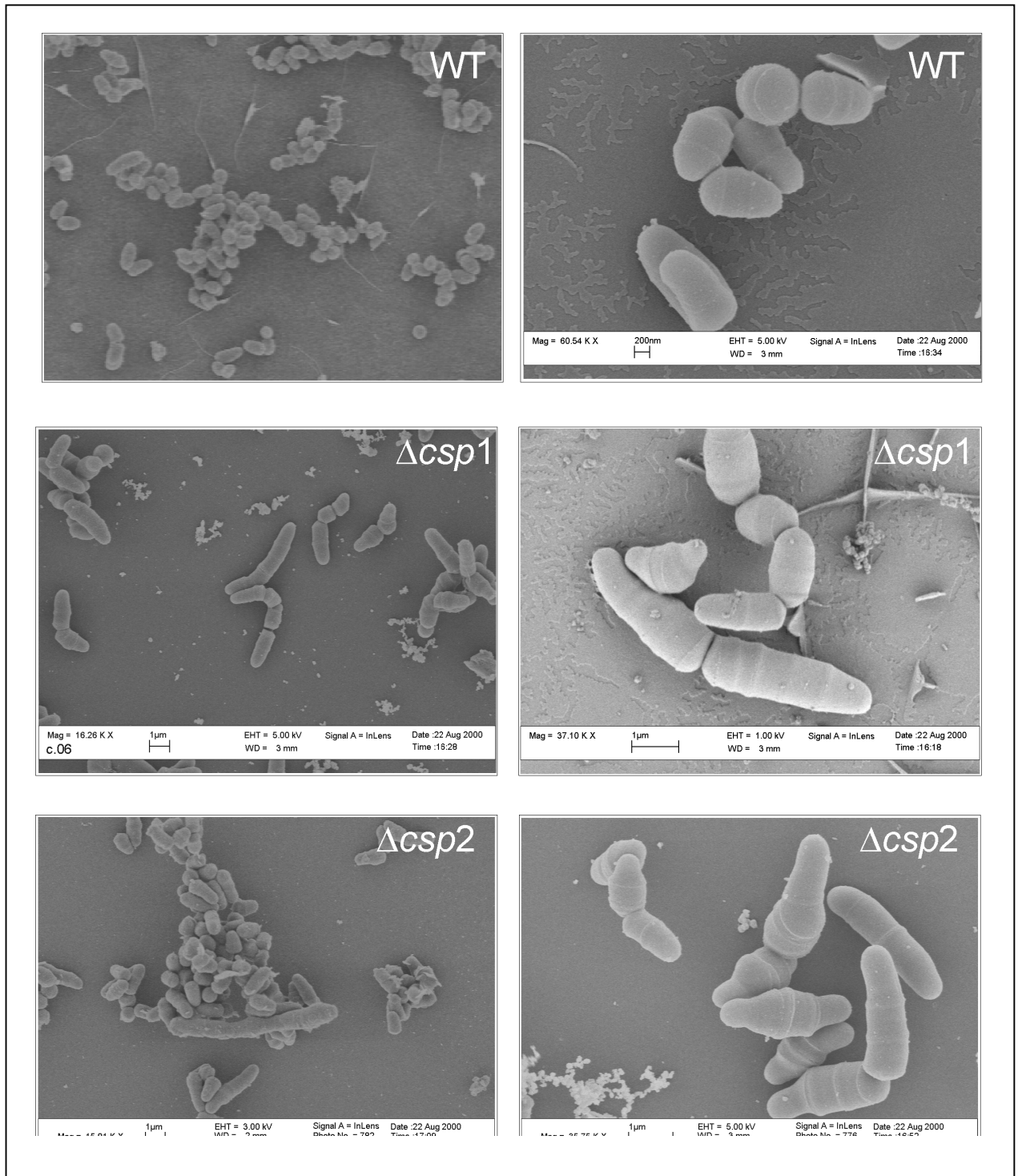


Abb.IV.20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vom *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Wildtyp (WT, oben) und der Mutanten $\Delta csp1$ (mitte) und $\Delta csp2$ (unten) in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die Zellen wurden der „kritischen Punkt“-Trocknung unterzogen und anschließend mit Gold bedampft. Der Balken repräsentiert jeweils eine Länge von 1 μ m.

4.1.5 Bestimmung der Mycolsäurezusammensetzung der *csp*-Einfachmutanten

Zur Bestimmung der Mycolsäurezusammensetzung, die ein charakteristisches taxonomisches Merkmal ist, wurden die *Corynebacterium glutamicum* Stämme RES167 (WT), $\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und $csp3int$ zur Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) geschickt. Neben den Mutanten, deren ausgeschalteten Proteine auf der Zellhülle des Wildtyps zu identifizieren waren, wurde auch die Stämme $\Delta csp4$, $\Delta csp6$, $\Delta csp7$ und $\Delta csp8$ analysiert. Es stellte sich heraus, daß alle untersuchten Stämme ein dem WT entsprechendes Mycolsäureprofil aufweisen (Abb.IV.21, Anhang Tab.VII.8). Geringe Abweichungen ergaben sich lediglich durch Isolierungs- und Meßtoleranzen. Das Ausschalten der entsprechenden PS1-Proteine bewirkt demnach keine grundlegende qualitative und quantitative Veränderung der Mycolsäurezusammensetzung.

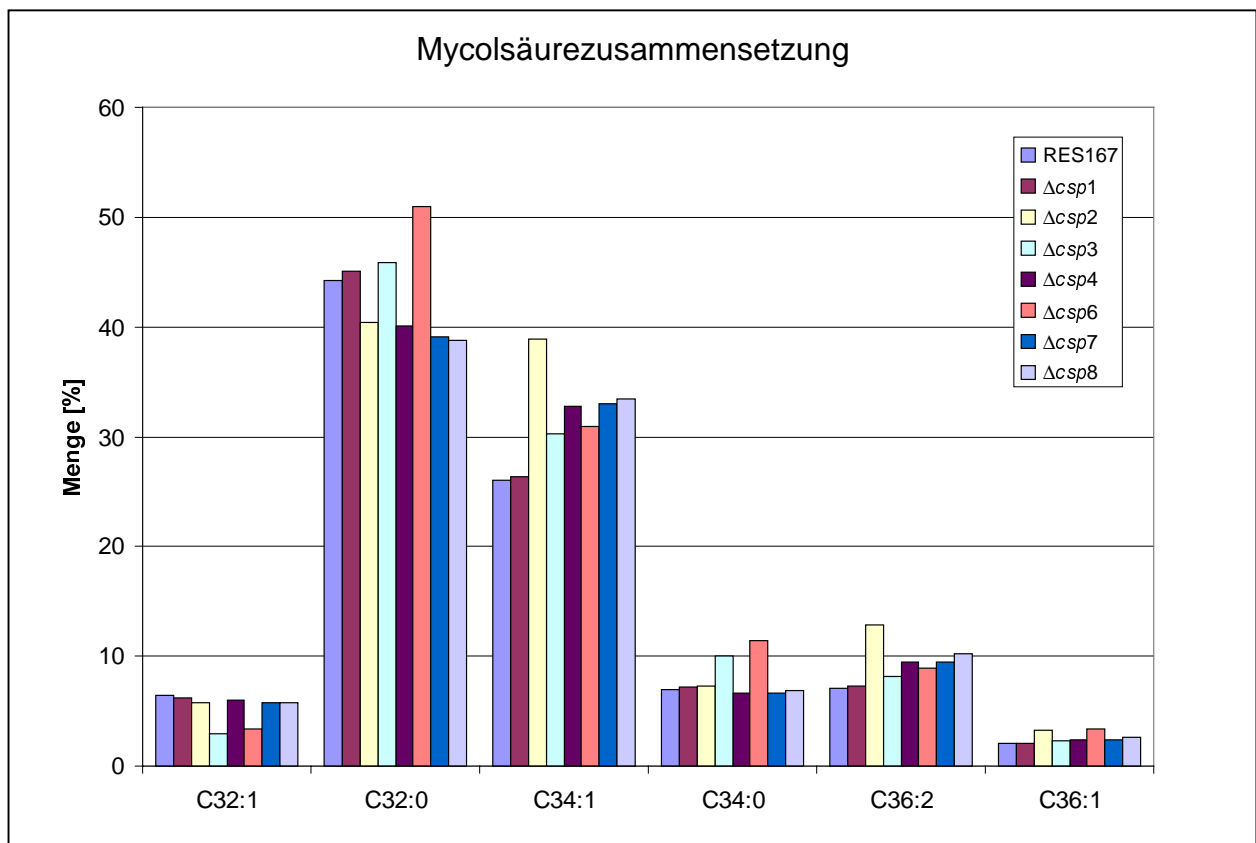


Abb.IV.21: Diagramm der in den unterschiedlichen *C. glutamicum*-Stämmen ermittelten Mycolsäurezusammensetzung. Die X-Achse gibt die Kettenlänge, die Y-Achse die relative Menge [%] wieder.

4.1.6 Analyse der extrahierbaren Mycolsäureverbindungen der *csp*-Einfachmutanten

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die in den Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 eingeführten *csp*-Einfachmutationen Einfluß auf den Aufbau der Mycolsäureschicht haben. Sollten die entsprechenden Proteine eine Funktion als Mycolyltransferase haben, müßte eine Verschiebung des Trehalosemonocorynemycolat (TMCM)/Trehalodicycorynemycolat (TDCM)-Mengenverhältnisses auf der Zellhülle des Bakteriums zu beobachten sein. Zu diesem Zweck wurden die nicht kovalent gebundenen Mycolsäuren und Lipide von der Zellhülle der Stämme RES167 (WT), $\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und *csp3int* nach Anzucht in MM1-Flüssigmedium extrahiert und auf Kieselgelplatten dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt (Abb.IV.22). Nach Anfärbung der Platten mit Joddampf, wodurch Substanzen mit Doppelbindungen nachgewiesen werden, konnten acht Banden identifiziert werden (R_f -Werte in Tab.IV.6). In einer weiteren Färbereaktion mit Anthron konnten anhand der Schwarz- bzw. Graufärbung Glycolipide nachgewiesen werden. Eine solche Farbreaktion trat nur bei Banden 5 und 6 auf. Die braune Farbe von Bande Nr. 8 weist nicht auf ein Glycolipid hin. Durch einen zusätzlichen Nachweis mit Molybdänblau konnte anhand der deutlichen

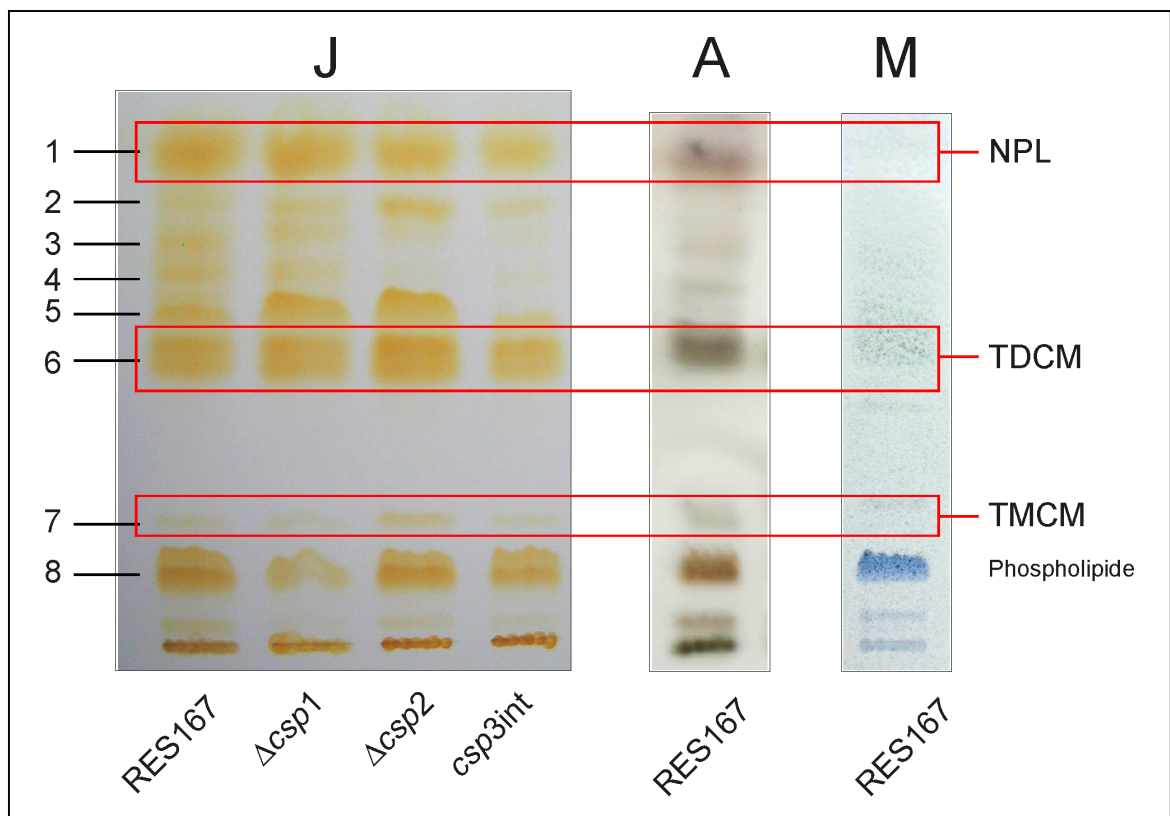


Abb.IV.22: DC-Darstellung des Profils der extrahierbaren Lipide verschiedener *C. glutamicum* *csp*-Einfachmutanten. J = Jodgefärbte DC (Doppelbindungen) / A = Anthron (Glycolipide) / M = Molybdänblau (Phospholipide). Trehalosemono- (TMCM) und Trehalosedicycorynemycolate (TDCM) sind (entsprechend der Arbeiten von Puech *et al.*, 2000) rechts markiert. NPL = nichtpolare Lipide

Blaufärbung gezeigt werden, daß es sich bei der Bande Nr. 8 um ein Glycolipid handelt. Aufgrund dieser Ergebnisse und der R_f -Werte aus der Literatur (Puech *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, daß die Bande 7 TMCM und die Bande Nr. 6 (evtl. auch Nr. 5) TDCM repräsentiert. Auffällig war, daß TMCM nur in sehr geringen Mengen als Bestandteil der *C. glutamicum* ATCC13032 Zellhülle zu finden war. Bei Bande Nr. 1 handelt es sich um nichtpolare Lipide (NPL), wie es von Puech *et al.* (2000) schon gezeigt wurde. Ein Unterschied der Lipidprofile von Wildtyp (RES167) und den untersuchten *csp*-Einzelmutanten konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht festgestellt werden.

In einer zusätzlich durchgeführten dünnenschichtchromatographischen Auftrennung der wässrigen Phase der Extraktionen konnten keine Substanzen detektiert werden.

| Nr. | R_f | R_f -Lit. | Zuordnung |
|-----|-------|-------------|----------------------------|
| 1 | 0,87 | 0,87 | nichtpolare Lipide |
| 2 | 0,78 | n.b. | n.b. |
| 3 | 0,72 | n.b. | n.b. |
| 4 | 0,66 | n.b. | n.b. |
| 5 | 0,60 | n.b. | (Trehalosedicorynemycolat) |
| 6 | 0,52 | 0,55 | Trehalosedicorynemycolat |
| 7 | 0,23 | 0,27 | Trehalosemonocorynemycolat |
| 8 | 0,17 | n.b. | n.b. |

Tab.IV.6: R_f -Werte der Banden der in der Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Lipidverbindungen aus Abb.IV.18. R_f -Lit = Literaturwerte (Puech *et al.*, 2000) / n.b. = nicht bestimmbar

4.1.7 Ermittlung der *minimal inhibiting concentration* (MIC) von Ethambutol für die Einzelmutanten

Da die Mycolsäureschicht als Barriere für hydrophile Substanzen gilt (Jarlier & Nikaido, 1990), wurden MIC-Tests für hydrophile Antibiotika mit den *csp*-Einfachmutanten durchgeführt und mit den Werten des Wildtyps verglichen. Eine Modifikation der Mycolsäureschicht müßte auch die Aufnahmefähigkeit des Bakterium für diese Substanzen und damit auch die Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum verändern. Zur Untersuchung wurden die *C. glutamicum* Deletions/Disruptionsmutanten eingesetzt, deren ausgeschaltetes Protein zuvor auf der Zellhülle identifiziert werden konnte ($\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und *csp3int*). Für die Durchführung dieser Tests wurden die Antibiotika Isoniazid und Ethambutol verwendet, die durch Anwendung bei *Mycobacterium* als geeignete Substanzen für diese Test bekannt sind (Ronning *et al.*, 2000). Während Isoniazid direkt in die Mycolsäuresynthese eingreift, hat Ethambutol das Arabinogalactan als Angriffsort, welches als Schicht unter der Mycolsäureschicht angeordnet ist und deren Verankerungspunkt bildet. Mit Hilfe des MIC-Tests wurde

die minimal benötigte Konzentration ermittelt, die für eine vollständige Wachstumsinhibition durch das getestete Antibiotikum führt. Eine gesteigerte Sensitivität könnte dann ein Indiz für eine durchlässigere Mycolsäureschicht sein (Jackson *et al.*, 1999). Erste Untersuchungen mit Isoniazid zeigten jedoch, daß sich diese Substanz nicht für diese Analysen bei *C. glutamicum* eignete. Schon der Wildtyp weist eine Sensitivität auf, die unter der Nachweisgrenze der für MIC-Tests üblichen Konzentration lag ($< 0,125 \mu\text{g/ml}$), so daß für die Untersuchungen nur Ethambutol eingesetzt werden konnte (Abb. IV.23, Tab. VII.9).

Für den *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Wildtyp-Stamm konnte eine Ethambutol-MIC von 8 festgestellt werden. Die MIC's für die Mutanten $\Delta csp1$ und $\Delta csp2$ lag bei 1, womit sie im Vergleich zum WT eine ca. 8fach erhöhte Sensitivität gegenüber Ethambutol aufwiesen. Die *csp3int*-Mutante zeigt bei $4 \mu\text{g/ml}$ Ethambutol kein Wachstum. Damit war sie doppelt so sensitiv wie der Wildtyp, aber deutlich weniger empfindlich als die beiden Deletionsstämme. Durch Komplementation des Stammes $\Delta csp1$ mit dem Überexpressionsplasmid pECXK99e_ *csp1exp* konnte eine MIC von 4 erzielt werden, der Wert des Wildtyps war jedoch nicht wieder herzustellen. Die Sensitivität des Deletionsstammes konnte also durch Überexpression des Gens deutlich reduziert werden. Die Daten der MIC-Tests ließen vermuten, daß die entsprechend analysierten Einzelmutationen eine Veränderung der Mycolsäureschicht bewirkt haben, auch wenn das nicht in der Dünnschichtchromatographie zu erkennen war.

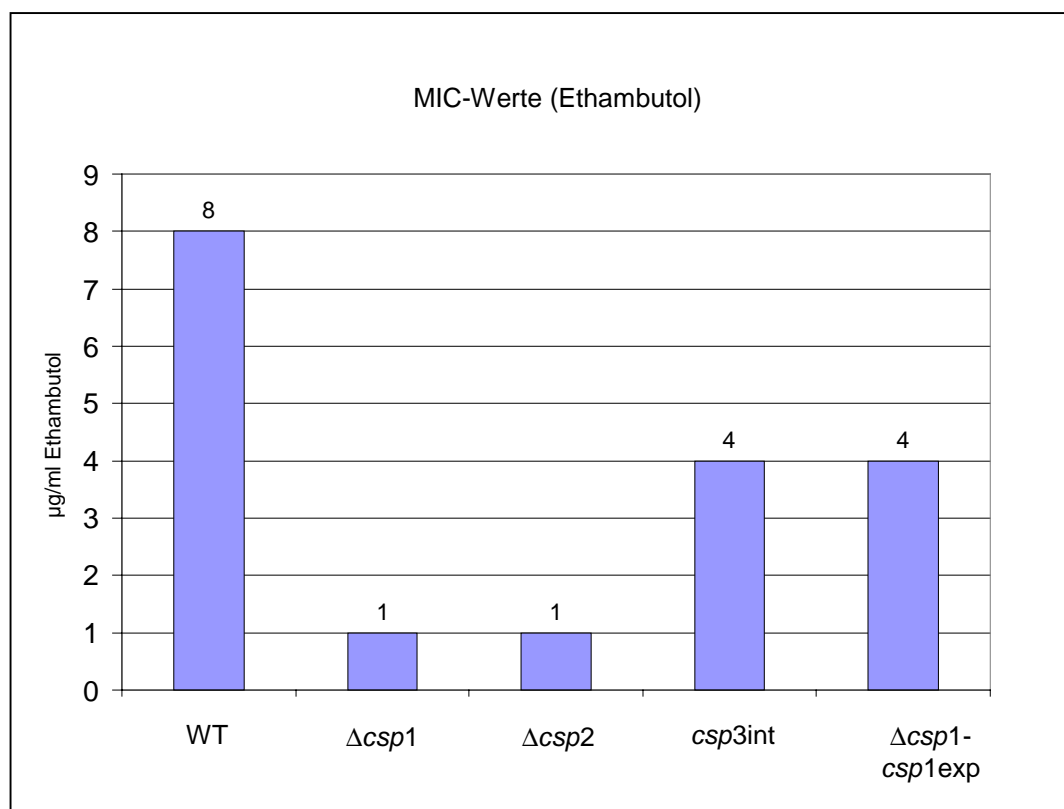


Abb.IV.23: Graphische Darstellung der MIC-Werte für Ethambutol, bestimmt für die Stämme *Corynebacterium glutamicum* RES167 (WT), $\Delta csp1$, $\Delta csp2$, *csp3int* und $\Delta csp1$ -*csp1exp*. Die angegebenen MIC-Werte entsprechen $\mu\text{g/ml}$ Ethambutol.

4.2 Analyse der *csp*-Mehrfachmutanten

4.2.1 Konstruktion von *csp*-Mehrfachmutanten

Für die *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Gene *csp1*, *csp2* und *csp3*, bei denen zwar nach einfacher Mutation keine Veränderung der Zusammensetzung der extrahierbaren Mycolsäuren detektiert wurde, aber aufgrund der MIC-Tests vermutet werden konnte, daß sie am Aufbau der Mycolsäureschicht beteiligt sind, wurden entsprechende Mehrfachmutanten hergestellt (Tab. IV.7). Die Konstruktion der Doppelmutanten erfolgte über Elektrottransfer der entsprechenden Integrations-/Deletionsvektoren in die zuvor erstellten Einfachmutanten. Anschließend wurde noch eine Dreifachmutante erzeugt, bei der alle auf der Zellhülle identifizierbaren und disruptierbaren Gene ausgeschaltet sind. Auch hier erfolgte die Kontrolle wie bei den Einfachmutanten durch PCR und SDS-PAGE (10%) der extrahierten Hüllenproteine (Abb.IV.24).

| Bezeichnung | eingeführte Mutation |
|-----------------------------------|---|
| $\Delta csp1-\Delta csp2$ | $\Delta 5b22_063$; $\Delta 4m8_018$ |
| $\Delta csp1-csp3int$ | $\Delta 5b22_063$; $5b22_054int$ |
| $\Delta csp2-csp3int$ | $\Delta 4m8_018$; $5b22_054int$ |
| $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3int$ | $\Delta 5b22_063$; $\Delta 4m8_018$; $5b22_054int$ |

Tab.IV.7: Liste der hergestellten *csp*-Mehrfachmutanten

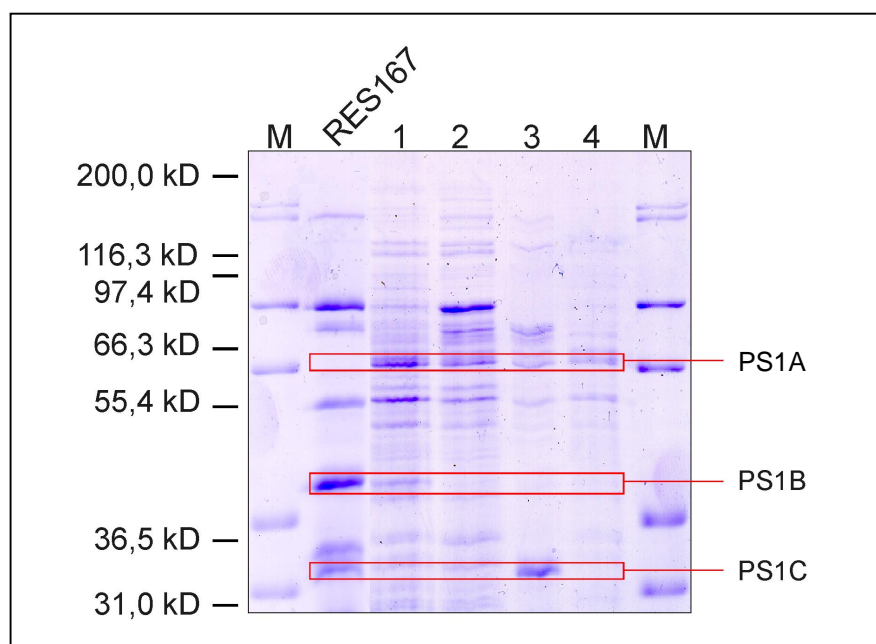


Abb.IV.24: SDS-PAGE (10%) der extrahierten Zellhüllenproteine der *csp*-Mehrfachmutanten. (1) $\Delta csp1-\Delta csp3int$, (2) $\Delta csp2-csp3int$, (3) $\Delta csp1-\Delta csp2$, (4) $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3int$. RES167 = restriktionsdefekter Wildtypstamm.

Für die Zellhüllenproteinpräparation wurden die Bakterien in MM1 ü/N bis zu einer o.D.₅₈₀ von ca. 4 angezogen, die Extraktion erfolgte mit 4% CHAPS bei 0°C. Im SDS-PAGE zeigte sich erwartungsgemäß, daß die Banden der entsprechenden Proteine, deren Gene deletiert bzw. disruptiert wurden, anschließend nicht mehr im Polyacrylamidgel detektierbar waren. Zusätzlich konnte jedoch noch eine Vielzahl anderer Banden detektiert werden, bei denen es sich vermutlich um cytoplasmatische Proteine handelt. Man kann deshalb bei diesen Stämmen von einer erheblichen Störung der Zellhüllenstruktur ausgehen.

4.2.2 Verhalten in Flüssigkultur

Bereits bei Kultivierung in MM1-Flüssigmedium zeigte die *C. glutamicum* Dreifachmutante $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3$ int einen auffälligen Phänotyp. Bei Anzucht im Schüttelkolben mit einer Umdrehungszahl von ca. 150 rpm verklumpt der Stamm vollständig und bildete blaßgelbe Zellaggregate, die sich am Kolbenboden ansammelten. Durch Wachstum der Kultur nahmen die Zellklumpen an Größe zu. Das Medium blieb dabei praktisch frei von Bakterien. Gleichzeitig konnte nach ca. 8 h Anzucht die Ausbildung von wachsartigen Plättchen an der Mediumsoberfläche beobachtet werden (Abb. IV.25). Im Verlauf der Kultivierung nahm

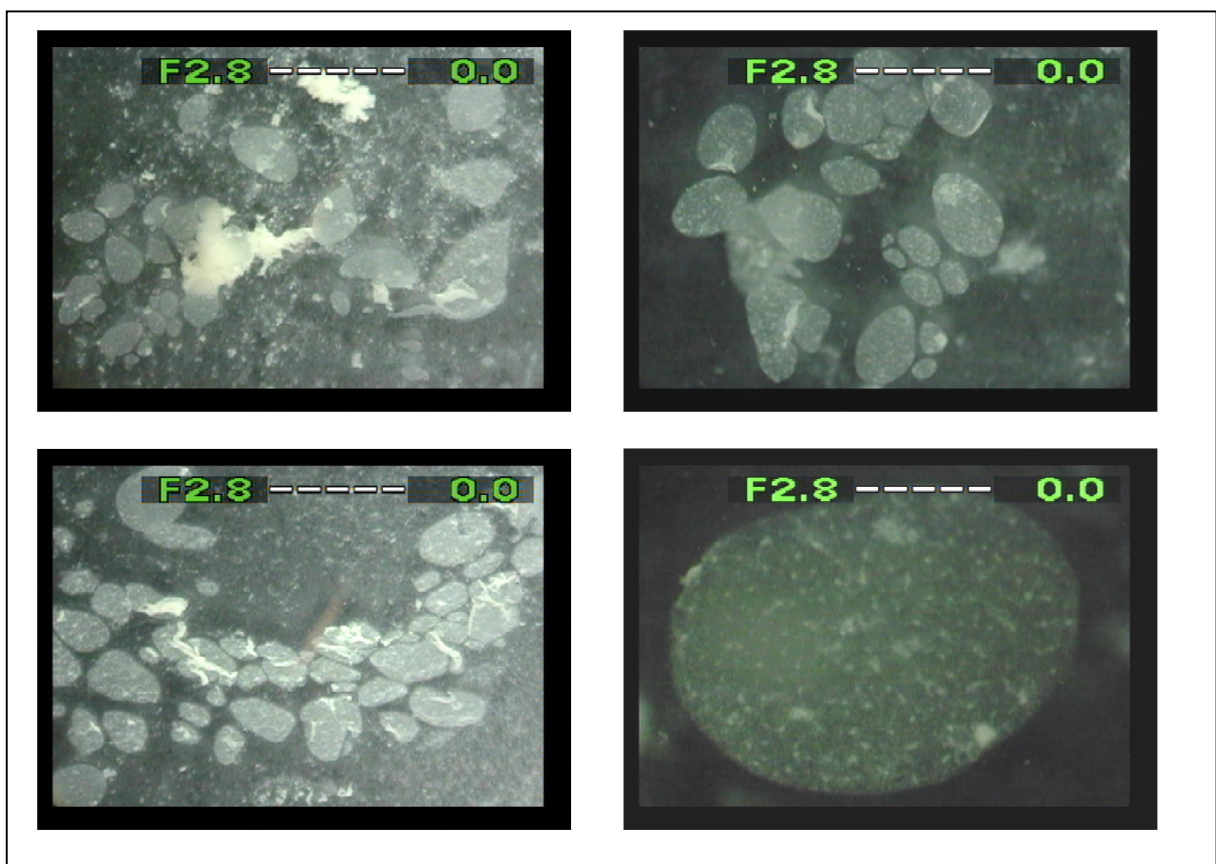


Abb.IV.25: Vergrößerte Aufnahmen der wachsartige Plättchen bei der Anzucht des Stammes *Corynebacterium glutamicum* $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3$ int in MM1 im Schüttelkolben. Rechts unten ist eine Vergrößerung abgebildet.

Anzahl und Größe der Plättchen zu. Sie konnten dabei einen Durchmesser von bis zu 1 cm erreichen und wiesen eine relativ gleichmäßige ovale Form auf. Wurde der Stamm im Schüttelkolben mit Schikane angezogen, konnte eine homoge Suspension erzeugt werden, so daß eine normale Kultivierung der Bakterien möglich war.

4.2.3 Analyse der extrahierbaren Mycolsäureverbindungen der *csp*-Mehrfachmutanten

Wie schon bei den *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 *csp*-Einfachmutanten, wurde auch bei den *csp*-Mehrfachmutanten eine Analyse der extrahierbaren Lipide und damit der Mycolsäureverbindungen durch Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Auch in diesem Fall kamen zur Substanzklassifizierung der detektierten Banden die Jod-, Anthron- und Molybdänblaufärbungen zum Einsatz. Während die Lipidprofile der Einzelmutanten keinen Unterschied zum Wildtyp aufwiesen, konnten bei den Mehrfachmutanten deutliche Differenzen festgestellt werden (Abb.IV.26). Schon bei den Doppelmutanten ($\Delta csp1-\Delta csp2$, $\Delta csp1-csp3int$ und $\Delta csp2-csp3int$) war eine deutliche Zunahme der TMCM-Menge, welches beim Wildtyp nur in sehr geringen Mengen vorkommt, zu beobachten. Beim Stamm $\Delta csp1-csp3int$ schien zusätzlich eine Verringerung der TDCM-, bei $\Delta csp2-csp3int$ der TMCM-Menge festgestellt werden zu können. Ein besonders deutlicher Effekt war bei der Dreifachmutante ($\Delta csp1-\Delta csp2-csp3int$) zu erkennen. Neben der sehr deutlichen Zunahme an TMCM konnte ein völliges Verschwinden der TDCM-Bande beobachtet werden, so daß der Stamm lediglich über Trehalosemonocorynemycolate verfügte. Desweiteren war eine zusätzliche Bande ($R_f = 0,35$) zu sehen, die bei allen anderen Stämmen und dem Wildtyp nicht zu finden war. Aufgrund der Stoffklassenzuordnung kann es sich bei dieser Bande weder um ein Glycolipid, eine Anthronfärbung war nicht möglich, noch um ein Phospholipid handeln, da eine deutliche Anfärbung mit Molybdänblau ebenfalls nicht möglich war. Auch bei einem zusätzlichen Lipidnachweisverfahren durch Erhitzen nach Besprühen mit Molybdänblau konnte an der Position dieser Bande kein Signal detektiert werden. Dieses deutet darauf hin, daß es sich bei der Substanz um ein vollständig gesättigtes Lipid oder aber eine ganz andere Stoffklasse handeln muß.

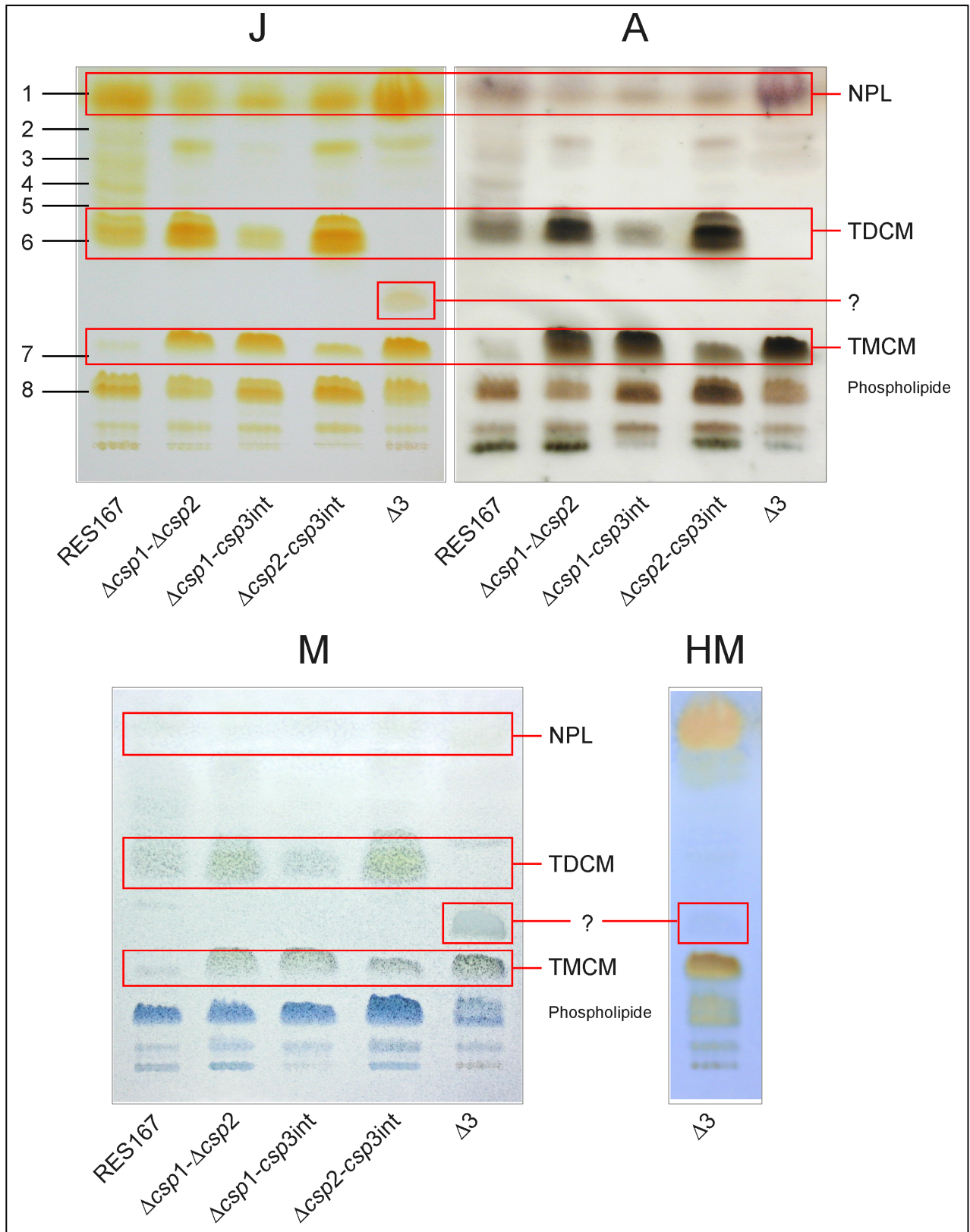


Abb.IV.26: Dünnschichtchromatographische Darstellung des Stammes *C. glutamicum* ATCC13032 WT (RES167) und der PS1/PS1Homolog-Mehrfachmutanten. $\Delta 3$ = Dreifachmutante $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3int$.

J = Jodfärbung (Doppelbindungen) / A = Anthron (Glycolipide) / M = Molybdänblau (Phospholipide) / HM = Erhitztes Molybdänblau (Lipide) / ? = nicht identifizierbare neue Bande bei $\Delta 3$.

4.2.4 PS1A/B/C-Funktion in *C. glutamicum* ATCC13032

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 neben dem schon bekannten PS1A über zwei weitere Proteine, nämlich PS1B und PS1C, verfügt, die eine Trehalose-Mycolyltransferase-Aktivität aufweisen. Dabei scheint die Funktion dieser Proteine redundant und sehr effizient zu sein, da beim Wildtypstamm und den Einzelmutanten kaum Trehalosemonocorynemycolat (TMCM) zu finden war, dieses also vollständig zu Trehalosedicorynemycolat (TDCM) umgesetzt werden konnte (Abb.IV.26). Erst bei den Doppelmutanten ließen sich größere Mengen TMCM identifizieren, die Gesamttransferleistung schien demnach reduziert zu sein. Bei Ausschaltung aller drei als Trehalose-Mycolyltransferase identifizierten Proteine fand kein Mycolyltransfer auf TMCM statt, so daß kein TDCM auf der Zellhülle des Bakteriums zu finden war.

5 Biotechnologische Eigenschaften der *C. glutamicum* ATCC13032 PS1-Mutanten

5.1 Untersuchung der Schaumbildung

Um festzustellen, ob die Einführung der Mutationen zu einer Veränderung der Schaumbildung bei Anzucht des Bakteriums in Flüssigmedium führen, wurden verschiedene Experimente im Schüttelkolben durchgeführt. Zunächst wurden die *csp1/2/3* Einfachmutanten getestet. Dazu wurden sie in MM1 bis zu einer $o.D._{580}$ von ca. 10 angezogen. Die Kultivierung erfolgte in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 300 ml Medium im Horizontalschüttler. Die horizontalen Schwenkbewegungen (150 rpm) führten zu einer Durchmischung von Gas- und Wasserphase und bewirkten somit die Ausbildung von Schaum (Abb.IV.27). Es zeigte sich, daß der Wildtypstamm RES167 und die Mutante $\Delta csp2$ zu einer deutlichen Schaumbildung neigen, wobei die Blasen der Mutante großvolumiger waren und nicht den leicht gelben Farbton des Wildtypschaums hatten. Die Stämme $\Delta csp1$ und *csp3int* wiesen dagegen bei gleicher $o.D.$ nahezu keinen Schaum auf, so daß ein Großteil der Mediumsoberfläche unbedeckt war.

In einem weiteren Experiment wurde die Schaumbildung durch stärkere Durchmischung der Gas- und Wasserphase intensiviert. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in 100 ml MM1 im 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane im Rotationsschüttler bis zu einer $o.D._{580}$ von ca. 9

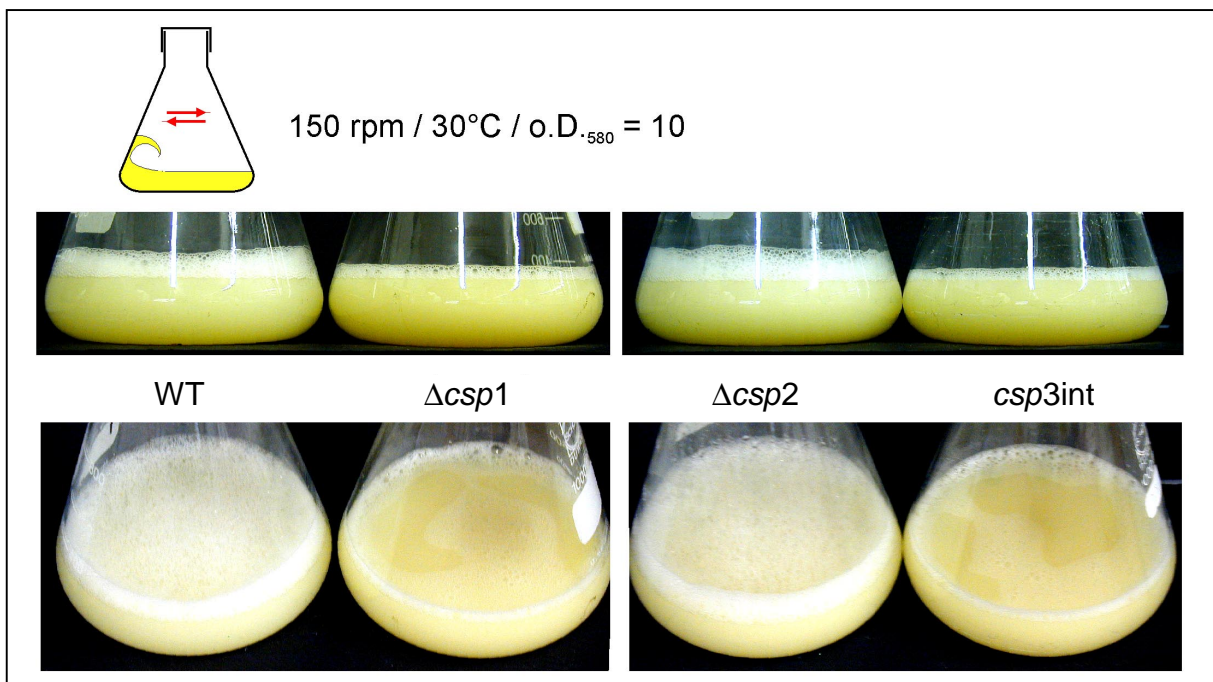


Abb.IV.27: ü/N-Kulturen der *Corynebacterium glutamicum*-Stämme WT (RES167), $\Delta csp1$, $\Delta csp2$, *csp3int*. Anzucht in MM1 bis $o.D._{580}$ 10 im Horizontalschüttler.

angezogen. Durch die sehr starke Verwirbelung an der Schikane kam es bei allen 4 Stämmen zu einer starken Schaumbildung (Abb.IV.28). WT und $\Delta csp2$ zeigten beide das gleiche Schaumverhalten mit einer mittleren Schaumhöhe. Die Mutanten $\Delta csp1$ und $csp3int$ produzierten sogar eine noch größere Schaummengende (ca. 2fache Höhe). Die Blasen waren in diesen Fällen jedoch deutlich voluminöser und erschienen lockerer.

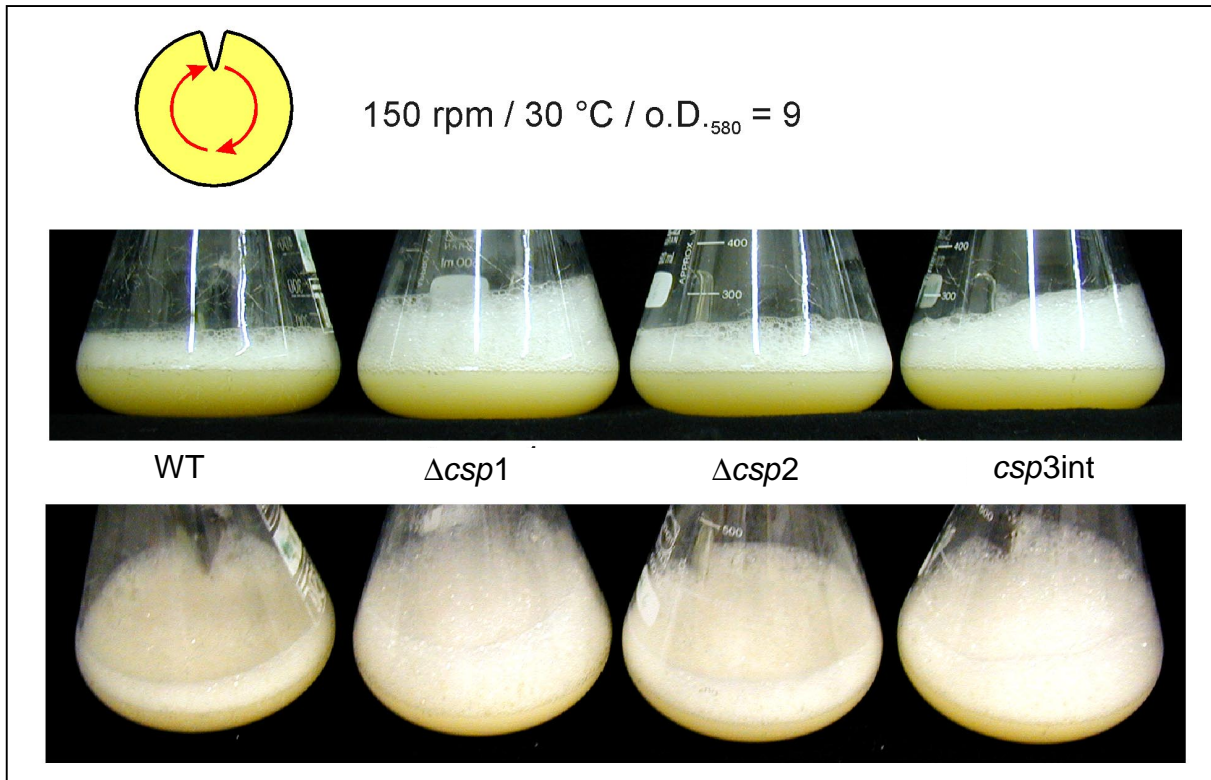


Abb.IV.28: ü/N-Kulturen der *Corynebacterium glutamicum*-Stämme WT (RES167), $\Delta csp1$, $\Delta csp2$, $csp3int$. Anzucht in MM1 bis o.D.₅₈₀ 9 im Rotationsschüttler im Erlenmeyerkolben mit Schikane (bewirkt stärkere Schaumbildung).

Bei industrieller Anzucht im Fermenter würden in einem solchen Fall die Antischaummaßnahmen eingeleitet, zu denen auch die Gabe von Antischaummitteln gehört. Gleiches wurde auch im Schüttelkolbenexperiment durchgeführt. Zu den ü/N-Kulturen (Abb.IV.29) wurde soviel Antischaummittel Clerol zugegeben, bis sich der Schaum aufgelöst hatte. Dabei zeigte sich, daß der Schaum von $\Delta csp2$ sich bereits bei einer Clerolkonzentration von 3 ppm (*parts per million*) fast komplett auflöste. Auch die Stämme $\Delta csp1$ und $csp3int$ wiesen bei dieser Menge Antischaummittel nur noch eine dünne nicht mehr geschlossene Schaumschicht auf. Der Schaum des Wiltyps löste sich dagegen erst nach einer Zugabe von 7 ppm Clerol auf. Da im Fermenter nach Durchführung der Antischaummaßnahmen die Kultivierung fortgesetzt wird, wurden auch die vier untersuchten Stämme, nachdem in allen eine dem WT entsprechende Clerolkonzentration (7 ppm) eingestellt wurde, für 90 min weitergeschüttelt. Es konnte festgestellt werden, daß die Mutanten jetzt eine deutlich geringere Schaumhöhe

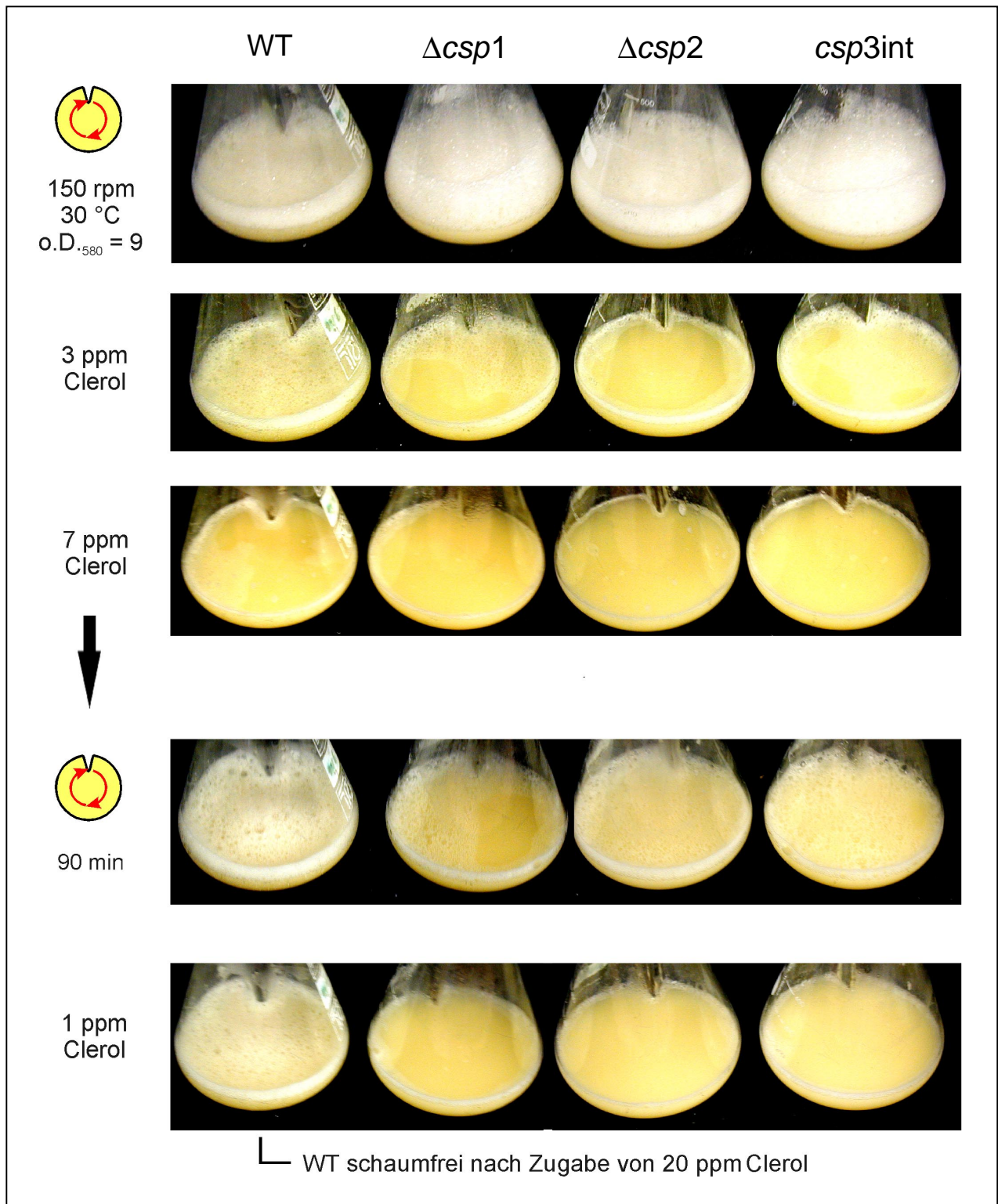


Abb.IV29: Darstellung des Tests zur Ermittlung der Beeinflussbarkeit des Schaums der *csp1/2/3*-Einfachmutanten durch Antischaummittel. Die Anzucht bis zu einer o.D.₅₈₀ von ca. 9 erfolgte in 100ml MM1 im 1000ml Erlenmeyerkolben mit Schikane im Rotationsschüttler (ebenso das Weiterschütteln für 90 min). Links sind die eingestellten Clerolkonzentrationen angegeben.

aufweisen als der WT. Besonders im Kolben von $\Delta csp1$, der zuvor doppelt soviel Schaum produzierte wie der WT, ist nur eine sehr geringe Schaummengende zu beobachten. Bereits nach Zugabe von 1 ppm Clerol löste sich der Schaum aller Mutanten komplett auf. Beim Wildtyp mußte die Konzentration auf 20 ppm erhöht werden, um den gleichen Effekt zu erzielen. Es war also die ca. 20fache Menge Antischaummittel notwendig. Ähnliches war auch zu beobachten, wenn die Kulturen bereits mit einer Clerolkonzentration von 7 ppm angezogen wurde (Daten nicht gezeigt).

Im Falle der *csp1*-Mutante wurde auch ein Test mit dem entsprechenden Überexpremierer durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei einer Clerol-Konzentration von 1 ppm die Blasen des Stammes *csp1exp* am stabilsten sind. Die Schaummengende des Wildtyps RES167 konnte deutlich reduziert werden, während bei der $\Delta csp1$ -Mutante keine Blasen mehr zu beobachten waren (Abb. IV.30).

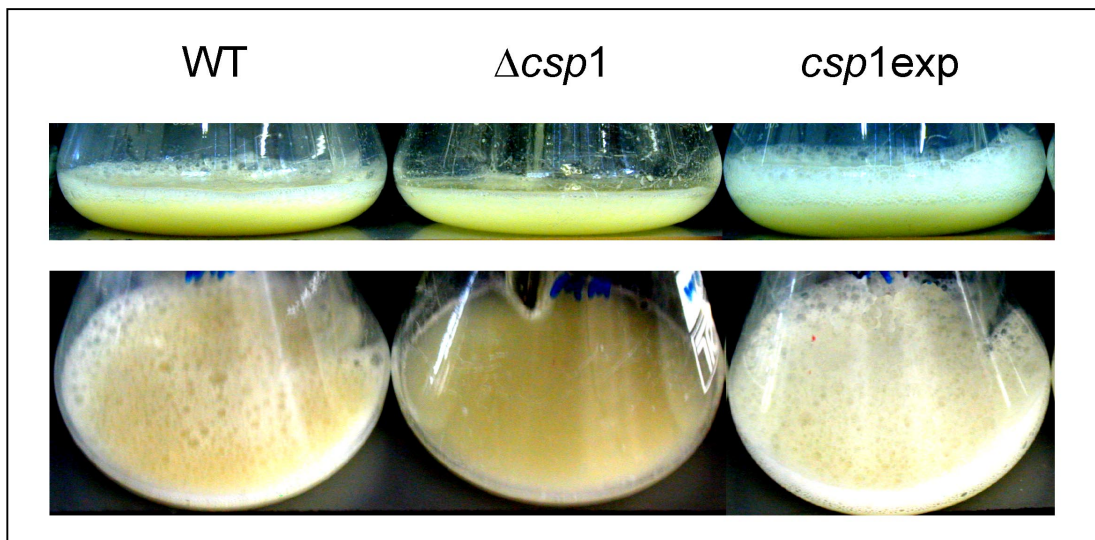


Abb.IV.30: Schaumverhalten des *csp1*-Überexpremierers im Vergleich zu *C. glutamicum* WT und der $\Delta csp1$ -Mutante. Anzucht in MM1 (100 ml in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane), Zugabe von 1 ppm Antischaummittel Clerol.

Die *csp*-Doppelmutanten verhielten sich beim Schaumtest im wesentlichen wie die Einzelmutanten (Daten nicht gezeigt), die Beeinflussbarkeit durch Antischaummittel konnte auf diesem Weg also nicht deutlich gesteigert werden. Ein sehr deutlicher Effekt konnte jedoch mit der Dreifachmutante $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3int$ ($\Delta 3$) erzielt werden. Nach Anzucht bis zur o.D.₅₈₀ von 9 (Rotationsschüttler, 100 ml MM1 in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane) wies dieser Stamm noch die gleiche Schaummengende wie der Wildtyp auf (Abb.IV.31). Nach Zugabe von nur 1 ppm Antischaummittel Clerol war das Kulturmedium von $\Delta 3$ jedoch innerhalb kürzester Zeit völlig frei von Blasen, während beim WT keine Reduktion des Schaumes erreicht werden konnte. Auch nach weiterer Inkubation im Schüttler konnte kaum erneute Schaumbildung beobachtet werden.

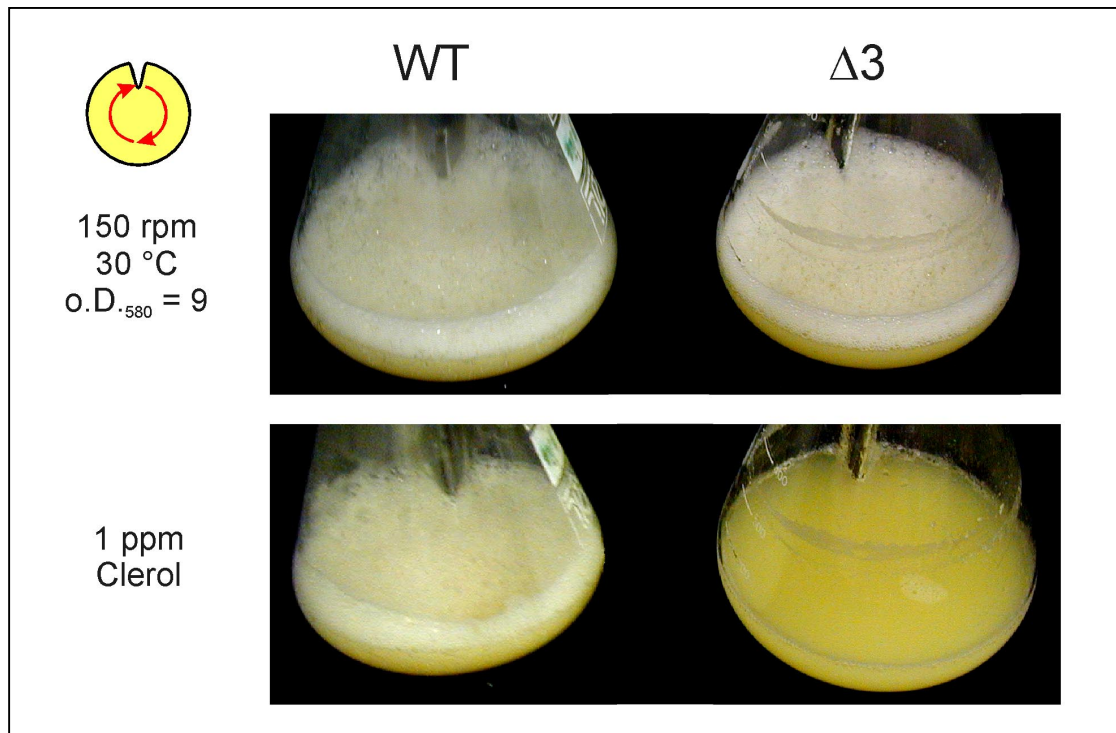


Abb.IV.31: Schaumverhalten der *C. glutamicum* Dreifachmutante $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3int$ ($\Delta 3$) im Vergleich zum Wildtyp. Nach Anzucht in MM1 (1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane) bis zu einer o.D.₅₈₀ ist bei beiden die gleiche Schaumhöhe zu beobachten. Nach Zugabe von 1 ppm ist $\Delta 3$ innerhalb kürzester Zeit schaumfrei, der WT jedoch nahezu unbeeinflusst.

5.2 Bestimmung der Lysinproduktion der PS1-Mutanten

Um den Einfluß der Mutationen auf die industriell bedeutsame Aminosäureproduktion zu bestimmen, wurden bei der Degussa AG (Halle-Künsebeck) die Produktion von Lysin für einige der in dieser Arbeit erstellten *C. glutamicum* Mutanten bestimmt. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob die Mutationen einen negativen Einfluß auf die Produktionsleistung der Bakterien haben. Da *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 unter normalen Umständen kein Lysin produziert, wurde zuvor in den Wildtyp-Stamm (RES167) und die zu untersuchenden Mutanten $\Delta csp1$, $\Delta csp2$, $\Delta csp1-\Delta csp2$ das Plasmid pJC50 (Cremer *et al.* 1990), welches Gene für eine Überexpression der *feed-back*-resistenten Aspartokinase (*lysC α* , *lysC β*) und Dihydrodipicolinat Synthase (*dapA*) trägt, transformiert. Durch Selektion der Transformanten auf AEC-Resistenz konnte die Stabilität des *lysC*-Gens sichergestellt werden. Zur Kontrolle bei den Lysinmessungen wurden zusätzlich Stämme erzeugt, die den zu pJC50 entsprechenden Leervektor pJC1 tragen. Eine Transformation der Km-Resistenz vermittelnden Plasmide in den Stamm *csp3int*, bzw. in

Mehrfachmutanten, in denen *csp3int* vorliegt, war nicht möglich, da die Disruption des zu analysierenden Gens ebenfalls durch einen Km-Resistenz tragenden Vektor (pCR2.1) erfolgte. Aus zeitlichen Gründen wurde von einer Umklonierung der Resistenzgene der pJC-Plasmide bzw. von einer *csp3*-Disruption mit einem anderen Vektorsystem, welches eine andere Resistenz vermittelt, zunächst abgesehen.

Die Messung der Lysinmenge im Medium erfolgte nach 48 h und 72 h Kultivierung im Schüttelkolben für die pJC1 und pJC50-tragenden *C. glutamicum*-Stämme (Abb. IV.32, Anhang: Tab. VII.6). Es zeigte sich, daß kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten feststellbar war. Während die Stämme mit dem Kontrollvektor pJC1 praktisch kein Lysin in das Medium sekretierten (ca. 0,05 g/l), produzierten die pJC50-tragenden Stämme ca. 10-11 g/l Lysin. Damit konnte nachgewiesen werden, daß die eingeführte Mutation, die zu einer Verringerung der Schaumbildung führen, bei den untersuchten Stämmen keinen negativen Einfluß auf die Lysinproduktion haben.

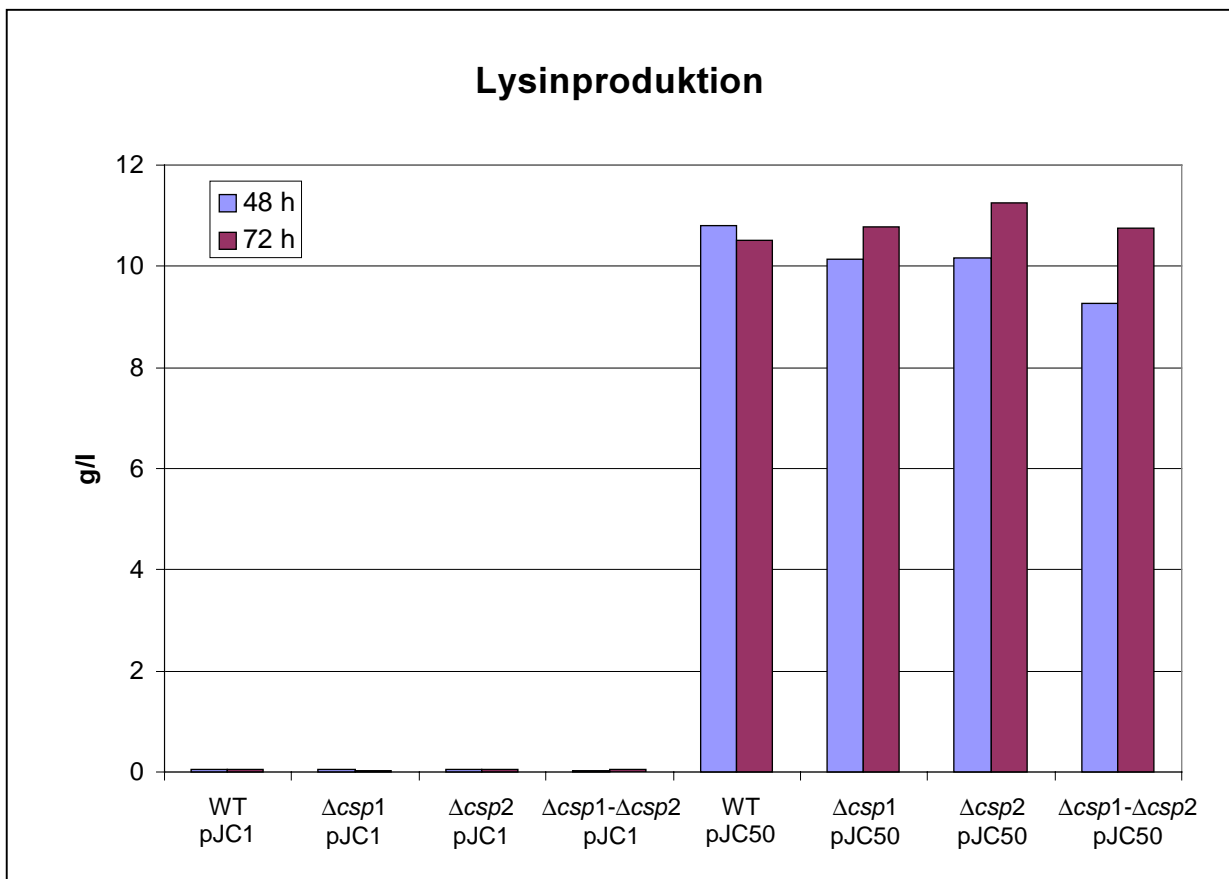


Abb.IV.32: Lysinproduktion der pJC1 bzw. pJC50 tragenden *Corynebacterium glutamicum* Stämme WT (RES167), $\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und $\Delta csp1-\Delta csp2$. Die Messungen erfolgten nach 48h und 72h.

V. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Zellhülle von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, unter besonderer Berücksichtigung ihrer Proteine, zu untersuchen. Ansatzpunkte waren dabei das Protein PS1, welches am Aufbau der Mycolsäureschicht beteiligt ist, und PS2, welches als morphologische Untereinheit die äußere *S-layer*-Schicht ausbildet.

Besitzt *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 einen *S-layer*?

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032, ähnlich wie der Stamm *C. glutamicum* ATCC17965, über eine die Zelle umgebende *S-layer*-Schicht verfügt.

Zunächst wurde davon ausgegangen, daß *C. glutamicum* ATCC13032 den gleichen *S-layer* wie *C. glutamicum* ATCC17965 hat, der von dem Protein PS2 aufgebaut wird (Peyret *et al.*, 1992). Demnach müßte auch das für PS2 kodierende Gen *cspB* auf dem Chromosom des zu untersuchenden Stammes zu finden sein. Untersuchungen mittels PCR konnten jedoch die Existenz eines zu *cspB* identischen Gens ausschließen. Da die Möglichkeit bestand, daß die Genorte, die für das Design der Primer ausgewählt wurden, nicht konserviert waren, wurden Hybridisierungen durchgeführt, mit denen ein weniger homologes Gen hätte detektiert werden können. Auch mit diesen Untersuchungen konnte kein Gen mit Ähnlichkeit zu *cspB* nachgewiesen werden. Spätere Analysen der zu etwa 85% zur Verfügung stehenden Daten des Genomprojektes von *C. glutamicum* ATCC13032 (Bathe *et al.*, 1999) konnten diese Ergebnisse bestätigen. Ein Gen mit Homologie zu *cspB* ist auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 nicht vorhanden. Desweiteren konnten im sequenzierten Bereich des Genoms auch keine Gene mit Ähnlichkeit zu *S-layer*-Proteinen anderer Bakterien gefunden werden. Dabei wurde auch die Tatsache berücksichtigt, daß *S-layer*-Proteine nur einen sehr niedrigen Konservierungsgrad aufweisen. Selbst eng verwandte Bakterien lassen kaum Ähnlichkeiten auf Sequenzebene erkennen (Blase & Gotschlich, 1990; Sleytr & Beveridge, 1999). Lediglich der C-terminale Teil, mit dem sich der *S-layer* an seiner Unterlage befestigt, und gewisse Abschnitte des N-terminalen Teils können konservierte Bereiche aufweisen, die als *SLH*-Domänen bezeichnet werden (Lupas *et al.*, 1994; Matuschek *et al.*, 1994; Sleytr *et al.*, 1999). Auch diese *SLH*-Domänen konnten nicht in den Gendaten des Genomprojekts gefunden werden. Durch Abgleich mit der 2001 von der Firma Kyowa Hakko veröffentlichten Komplettssequenz von *C. glutamicum* ATCC13032 (Nakagawa *et al.*, 2001) konnte bestätigt werden, daß ein zu *cspB* homologes Gen nicht auf dem Chromosom des Bakteriums vorhanden ist.

Durch die systematische Analyse der Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032 konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden, daß kein mit bekannten *S-layer*-Proteinen vergleichbares Protein existiert. So fand sich auf Höhe des apparenten Molekulargewichtes von PS2 mit ca. 63 kD keine entsprechende Bande in dem durch SDS-PAGE aufgetrennten Zellhüllenproteinextrakt. Dabei wurde auch die Tatsache berücksichtigt, daß sich das apparente Molekulargewicht von PS2 aufgrund der hohen Anzahl an sauren Aminosäuren stark von der tatsächlichen Masse von 52496 Da unterscheidet (Peyret *et al.*, 1993). Variationen der Aminosäurezusammensetzung können demnach zu einer Änderung des Migrationsverhaltens des Moleküls in der SDS-PAGE führen. Es konnte jedoch auch keine Bande mit einem von PS2 abweichenden Molekulargewicht nachgewiesen werden, die Proteine in *S-layer* üblichen hohen Mengen aufwies (Peyret *et al.*, 1992). Eine spätere Identifizierung durch „peptide-mass-fingerprinting“-Analysen konnte zeigen, daß es sich bei keinem der extrahierbaren Zellhüllenproteine von *C. glutamicum* ATCC13032 um ein *S-layer*-Protein handelt. Auch im Kulturüberstand von *C. glutamicum* konnte nach Auftrennung der Proteine in der zweidimensionalen SDS-PAGE kein Spot als *S-layer*-Protein identifiziert werden. Dadurch wurde die Möglichkeit berücksichtigt, daß Mutationen im C-terminalen Teil des *S-layer*-Proteins, welcher für die Verankerung in der Zellwand verantwortlich ist (Chami, 1997), dazu geführt haben, daß die *S-layer*-Untereinheiten in das Medium diffundiert sind und deshalb nicht auf der Zellhülle zu finden waren. Selbst bei intaktem Anker würde PS2 die Proteinmenge im Kulturüberstand dominieren (Peyret *et al.*, 1993).

Zusätzlich wurden die Zellhüllenproteinextrakte 28 weiterer *C. glutamicum*-Stämme untersucht. Bei diesen Analysen zeigte sich, daß *C. glutamicum* ATCC13032 kein Einzelfall ist, sondern die Hälfte der Stämme ebenfalls über keinen *S-layer* verfügt. Dabei wurde berücksichtigt, daß bei *C. glutamicum*, welches nach Kultivierung in Flüssigmedium eine nur teilweise mit einem *S-layer* bedeckte Zelloberfläche aufweist, die *S-layer*-Proteinmenge also je nach Kulturbedingungen variieren kann (Chami *et al.*, 1995). Die als mögliche *S-layer*-Proteine identifizierten Banden zeigten in der 1D-SDS-PAGE teilweise unterschiedliche apparente Molekulargewichte. Zusätzlich durchgeführte MALDI-*fingerprint*-Analysen weisen darauf hin, daß es sich zumindest zum Teil um unterschiedliche Proteine handelt, womit die Ergebnisse im Einklang mit der Tatsache stehen, daß *S-layer*, selbst innerhalb einer Spezies, einen niedrigen Konservierungsgrad aufweisen (Blase & Gotschlich, 1990; Sleytr & Beveridge, 1999).

Mögliche Fehler bei der Anzucht und Präparation der Bakterien können als Ursache dafür, daß *S-layer*-Proteine nicht gefunden wurden, ausgeschlossen werden. So wurde die Anzucht in Vollmedium durchgeführt, welches generell die Ausbildung eines *S-layer*s begünstigt (Koval & Murray, 1986; Sleytr, 1978). Zudem konnte PS2 in großen Mengen von *C. glutamicum* ATCC17965 isoliert werden, welches unter den gleichen Bedingungen angezogen wurde wie *C. glutamicum* ATCC13032 und die anderen Stämme, bei denen kein *S-layer*-protein nachgewiesen werden konnte. Auch die zur Präparation der Zellhüllenproteine verwendete SDS-Extraktion stellt sicher, daß *S-layer*-Proteine, wenn sie

vorhanden sind, von der Zelloberfläche gelöst und nachgewiesen werden können (Baumeister *et al.*, 1982).

Eine bereits in der Literatur diskutierte Ursache für das Fehlen eines *S-layer* ist, daß das Bakterium einen Großteil seiner metabolischen Leistungsfähigkeit auf die Proteinsynthese der *S-layer*-Untereinheiten verwenden muß, wenn es seine gesamte Zellhülle mit dieser Schicht umgeben will. Dabei müssen mehrere 100 Proteine pro Sekunde synthetisiert, durch die Zellmembran transferiert und in die bestehende *S-layer*-Schicht eingebaut werden (Sleytr & Messner, 1989). Durch eine Umgebung, in der kein Selektionsvorteil für *S-layer*-tragende Bakterien besteht, wie es z.B. unter Laborbedingungen der Fall ist (Sára & Sleytr, 2000), kann das *S-layer*-Gen abgeschaltet werden oder sogar unter Umständen verloren gehen (Sleytr *et al.*, 1996). Als eine Möglichkeit mit der ein *S-layer*-Gen äußerst effektiv abgeschaltet werden kann, wird eine *IS*-Element Integration diskutiert, wie sie z.B. bei *Aeromonas salmonicida* oder *Bacillus stearothermophilus* beobachtet werden konnte (Gustafson *et al.*, 1994; Sára & Sleytr, 2000; Egelseer *et al.*, 2000). Auch stille *S-layer* Gene sind bekannt, z.B. bei *Campylobacter fetus* und *Lactobacillus acidophilus* (Boot *et al.*, 1996; Dworkin & Blaser, 1996), die je nach Bedarf, ausgelöst durch geänderte Umgebungsbedingungen, aktiviert werden können. Die Daten des Genomprojektes sprechen dafür, daß im Fall von *C. glutamicum* ATCC13032 das *S-layer*-Gen nicht abgeschaltet vorliegt, sondern daß es das Gen nie besessen oder wieder verloren hat. Untersuchungen von Peyret *et al.* (1993) an *C. glutamicum* ATCC17965 konnten zeigen, daß bei Verlust des Gens *cspB* keine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Vitalität des Bakteriums festgestellt werden kann, womit es unter Laborbedingungen keinen erkennbaren Wachstumsnachteil aufweist.

Neben *csp1* konnten in *C. glutamicum* ATCC13032 acht neue zu *csp1* homologe Proteine identifiziert werden.

Auch bei den Untersuchungen zu PS1 (in dieser Arbeit PS1A) wurde von der Vermutung ausgegangen, daß *C. glutamicum* ATCC13032 über das gleiche Protein und damit auch über das Gen *csp1* wie *C. glutamicum* ATCC17965 verfügt. Durch PCR-Experimente konnte *csp1* auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 nachgewiesen und amplifiziert werden. Durch Sequenzierung des Amplifikats konnte festgestellt werden, daß das Gen zu 99% identisch mit *csp1* aus *C. glutamicum* ATCC17965 ist.

Nach Verfügbarkeit der Genomdaten von *C. glutamicum* ATCC13032 (Bathe, 1999) konnten neben *csp1* noch acht weitere *orf*'s gefunden werden, deren translatierten Proteine Homologien zu PS1A aufweisen. Damit konnten erstmals *csp1*-homologe Gene in *C. glutamicum* nachgewiesen werden, nachdem in früheren Arbeiten davon ausgegangen wurde, daß diese nicht existieren (Joliff *et al.*, 1992). Aufgrund ihrer relativ geringen Ähnlich-

keit zu *csp1* war jedoch bisher eine Identifizierung außerhalb eines Genomprojektes nicht möglich. Entsprechend der bereits bestehenden Nomenklatur wurden die zu *csp1* homologen Gene *csp2-9*, die von ihnen translatierten Proteine PS1B-PS1I genannt. Nach Einordnung der *csp*-Gene in die physikalische Contigkarte von *C. glutamicum* ATCC13032 (Mormann, 2001) zeigte sich, daß sie über das gesamte Chromosom verteilt vorliegen. Lediglich *csp1* und *csp3* liegen mit einem Abstand von ca. 2 kb unmittelbar benachbart vor. Eine genauere Betrachtung der jeweiligen chromosomalen Umgebung konnte zudem zeigen, daß in der Nähe der Gene *csp1-6* mehrere Gene lokalisiert sind, die für Proteine kodieren, die Ähnlichkeiten zu möglicherweise am Aufbau der Zellwand beteiligten Proteinen aufweisen. Eine deutliche Anordnung in Form von Operons war jedoch nicht zu erkennen.

Nach Sequenzanalysen stellte sich heraus, daß alle PS1-Proteine, mit Ausnahme von PS1G, über ein für die Ausschleusung aus der Zelle benötigtes Signalpeptid verfügen (von Heijne, 1990). Dabei konnte die für Signal-peptide typische Ansammlung von positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren gefunden werden.

Von PS1A war bekannt, daß es sich in funktionale Domänen unterteilt. Die *N*-terminalen Domäne weist Homologien zu den Antigen85-Proteinen aus *Mycobacterium tuberculosis* auf (Joliff *et al.*, 1992) und ist für die Mycolyltransferaseaktivität des Proteins verantwortlich (Puech *et al.*, 2000). Der *C*-terminalen Domäne konnte keine Funktion zugewiesen werden, ebenso konnten keine Homologien zu diesem Bereich in den Gendatenbanken gefunden werden. Durch Sequenzvergleich der PS1-homologen Proteine mit PS1A zeigte sich, daß diese in zwei Klassen unterteilt werden können. Eine Klasse, bestehend aus den Proteinen PS1B/C/D/E/F, weist Homologien zum *N*-terminalen Teil von PS1A und damit auch den Antigen85A/B/C-Proteinen aus *Mycobacterium tuberculosis* auf (Joliff *et al.*, 1992). Die zweite Klasse wird von Proteinen PS1G/H/I aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum *C*-terminalen Teil von PS1A gebildet (Abb.V.1). Aufgrund der *N*-terminalen Funktionalität von PS1A konnte

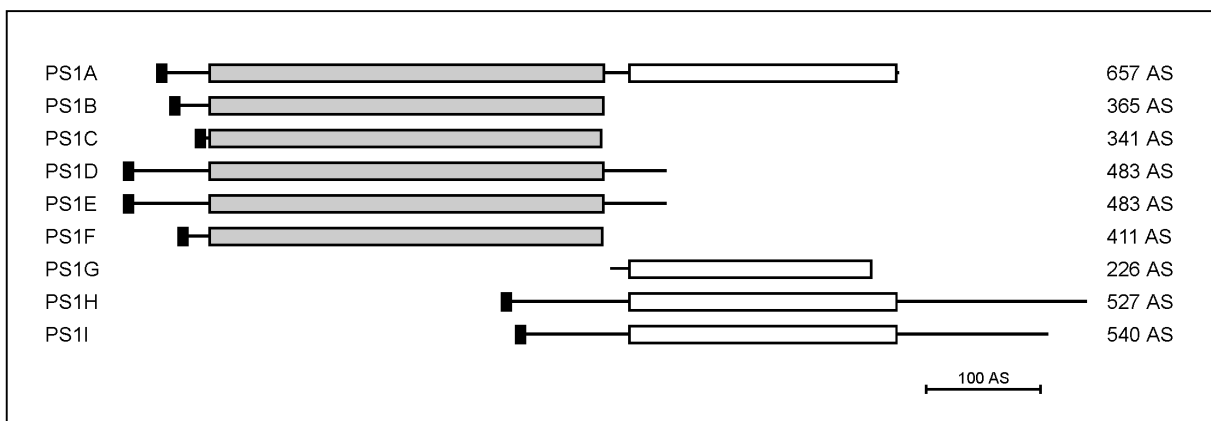


Abb.V.1: Schematische Darstellung der PS1-Proteine von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Berücksichtigung ihrer Homologie zu PS1A. Schwarze Kästen stehen für ein Signalpeptid, graue Kästen für Bereiche der *N*-terminalen Domäne von PS1A, welche Homologien zu Antigen85A/B/C aus *Mycobacterium* aufweist und für die Mycolyltransferaseaktivität von PS1A verantwortlich ist. Weiße Kästen symbolisieren die Domäne unbekannter Funktion von PS1A und die Bereiche der anderen PS1-Proteine, die Homologien zum *C*-terminalen Teil von PS1A aufweisen.

geschlossen werden, daß es sich bei den Proteinen PS1B/C/D/E ebenfalls um Mycolyltransferasen handeln könnte. Damit wäre eine ähnliche Situation gegeben, wie sie aus *Mycobacterium* mit den drei Proteinen A/B/C des Antigen85-Komplexes bekannt ist (Belisle *et al.*, 1997). Vergleichende Analysen mit dem durch „ClustalX“ für PS1A, die N-terminalen PS1A-Homologe und die Antigen85-Proteine erzeugten phylogenetischen Stammbaum zeigten, daß eine Unterteilung der Proteine PS1A-E in Gruppen, wie es bei den Antigen85A/B/C der Fall ist, nicht möglich ist. Dies läßt sich mit der relativ geringen Identität der PS1A/B/C/D/E-Proteine untereinander von ca. 30% erklären, während die Antigen85A/B/C-Proteine eine Identität von 68-80% aufweisen. Lediglich PS1D und PSE weisen untereinander eine Identität von 97% auf, mit den Genen *csp4* und *csp5* liegen also zwei Kopien auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 vor. Auch eine Zuordnung der PS1-Proteine zu einer der Antigen85-Gruppen konnte nicht durchgeführt werden. Damit konnte demonstriert werden, daß die Gattungsspezifität dieser Proteine dominiert.

PS1A/B/C/D/E sind auf der Zelloberfläche von *C. glutamicum* ATCC13032 lokalisiert.

Die Proteine PS1A/B/C/D/E konnten durch systematische Analyse der Zellhülle und des Kulturüberstandes des Bakteriums als Bestandteil der äußeren Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC13032 nachgewiesen werden.

Zur Identifikation der Proteine der Zellhülle wurden die Techniken der Proteomics angewandt (Wasinger *et al.*, 1995). Dafür wurden zunächst die mit SDS extrahierbaren Oberflächenproteine (Peyret *et al.*, 1993; Chami *et al.*, 1997), die in der 1D-SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, unter Verwendung des MALDI-TOF-Massenspektrometers (*matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight*) (Blastock & Weir, 1999) mittels *peptide-mass-fingerprinting* (PMF) (Henzel *et al.*, 1993) analysiert. Durch anschließenden Vergleich der Massespektren mit der *C. glutamicum* ATCC13032 Gendomdatenbank durch das Computerprogramm MASCOT (Hirosawa *et al.*, 1993) konnten neben PS1A, das wie zuvor vermutet durch die 67 kD-Bande repräsentiert wird, die Proteine PS1B, PS1C, PS1D und PS1F identifiziert werden. Als Sonderfall stellte sich die den Proteinen PS1D und PS1E zugeordnete Bande heraus. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Proteinen war aufgrund der hohen Sequenzidentität nicht möglich. Weiterhin konnten den anderen Banden des 1D-Gels *orf*'s der MAGPIE-Annotation zugewiesen werden, die z.B. Homologien zu endo-beta-Galactosidasen, ABC-Transportern, Membranproteinen oder Antifreeze-Glycoproteinen aufwiesen, von denen zum Teil aus *Mycobacterium* bekannt ist, daß sie mit der Zellhülle assoziiert sein können (Young *et al.*, 1990).

In einer ebenfalls durchgeführten Analyse der extrahierbaren Zellhüllenproteine mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) konnten wieder die PS1-Proteine A,B und C nachgewiesen werden. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß sich weitere PS1-Proteine auf der Zellhülle befinden, die in der Auftrennung durch 1D-SDS-PAGE nicht erfaßt werden konnten. Bei den 2D-Gelen stellte sich heraus, daß die PS1-Proteine in der ersten Dimension nicht isoelektrisch fokussiert werden konnten, so daß sie als horizontale Streifen in der zweiten Dimension laufen. Möglicherweise wird dieser horizontale Streckeffekt durch bei der Präparation ebenfalls extrahierter Mycolsäuren und Lipide verursacht, wie es schon in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Hermann *et al.*, 2000). PS1D/E konnte im Gegensatz zu den Untersuchungen durch 1D-SDS-PAGE in den 2D-Gelen nicht nachgewiesen werden. Dieses kann daran liegen, daß das Protein aufgrund seiner geringen Konzentration durch die horizontale Streckung, wie sie bei den anderen PS1-Proteinen auftritt, weiter verdünnt und nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden detektiert werden kann. Desweiteren konnten, wie schon in den Arbeiten von Hermann *et al.* (2000), ca. 120 Spots im Coomassie-gefärbten 2D-Gel detektiert werden. Nach Zuordnung der Proteine der abundanten Spots zu *orf*'s der MAGPIE-Annotation lag jedoch die Vermutung nahe, daß es sich um Präparationsartefakte handelt. So konnten z.B. Proteine mit Homologien zu den Elongationsfaktoren TU und TS im Zellhüllenproteinextrakt identifiziert werden, die, ebenso wie die meisten anderen durch MASCOT ermittelten Proteine, über kein Signalpeptid verfügen. Westernblotanalysen mit Antikörpern gegen die *C. glutamicum* ATCC13032 Oberfläche konnten diese Vermutungen bestätigen, da sich lediglich die horizontalen Banden, nicht aber die Spots des 2D-Gels als antigen wirksam erwiesen. Zusätzlich konnte im Westernblot eine horizontale Bande detektiert werden, die nicht im Coomassie-gefärbten Gel zu erkennen war. Möglicherweise handelt es sich dabei um das stark antigene Protein, welches schon in der Dissertation von S. Behrens (2000) beschrieben worden ist. Die Annahme, daß die abundanten Spots cytoplasmatische Proteine repräsentieren, steht jedoch im Widerspruch zu Literaturdaten, bei denen aufgrund einer Hybridisierung mit einem Antikörper gegen das Enzym Threonin Dehydratase, bei der keine antigen wirksamen Spots detektiert werden konnten, vermutet wurde, daß es sich nicht um cytoplasmatische Proteine handeln kann (Hermann *et al.*, 2000).

Zusätzlich wurden die Proteine des Kulturüberstandes von *C. glutamicum* ATCC13032 mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese untersucht. Aufgrund des sauren pl der meisten Proteine des Kulturüberstandes mußten „Zoom In“-Gele mit einem pH-Bereich von pH 3,5-4,5 und pH 4-5 gefahren werden. Nach Analyse von 132 Spots konnten unter anderem die Proteine PS1A/B/C/D/E als Bestandteil des Kulturüberstandes identifiziert werden. Da sie in wesentlich geringeren Mengen als im Oberflächenproteinextrakt zu finden waren, kann davon ausgegangen werden, daß es sich um in das Medium diffundierte Proteine handelt. Proteine mit Ähnlichkeiten zu PS1F/G/H/I konnten nicht gefunden werden. Desweiteren konnten den anderen Spots MAGPIE-*orf*'s zugewiesen werden, deren translatierten Proteine Homologien zu Antifreeze-Glycoproteinen, Glutamat-bindenden Proteinen, Lipoproteinen, RhsE, Rpf2 und Eisen-bindenden Proteinen aufweisen, die in der Regel über ein Signalpeptid verfügen, womit es sich um tatsächlich sekretierte Proteine handelt. Zusätzlich kann

die Tatsache, daß im Kulturüberstand nicht die gleichen Proteine wie im Zellhüllenextrakt identifiziert werden konnten, als Hinweis dafür gelten, daß es sich im letzteren Fall um Präparationsartefakte handelt. Zumindest in geringer Menge müßten sonst die von der Hülle diffundierten Proteine auch im Kulturüberstand zu finden sein.

Leider konnte jedoch auch einer Vielzahl von Spots des im 2D-Gel aufgetrennten Kulturüberstandes bisher kein *orf* der MAGPIE-Annotation zugeordnet werden. Die einfachste Erklärung für diesen Umstand ist, daß die für diese Proben erzeugten Massespektren nicht über eine für die Identifikation durch MASCOT ausreichende Qualität verfügen. So könnte z.B. ein unvollständiger Verdau oder eine Überlagerung mit anderen Proteinen zu einer zu großen Anzahl von Fragmenten führen, so daß die richtige *orf*-Zuordnung von zufälligen und falschen Ereignissen überdeckt wird (Matrix Science Ltd., 2000). Andererseits könnte es aber auch sein, daß der zu einem Protein gehörige *orf* nicht gefunden werden konnte, da zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur 85% der gesamten Sequenzinformation von *C. glutamicum* ATCC13032 zur Verfügung standen. Durch die seit kurzem zu Verfügung stehenden Kompletsequenz von *C. glutamicum* ATCC13032, die von der Firma Kyowa Hakko veröffentlicht worden ist (Nakagawa *et al.*, 2000) besteht jetzt die Möglichkeit, die Liste der Proteine des Kulturüberstandes zu vervollständigen.

Mit der Identifikation der Proteine PS1A/B/C/D/E als Bestandteil der Zellhülle und den Ergebnissen des Westenblots konnte vermutet werden, daß sie aufgrund ihrer antigenen Wirkung exponiert auf der Zellhülle des Bakteriums lokalisiert sein müssen. Dabei konnten neben PS1A nur Proteine mit Homologie zum als Mycolyltransferase funktionalen N-terminalen Teil von PS1A identifiziert werden, nicht jedoch PS1G/H/I, die Ähnlichkeiten zur C-terminalen Domäne mit unbekannter Funktion aufweisen. Als einziges Protein dieser Klasse konnte lediglich PS1F nicht als Bestandteil der Zellhülle gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich hier um ein Protein, welches unter den getesteten Kulturbedingungen nicht von dem Bakterium expremiert wird.

Mit den Proteinen PS1A, PS1B und PS1C konnte in *C. glutamicum* ATCC13032 eine Familie von Mycolyltransferasen identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in *C. glutamicum* ATCC13032 mit den Proteinen PS1A/B/C eine Familie von Mycolyltransferasen nachgewiesen werden, die, wie die Proteine A/B/C des Antigen85-Komplexes aus *Mycobacterium*, den Transfer von Mycolsäuren von einem Trehalosemycolat (TMM) auf ein zweites TMM katalysieren und so Trehalosedimycolat (TDM) synthetisieren (Belisle *et al.* 1997).

Für die Funktionsanalyse der PS1-Proteine wurden dabei zunächst Einfachmutanten der *csp*-Gene hergestellt. In der SDS-PAGE der extrahierbaren Zellhüllenproteine zeigte sich, daß bei den Mutanten $\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und *csp3int* die entsprechenden Proteine PS1A, PS1B und PS1C nicht mehr Bestandteil der Zellhülle sind. Zusätzlich fehlen im Proteinprofil des Stammes $\Delta csp2$ zwei Banden, die zuvor als Proteine mit Ähnlichkeiten zu lipolytischen Enzymen und ABC-Transportern identifiziert worden sind. Möglicherweise ist PS1B an der Verankerung dieser Proteine an der Zellwand beteiligt, entweder direkt oder indirekt durch eine Zellwandkomponente, die es ausbildet. Desweiteren konnten zwei zusätzliche Banden detektiert werden, bei denen es sich um PS1D/E-Proteine handelt, die ein apparentes Molekulargewicht aufweisen, welches ca. 8 bzw. 9 kD unter dem des ursprünglichen PS1D/E liegen. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte bisher nicht gefunden werden. Bei den Mutanten *csp6-9* konnte kein Unterschied der Proteinzusammensetzung der Zellhülle festgestellt werden, ebenso bei dem Stamm *csp4*. Dieses könnte damit zusammenhängen, daß mit *csp5* eine zweite, zu 94% identische Kopie des Gens auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 lokalisiert ist. So besteht die Möglichkeit, daß bei Ausfall des einen Proteins die Funktion von dem zweiten übernommen werden kann. Eine Unterscheidung, um welches der beiden Proteine es im SDS-PA-Gel handelt, war durch massenspektrometrische Analysen nicht möglich. Zumindest im Stamm $\Delta csp4$ kann es sich nur um PS1E handeln. Die Etablierung einer Doppelmutante durch Disruption von *csp5* in dem Stamm $\Delta csp4$ konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, was als Hinweis auf die essentielle Bedeutung der Gene gewertet werden kann.

Im Verlauf der weiteren Untersuchungen wurden nur noch die Gene *csp1/2/3* herangezogen, da deren Proteine PS1A/B/C Bestandteil der Zellhülle sind und durch Mutationen entfernt werden können.

Bei einer morphologischen Analyse der Einfachmutanten im Lichtmikroskop konnte eine deutliche Zunahme der Zellgröße bei der $\Delta csp1$ -Mutante gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden, während die anderen Mutanten den normalen Phänotyp aufwiesen. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte nicht gefunden, jedoch ließen rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen die Vermutung zu, daß eine Störung der Zellteilung vorliegt. Komplementation der $\Delta csp1$ -Mutante mit einem *csp1*-Expressionsplasmid konnte die natürliche Morphologie des Wildtyps wiederherstellen, so daß ein durch die Deletion des Gens hervorgerufener polarer Effekt auf stromabwärts liegende Gene ausgeschlossen werden kann.

Beim eigentlichen Funktionsnachweis wurde von der Vermutung ausgegangen, daß die Proteine PS1B/C/D/E/F wie PS1A selber aufgrund ihrer Homologie zu dessen *N*-terminaler Domäne eine Funktion als Mycolyltransferase aufweisen und für die Synthese von Trehalosedicorynemycolaten (TDCM) aus zwei Molekülen Trehalosemonomycolat (TMCM) zuständig sind. Ein Ausfall dieser Proteine müßte demnach eine Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Schicht des Mycolsäurebilayers von *C. glutamicum* ATCC13032 bewirken, der aus den wesentlichen Bestandteilen TMCM und TDCM besteht (Puech *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden die extrahierbaren Lipide, unter denen sich

auch die Mycolsäuren befinden, der *csp1/2/3*-Mutanten mit denen des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC13032 verglichen. Dabei konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Lipidprofilen festgestellt werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß der Trehalose-Mycolyltransfer in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 sehr effektiv sein muß, da kaum TMCM detektiert werden konnte, TMCM also nahezu vollständig zu TDCM umgesetzt wird. Damit ergibt sich ein Unterschied zu den Arbeiten von Puech *et al.* (2000), die in ihrer Arbeit in den Lipidextrakten von *C. glutamicum* ATCC17965 sowohl signifikant mehr TMCM detektieren konnten als auch eine zusätzliche Bande bei der *csp1*-Disruptionsmutante, die als 6-Corynemycolylglucose identifiziert werden konnte. Eine solche Bande wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden. Auch die von Puech *et al.* (2000) festgestellte Halbierung der TDCM-Menge und Verdopplung der TMCM-Menge konnte nicht festgestellt werden. Diese Fakten sprechen dafür, daß der Mycolyltransfer in *C. glutamicum* ATCC13032 von mehreren Proteinen katalysiert wird und der Ausfall eines dieser Proteine von den restlichen nahezu vollständig übernommen werden kann. Zumindest die veränderte Permeabilität der Zellwand der Einfachmutanten konnte einen Hinweis darauf geben, daß sich die Mycolsäureschicht verändert hat (Jackson *et al.*, 1999). So konnte mit MIC-Tests nachgewiesen werden, daß die $\Delta csp1$ -, $\Delta csp2$ - und *csp3int*-Mutanten eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Sensitivität für Ethambutol aufweisen, was wiederum als Indiz für die veränderte Aufnahmefähigkeit von hydrophilen Substanzen gesehen werden kann (Draper, 1992; Ronning *et al.*, 2000). Da eine grundsätzliche quantitative und qualitative Veränderung der Mycolsäurezusammensetzung aufgrund durchgeführter Analysen ausgeschlossen werden konnte, ist es wahrscheinlich, daß die Variation der Mycolsäureschicht in einer Veränderung des Mengenverhältnisses von TMCM und TDCM zu suchen ist. Der Unterschied muß jedoch so gering sein, daß er nicht in der Dünnschichtchromatographie zu erkennen war.

Für einen Nachweis der Mycolyltransferaseaktivität der untersuchten Proteine war es daher notwendig entsprechende Mehrfachmutanten zu erzeugen um so einen eindeutigen Phänotyp zu erhalten. Neben dem Fehlen der Mutationen entsprechenden Proteine konnte in der 1D-SDS-PAGE der Zellhüllenproteinextrakte eine deutliche Zunahme an zusätzlich aufgetrennten Proteinen beobachtet werden. Dieses legte die Vermutung nahe, daß bei diesen Stämmen eine deutliche Störung der Zellhüllenstruktur vorliegen muß, wodurch das in dieser Arbeit angewandte Extraktionsverfahren zu einer teilweisen Lyse der Bakterien führte. Die Analyse der extrahierbaren Lipide durch Dünnschichtchromatographie konnten schon bei den Doppelmutanten eine deutliche Zunahme der TMCM-Menge zeigen. Daraus konnte geschlossen werden, daß durch Ausfall von zwei der drei untersuchten Proteine das Bakterium nicht mehr in der Lage war, sämtliches TMCM vollständig zu TDCM umzusetzen, wie das beim Wildtyp und den Einfachmutanten der Fall war. Die Gesamtmycolyltransferaseaktivität ist demnach deutlich reduziert worden. Noch deutlicher wurde der Effekt bei der Dreifachmutante, welche nicht mehr in der Lage ist TDCM zu synthetisieren (Abb.V.3), so daß im Lipidprofil nur noch TMCM zu detektieren war. Möglicherweise erklärt das auch die Ausbildung der wachsartigen Plättchen des Stammes $\Delta csp1$ - $\Delta csp2$ -*csp3int* bei Anzucht in Flüssigkultur. Bei diesen Plättchen könnte es sich um überschüssige TMCM-Moleküle handeln, die

von der Zelle produziert, aber nicht mehr umgesetzt und deswegen in das Medium abgegeben werden. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß die Plättchen nicht auftreten, wenn der Stamm unter Biotinlimitierung angezogen wird (Daten nicht gezeigt), was zur Reduktion der Acyl-CoA-Synthase führt, die wiederum die Fettsäurebausteine für die Mycolsäuresynthese liefert.

Da bei den Doppelmutanten nur jeweils eines der als Trehalose-Mycolyltransferasen identifizierten Proteine für den Mycolyltransfer zur Verfügung steht, kann man aus der Gesamttransferaseaktivität dieser Stämme die Leistung der jeweiligen PS1-Proteine ablesen (Abb.V.3). So läßt sich aus der Tatsache, daß bei der $\Delta csp1$ - $csp3int$ -Mutante weniger TMCM und bei der $\Delta csp2$ - $csp3int$ -Mutante weniger TDCM als beim Stamm $\Delta csp1$ - $\Delta csp2$ zu detektieren ist, ableiten, daß PS1A die größte Aktivität aufweist, gefolgt von PS1C und PS1B mit der geringsten Leistung.

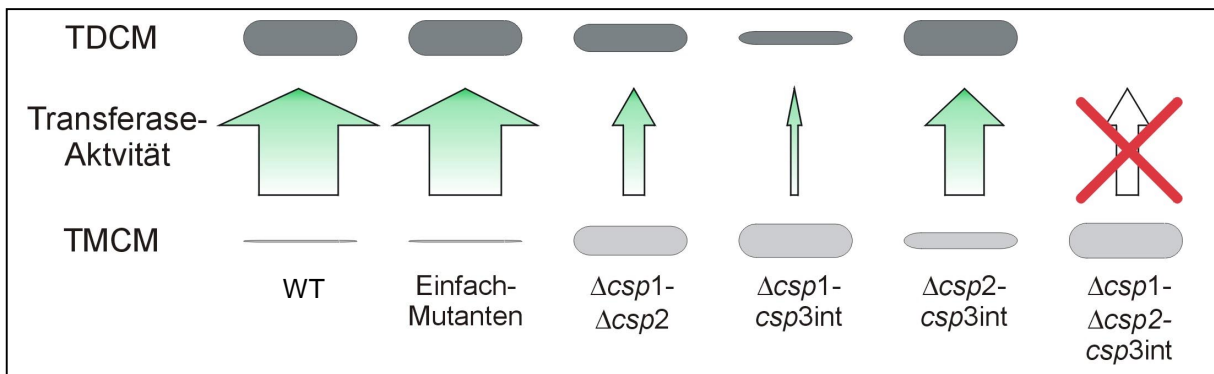


Abb.V.2: Schematische Darstellung der Mycolyltransferaseaktivität des *C. glutamicum* Wildtyps (WT) und der verschiedenen *csp1/2/3*-Mutanten. Die Dicke der Pfeile spiegelt die Gesamt-Mycolyltransferaseaktivität wider. TMCM = Trehalosemonocorynemycolat / TDCM = Trehalosedicorynemycolat

Bei genauer Betrachtung der Aminosäuresequenzen der Proteine PS1A/B/C/D/E/F und Antigen85A/B/C von *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* zeigte sich, daß die wichtigsten der funktionalen Bereiche von Antigen85 auch bei den verschiedenen Antigen85-homologen PS1-Proteinen wiederzufinden waren (Abb.V.3; Anhang Abb. VII.3.1). So konnte auch bei den PS1-Proteinen die aus Antigen85 bekannte funktionale Aminosäure des aktiven Zentrums (Serin) und die bei der katalytischen Reaktion assistierenden Aminosäuren Glutaminsäure und Histidin gefunden werden. Desweiteren konnten Abschnitte verhältnismäßig stark konservierter Bereiche bei den PS1A/B/C/D/E/F-Proteinen lokalisiert werden, welche bei Antigen85 an der Bildung der Tasche des aktiven Zentrums und eines charakteristischen Kanals durch das Protein beteiligt sind (Ronning *et al.*, 2000). Aus diesem Grund kann vermutet werden, daß der in dieser Arbeit nachgewiesene von den Proteinen PS1A/B/C katalysierte Mycolyltransfer in *C. glutamicum* nach dem gleichen Mechanismus abläuft wie in *Mycobacterium* und auch die Proteine PS1D/E/F eine ähnliche Reaktion katalysieren.

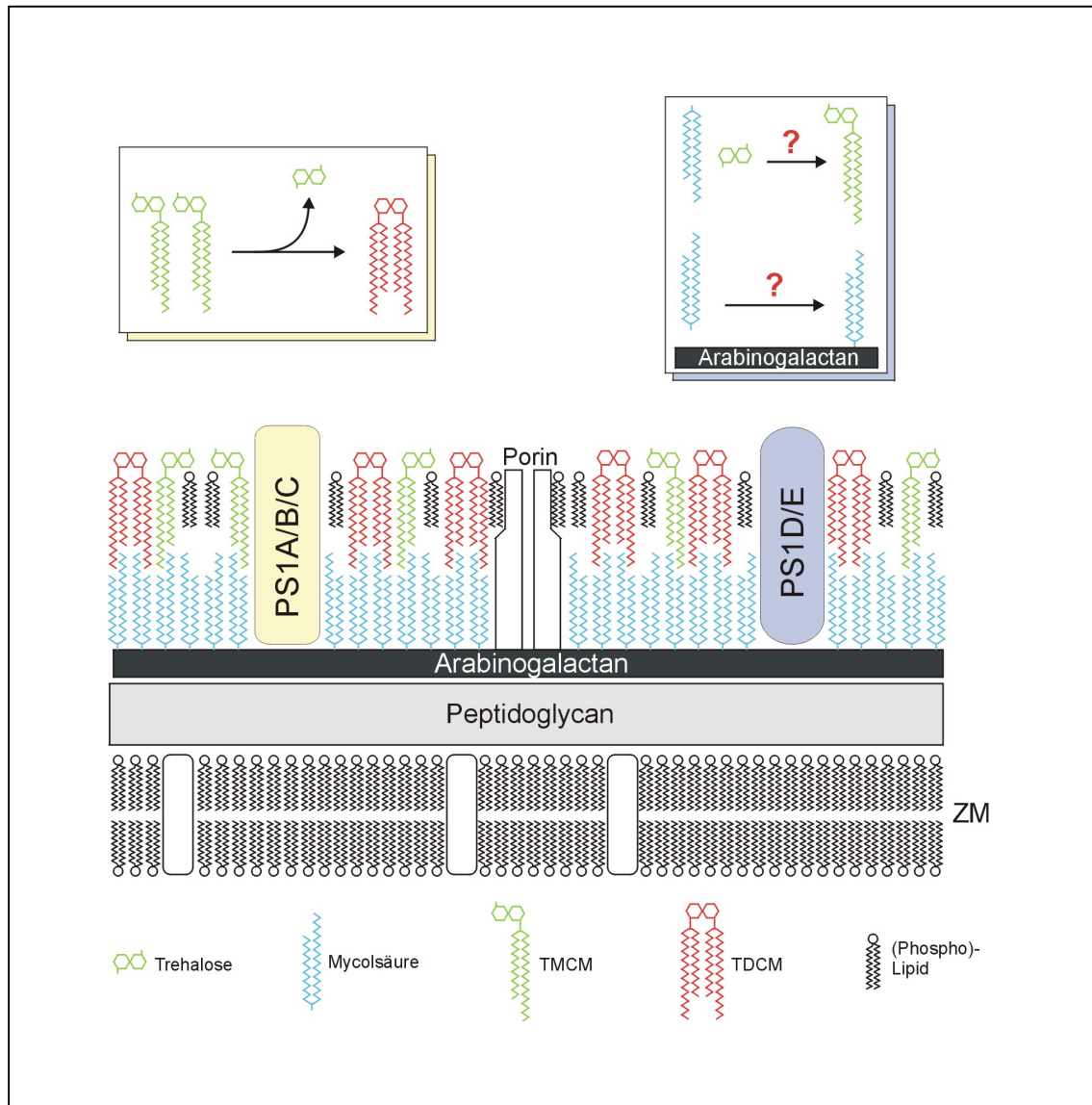


Abb.V.4: Modell der PS1-Funktion beim Aufbau des Mycolsäurebilayers von *C. glutamicum* ATCC13032. Auf der linken Hälfte der Graphik sind die in dieser Arbeit nachgewiesenen Funktionen der Proteine PS1A/B/C dargestellt (gelb), auf der rechten Seite die vermutete Funktion von PS1D/E (blau).

dabei, wie in *M. tuberculosis* nachgewiesen werden konnte (Sathyamoorthy & Takayama, 1987, Belisle 1997), TMCM-Moleküle, die ebenfalls als Bestandteil der Mycolsäure-doppelschicht auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Damit gibt es in *C. glutamicum* ATCC13032 eine zu *Mycobacterium* vergleichbare Situation. Dort sind ebenfalls drei Proteine, nämlich Antigen 85A/B/C, als Mycolyltransferasen für die Biogenese von Trehalosedimycolaten verantwortlich (Belisle *et al.*, 1997, Jackson *et al.*, 1999). Wie schon in *Mycobacterium* (Puech *et al.*, 2000), ist auch in *C. glutamicum* unklar, warum das Bakterium drei Proteine benötigt, die dieselbe Reaktion katalysieren. PS1D und PS1E konnte, obwohl sie auf der Zellhülle des Bakteriums zu finden waren, keine Funktion zugewiesen werden. Da sie jedoch Homologie zur N-terminalen Domäne von PS1A/B/C und den funktionalen Bereichen der Antigen85-Proteine aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß es sich um ebenfalls Mycolyltransferasen handelt, die jedoch einen anderen Akzeptor als TMCM

haben. Möglicherweise sind sie für die Synthese von Trehalosemonocorynemycolat oder die kovalente Bindung von Mycolsäuren an das Arabinogalactan zuständig. Ein gleichzeitiger Ausfall dieser beiden Enzyme würde dann zu einem Verlust des Mycolsäurebilayers führen, entweder durch Fehlen der äußeren oder der inneren Schicht. Die Tatsache, daß keine Doppelmutante der beiden Gene *csp4* und *csp5* hergestellt werden konnte, stützt diese Vermutung, denn Arbeiten von Belisle *et al.* (1997) an *Mycobacterium* konnten zeigen, daß die Mycolsäureschicht eine essentielle Bedeutung für dieses Bakterium hat.

***C. glutamicum* Mycolyltransferasemutanten weisen eine reduzierte Schaumbildung bei der Fermentation auf.**

Durch Schüttelkolbentests konnte nachgewiesen werden, daß die unterschiedlichen *C. glutamicum* ATCC13032 Mycolyltransferasemutanten ein verändertes Schaumverhalten bei Anzucht in Flüssigkultur aufweisen, so daß der Schaum durch geringere Mengen Antischaummittel beseitigt werden kann.

Als Testverfahren dienten Schüttelkolbenversuche, bei denen durch Schikanen in den Erlenmeyerkolben eine starke Durchmischung von Gas- und Wasserphase und damit eine Schaumbildung der Kulturbrühe bewirkt wurde. Schon Untersuchungen mit den Einzelmutanten konnten zeigen, daß der Schaum, der sich auch bei diesen Stämmen bildet, leichter durch das Antischaummittel Clerol zu beeinflussen und damit schneller zu beseitigen war. Besonders deutlich konnte dieser Effekt bei der Dreifachmutante $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3$ int beobachtet werden. Hier reichte nach Kultivierung über Nacht bereits eine Konzentration von 1 ppm Antischaummittel, um die Oberfläche des Mediums innerhalb kürzester Zeit völlig frei von Blasen zu machen, während der Schaum des Wildtypstammes von dieser Menge Clerol in keiner Weise vermindert werden konnte. Es zeigte sich auch, daß der Schaum der Mutanten aus größeren Blasen als der des Wildtyps bestand. Allein diese Tatsache ist als Vorteil zu werten, da festgestellt werden konnte, daß bei kleineren Blasen, wie sie etwa beim Wildtyp auftreten, der Verlust der Lebensfähigkeit durch Zelldisruption größer ist (Handa-Corrigan *et al.*, 1992).

Ausgehend von der Vermutung, daß *C. glutamicum*-Zellen durch hydrophobe Wechselwirkungen die ebenfalls hydrophoben Schaumblasen stabilisieren (Zhang *et al.*, 1992), konnte für das veränderte Schaumverhalten ein Modell entworfen werden. Dafür wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Veränderungen der Mycolsäureschicht durch Mutation der Gene *csp1/2/3* auch zu einer Änderung der Zellhydrophobizität geführt haben. Die notwendigen Hydrophobizitätsbestimmungen der Bakterien zur Stützung dieser Hypothese konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Messungen nach der BATH- (*Bacterial Adhesion to Hydrocarbons*) (Rosenberg *et al.*, 1980)

und SAT-Methode (*Salt Aggregation Test*) (Lindahl *et al.*, 1981) lieferten keine hinreichend reproduzierbaren Ergebnisse. Im Modell könnte eine durch die Mutation veränderte Hydrophobizität der Zellhülle durch das unterschiedliche Mengenverhältnis von Trehalosemonocorynemycolaten (TMCM) zu Trehalosedicorynemycolaten (TDCM) bzw. das vollständige Fehlen von TDCM erklärt werden (Abb.V.5). Da im Wildtypstamm fast ausschließlich TDCM und kaum TMCM gefunden werden konnte, besteht die äußere Schicht des Mycolsäurebilayers praktisch nur aus TDCM. Möglicherweise kann sich eine der beiden Mycolsäuredomänen dieses Moleküls drehen und aus der eigentlichen Mycolsäureschicht in das Medium ragen. Die Hydrophobizität der Zellwand wäre auf diese Weise erhöht. Besonders in Gegenwart ebenfalls hydrophober Schaumblasen könnte die Ausbildung solcher Strukturen begünstigt werden. Die daraus resultierende Interaktion zwischen Zellwand und Schaumblase kann zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Schaums führen (Zhang *et al.*, 1992), wodurch mehr Antischaummittel zum Aufbrechen der Blasenlamellen eingesetzt werden muß. In der $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3$ int-Dreifachmutante sähe die Situation anders aus. Durch das Fehlen von TDCM besteht hier die äußere Mycolsäureschicht aus TMCM, es könnten demnach keine hydrophoben Ketten mehr in das Medium ragen, die Hydrophobizität wäre gegenüber dem Wildtypstamm herabgesetzt. Auf diese Weise wäre

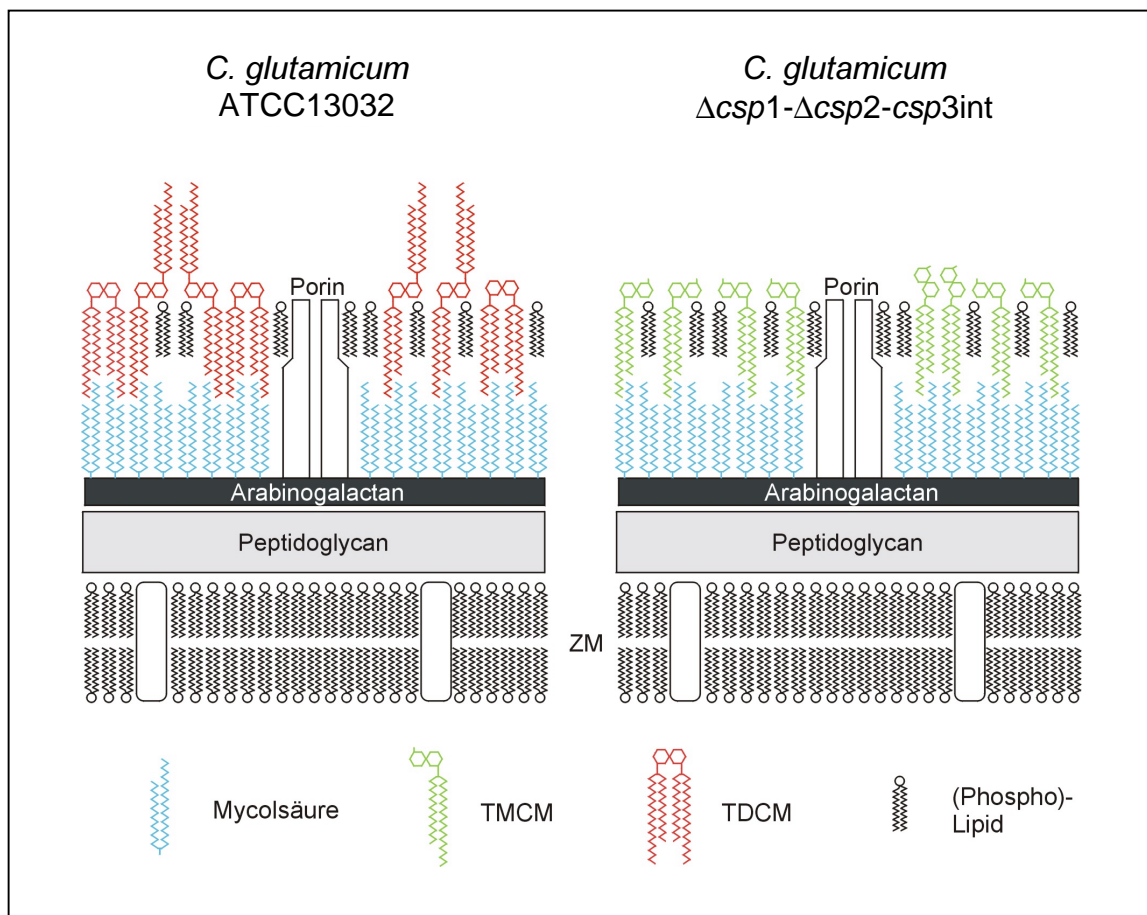


Abb.V.5: Modell des möglichen Unterschiedes im Aufbau der Mycolsäureschicht des *C. glutamicum* Wildtyps (RES167) und der $\Delta csp1-\Delta csp2-csp3$ int-Dreifachmutante.

auch die Interaktion zwischen den Bakterienzellen und den Blasen über die Mycolsäureketten ausgeschlossen, was wiederum zu einer Verringerung der Stabilität und eine leichteren Beseitigung des Schaums führen würde. Bei den Einfach- bzw. Doppelmutanten könnte man sich eine Situation vorstellen, die zwischen Wildtyp und Dreifachmutante angeordnet ist. Durch Reduktion der TDCM-Menge könnte auch hier die Interaktion der Bakterienzelle mit den Schaumbblasen durch Mycolsäureketten verringert werden, was wiederum zu einer Verminderung der Stabilität der Schaumbblasen führen würde.

Durch Messungen der Lysinproduktion der Stämme *C. glutamicum* $\Delta csp1$, $\Delta csp2$ und $\Delta csp1-\Delta csp2$ konnte nachgewiesen werden, daß die Mutation keinen negativen Einfluß auf die Aminosäureproduktionsleistung des Bakteriums hat. Die Messungen wurden dabei in den entsprechenden Stämmen durchgeführt, bei denen eine Lysinproduktion durch Etablierung des Lysinproduktions-Plasmides pJC50 (Cremer *et al.*, 1991) erreicht wurde. Ein Unterschied der gemessenen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp konnte nicht festgestellt werden. Die Messungen für die Dreifachmutante konnten noch nicht durchgeführt werden, da pJC50 und die *csp3int* Mutation die gleiche Resistenz als Selektionsmarker verwenden. Entsprechende Arbeiten stehen noch aus. Außerdem werden zur Zeit Messungen der Glutamatproduktion der PS1-Mutanten durchgeführt. Aufgrund der Vermutung, daß Veränderungen der Mycolsäureschicht durch z.B. Penicillinzugabe (Nunheimer *et al.*, 1970) oder Biotinlimitierung (Hoischen & Krämer, 1991) zu einer Steigerung der Glutamatproduktion in *C. glutamicum* führen (Eggeling *et al.*, 2001), kann davon ausgegangen werden, das zumindest die Dreifachmutante, bei der eine deutliche Veränderung der Mycolsäuredoppelschicht zu beobachten war, eine gesteigerte Ausschleusung von Glutamat aufweist.

Damit konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß durch gezielte Beeinflussung der Mycolsäureschicht durch Ausschaltung der Trehalosemycolyltransferasen PS1/A/B/C eine Veränderung des Schaumverhaltens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 bei der Fermentation bewirkt werden konnte. Diese Veränderungen führten zu einer leichteren Beseitigung des Schaums mit geringeren Mengen Antischaummitteln. Auf diese Weise können Kosten durch die übermäßige Verwendung vermieden und die Störung des Fermentationsprozesses durch Gabe dieser Mittel reduziert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Alshamaomy, L, M. Goodfellow, D. E. Minnikin** (1976) Free mycolic acid as a criteria in the classification of *Novardia* and the rhodochrous complex. J. Gen. Microbiol. **92**: 188-199
- Anderson, S., C.B. Marks, R. Lazarus, J. Miller, K. Stafford, J. Seymour, D. Light, W. Rastetter, and D. Estell** (1985) Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. Science **230**: 144-149.
- Altenbucher, J., and J. Cullum** (1984) DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. Mol. Gen. Genet. **195**: 134-138
- Asselineau, J.** (1981) Complex lipids of the cell envelope of actinomycetales. pp. 391-400 In: K.P. Schaal, and G. Pulver (eds.). Actinomycetes. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
- Bardonnet, N., and C. Blanco** (1991) Improved vectors for transcriptional signal screening in corynebacteria. FEMS Microbiol. Lett. **68**: 97-102
- Barksdale, L.** (1970) *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. Bacteriol. Rev. **34**: 378-422.
- Barksdale, L., and K.S. Kim** (1977) Mycobacterium. Bacteriological Review **41**: 217-372
- Bathe, B., J. Kalinowski, and A. Pühler** (1996) A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. Mol. Gen. Genet. **252**: 255-265
- Bathe, B.** (1999) Stand der Sequenzierung des *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Chromosoms. Persönliche Mitteilung, Universität Bielefeld.
- Bathe, B** (2001) Schaumbildung bei der Fermentation von *Corynebacterium glutamicum*. Persönliche Mitteilung, Degussa AG, Halle Westfalen.
- Baumeister, W., F. Karrenberg, R. Rachel, A. Engel, B. Ten Hegeler, and W.O. Saxton** (1982) The major cell envelope protein of *Micrococcus radiodurans* (R1): structure and chemical characterization. Eur. J. Biochem. **125**: 535-544
- Baumeister, W.; I. Wildhaber, and B.M. Phillips** (1989) Principles and organization in eubacterial and archaeobacterial surface proteins. Can. J. Microbiol. **35**: 215-227
- Behrens, S.** (2000), Untersuchung des Proteinexports in *Corynebacterium glutamicum* anhand der Produktion heterologer Exoenzyme. Dissertation, Universität Bielefeld
- Belsisle, J.T., V.T. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P.J. Brennan, and G.S. Besra** (1997) Role of the Major Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Cell Wall Biogenesis. Science **276**: 1420-1422
- Beveridge, T.J.** (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. Int. Rev. Cytol. **72**: 229-317

- Beveridge, T.J., and L.L. Graham** (1991) Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 684-705
- Beveridge, T.J.** (1994) Bacterial S-layers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 204-212
- Beveridge, T.J., P.H. Pouwels, M. Sára, A. Kotiranta, K. Lounatmaa, K. Kari, E. Kerosuo, M. Haapasalo, E.m. Egelseer, I. Schocher, U.B. Sleytr, L. Morelli, M.-L. Callegari, J.F. Nomellini, W.H. Bingle, J. Smit, E. Leibovitz, M. Lemaire, I. Miras, S. Salamiou, P. Béguin, H. Ohayon, P. Gounon, M. Matuschek, K. Sahm, H. Bahl, R. Grogono-Thomas, J. Dworkin, M.J. Blaser, R.M. Woodland, D.G. Newell, M. Kessel, and S.F. Koval** (1997) Function of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 99-149
- Blaser, M.J., P.F. Smith, J.E. Repine, and K.A. Joiner** (1988) Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. *J. Clin. Invest.* **81**: 1434-1444
- Blaser, M.J., and E.C. Gotschlich** (1990) Surface array protein of *Campylobacter fetus*. *J. Biol. Chem.* **265**: 14529-14535
- Blastock, W.P., and M.P. Weir** (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *TIBTECH* **17**: 121-127
- Boot, H.J., and P.H. Pouwels** (1996) Expression, Secretion and antigenic variation of bacterial S-layer protein. *Mol. Microbiol.* **21**: 1117-1123
- Boot, H.J., C.P.A.M. Kolen, and P.H. Pouwels** (1996) Interchange of the active and silent S-protein genes of *Lactobacillus acidophilus* by inversion of the chromosomal *slp* segment. *Mol. Microbiol.* **21**: 799-809
- Brand, S.** (1998) Etablierung einer physikalischen und genetischen Makrorestriktionskarte des Chromosoms von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Brennan, P.J., and H. Nikaido** (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **96**: 29-63
- Brockmann-Gretza, O.** (1998) Etablierung einer geordneten Cosmid-Bank von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Diplomarbeit. Universität Bielefeld
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the prinziple of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-245
- Bronstein, I. et al.** (1991) Novel chemiluminescent adamantyl 1,2-dioxetane enzyme substrates, pp. 73-82. In: Stanley P., and L.J. Kricka (eds.), *Bioluminescence and Chemiluminescence*, Current Statuts, John Wiley, Chichester, England.
- Bullock, T.L., K. Breddam, and S.J. Remington** (1996) Peptide aldehyde complexes with wheat serine carboxypeptidase II: implications for the catalytic mechanism and substrate specificity. *J. Mol. Biol.* **255**: 714-725

- Cadenas, R.F., J.F. Martín, and J.A. Gil** (1991) Construction and characterisation of promotor-probe vectors for *Corynebacteria* using the kanamycine-resistance reporter gene. *GENE* **98**: 117-121
- Calabrese, V.G.M., R.E. Elsavage, G.K. Bissonnette, and A.J. Sexstone** (1993) Mobility and enhanced biodegradation of a dilute waste oil emulsion during land treatment. *J. Ind. Microbiol.* **12**: 13-20.
- Carl, M., M.E. Dobson, W.M. Ching, and G.A. Dasch** (1990) Characterization of the gene encoding the protective paracrystalline-surface-layer proteins of *Rickettsia prowazekii*. presence of a truncated identical homolog in *Rickettsia typhi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8237-8241
- Chami, M., N. Bayan, J.-C. Didieu, G. Leblon, E. Shechter, and T. Gulik-Krzywicki** (1995) Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: a combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study. *Bio Cell* **83**:219-229
- Chami, M., N. Bayan, J.L. Peyret, T. Gulik-Krzywicki, L. Leblon, and E. Shechter** (1997) The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain. *Mol. Microbiol.* **23 (3)**: 482-492
- Charlebois, R.L., T. Gaasterland, M.A Ragan, W. Ford Doolittle, and C.W. Sensen** (1996) The *Sulfolobus solfataricus* P2 genome project. *FEBS Letters* **389**: 88-91
- Chu, S., S. Cavaignac, J. Feutrier, B.M. Phipps, M. Kostrzynska, W.W. Kay, and T.J. Trust** (1991) Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* **266**: 15258-15265
- Chun, J., S.-O. Kang, Y.C. Hah, and M. Goodfellow** (1996) Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. *J. Indust. Microbiol.* **17**: 205-213
- Closs, O., M. Harboe, N.H. Axelsen-Christensen, and M. Magnusen** (1980) The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studied by crossed immuno-electrophoresis: a reference system. *Scan. J. Immunol.* **12**: 249-263
- Collins, M.D., M. Goodfellow, and D.E. Mikinnin** (1982) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 129-149.
- Collins, M.D., and C.S. Cummins** (1986) Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, pp. 1266-1276. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Cremer, J., L. Eggeling, and H. Sahm** (1991) Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in *Corynebacterium glutamicum* as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes. *Appl. and Environ. Microbiol.* **57 (6)**: 1746-1752
- David, H.L., N. Rastogi, S. Clavel-Seres, F. Clement, and M.F. Thorel** (1987) Structure of the cell envelope of *Mycobacterium avium*. *Zbl. Bakteriol. Hyg. A.* **264**: 49-66

- Dower, J.W., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145.
- Draper, P.** (1982) The anatomy of mycobacteria. pp 9-52. In: C. Ratledge, and J. Stanford (eds.) The biology of mycobacteria. **Vol.1** Academic Press, Inc. (London), Ltd. London
- Dworkin, J, and J. Blaser** (1996) Generation of *Campylobacter fetus* S-layer Protein diversity utilizes a single promotor on an invertible DNA segment. Mol. Microbiol. **19**: 1241-1253
- Eckhardt, T.** (1978) A rapid method for identification of plasmids disoxyribonucleic acids in bacteria. Plasmid **1**: 584-588.
- Egelseer, E.M., R. Idris, M. Jarosch, T. Danhorn, U.B. Sleytr, and M. Sára** (2000) ISBst12, a novel type of insertion sequence element causing loss of S-layer gene expression in *bacillus stearothermophilus* ATCC12980. Microbiology **146 (9)**: 2175-2183
- Eggeling, L., K. Krumbach, and H. Sahm** (2001) L-Glutamate Efflux with *Corynebacterium glutamicum*: Why Is Penicillin treatment or Tween Addition Doing the Same? J. Mol. Microbiol. **3(1)**: 67-68
- Eikmanns, B.J., E. Kleinertz, W. Liebl, and H. Sahm** (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promoter probing. Gene **102**: 93-98
- Enei, H., H. Shibai, and Y. Hirose** (1985) 5'-guanosine monophosphate, pp. 653-658. In: M. Moo-Young (ed.), Comprehensive Biotechnology. Pergamon Press, Oxford.
- Etémadi, A. H.** (1967) Isomerisation de, mycolates de methyle en milieu alcalin. Chem. Phys. lipids **1**: 165-175
- Fowler, J.D., and C.R. Robertson** (1991) Metabolic behavior of immobilized aggregates of *Echerichia coli* under conditions of varying mechanical stress. Appl. Environ. Microbiol. **57(1)**: 93-101
- Gaasterland, T., and C.W. Sensen** (1996a) MAGPIE: A multipurpose automated genome profect investigation envorinment for ongoing sequencing projects. In: J.F. De Bruijnm J.R. Lupski, and G. Weinstock (eds.) Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis. Chapman and Hall
- Gaasterland, T., and C.W. Sensen** (1996b) MAGPIE: automated genome interpretation. Trends Genet. **12 (2)**: 76-78
- Gänshirt, H.** (1966) Dokumentation der Dünnschichtchromatogramme, pp125-133. In: Stahl (ed.) Dünnschichtchromatographie.
- George, K.M., Y. Yuan, D.R. Sherman, C.E. Barry III** (1995) The biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification and functional analysis of *cmas-2*. J. Biol. Chem. **270**: 27292-27298

- Ghebeh, H., A. Handa-Corrigan, and M. Butler** (1998) Development of an assay for the measurement of the surfactant pluronic F-68 in mammalian cell culture medium. *Anal. Biochem.* **262(1)**: 39-44
- Graham, L.L., and T.J. Beveridge** (1994) Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. *J. Bacteriol.* **176**: 1413-1421
- Grant, S.G.N., J. Jesse, F.R. Bloom, and D. Hanahan** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 4645-4649
- Gustafson, C.E., S. Chu, and T.J. Trust** (1994) Mutagenesis of the paracrystalline surface protein arrays of *Aeromonas salmonicida* by endogeneous IS-Elements. *J. Mol. Biol.* **237**: 452-463
- Hastie, A.T., and C.C. Brinton jr.** (1979) Specific interaction of the tetragonally arrayed protein layer of *Bacillus sphaericus* with its peptidoglycan sacculus. *J. bacteriol.* **138**: 1010-1021
- Heijne von, G.** (1990) The signal peptide. *J. Membr. Biol.* **115**: 195-201
- Henzel, W.J., T.M. Billeci, J.T. Stults, S.C. Wong, C. Grimley, and C. Watanabe** (1992) Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(11)**: 5011-5015
- Hermann, T., M. Finkemeier, W. Pfefferle, G. Wersch, R. Krämer, and A. Burkovski** (2000) Two-dimensional electrophoretic analysis of *Corynebacterium glutamicum* membrane fraction and surface proteins. *Electrophoresis* **21**: 654-659
- Herrera-Alcaraz, E., P. Valero-Guillen, F. Martín-Luengo, and M. Canteras-Jordana** (1993) Numeric analysis of fatty and mycolic acid profiles of *Corynebacterium urealyticum* and other related corynebacteria. *Microbiologia.* **9**: 53-62
- Hinrikson, H.P., and G.E. Pfyffer** (1994) Mini-review Mycobacterial mycolic acids (Part I). *Med. Microbiol. Lett.* **3**: 97-106
- Hirose, Y., H. Einei, and H. Shibai** (1985) L-glutamic acid fermentation, pp. 593-600. In: M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Oxford.
- Hoischen, C., and R Krämer** (1990) Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 3409-3416
- Hoppe, B. und J. Martens** (1983) Aminosäuren - Bausteine des Lebens. *Chemie in unserer Zeit* **17**: 41-53.
- Hui, J., N. Gordon, and R- Kajjoka** (1977) Permeation barrier to rifampin in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **11**: 773-779.

- Ish-Horowitz, D., and J.F. Burke** (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acid Res.* **9**: 2989-2998
- Illing, S., and S.T.L. Harrison** (1999) The kinetics and mechanism of *Corynebacterium glutamicum* aggregate breakup in bioreactors. *Chem. Eng. Science* **54**: 441-454
- Jäger, W., A. Schäfer, J. Kalinowski, and A. Pühler** (1992) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol* **174**: 5462-5465
- Jäger, W., A. Schäfer, J. Kalinowski, and A. Pühler** (1995) Isolation of insertion elements from gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Rhodococcus* strains using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene as a positive selection marker. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**: 1-6.
- Jarlier, V., and H. Nikaido** (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* **172**: 1418-1423
- Joliff, G., L. Mahieu, V. Hahn, N. Bayan, F. Duchiron, M. Renaud, E. Schechter and, G. Leblon** (1992) Cloning and nucleotide sequence of the *csp1* 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 (16)**: 2349-2362
- Jones, D., and M.D. Collins** (1986) Irregular, non-sporing, gram-positive rods, pp. 1261-1266. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Karas M., and F. Hillenkamp** (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60(20)**: 2299-2391
- Kassing, F.** (1992) Klonierung und Charakterisierung des Transposons TnCx1 aus *Corynebacterium xerosis* und seine Anwendung für die Transposon-Mutagenese in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Katsumata, R., A. Ozaki, and A. Furuya** (1984) Protoplast transformation of glutamate producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**: 306-311
- Kay, W.W., J.T. Buckley, E.E. Ishiguro, B.M. Phipps, J.P.L. Monette, and T.J. Trust** (1981) Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **147**: 1077-1084
- Khyse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple genes: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203-209
- Kinoshita, S., S. Udaka, and M. Shimono** (1957) Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.

Kinoshita S. (1985) Glutamic acid bacteria. In: Demain, A.L., N.A. Solomon (eds.) Biology of industrial important Important Microorganisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, London.

Kirchner O. (1999) Hocheffizienter Elektrotransfer von Plasmiden nach *Corynebacterium glutamicum* und Entwicklung von Vektorsystemen zur funktionellen Genomanalyse. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

Kleemann, A., W. Leuchtenberger, B. Hoppe, and H. Tanner (1985) Amino acids, pp. 57-97 In: W. Gerhartz (ed.), Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Vol 2a. VCH, Weinheim.

Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26 (3)**: 231-243

König, H. (1988) Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.* **34**: 395-406

Komatsu. Y. (1979) Complete lysis of glutamate acid-producing bacteria by the use of antibiotics which inhibit the biosynthesis of the cell walls. *J. Gen. Microbiol.* **113**: 407-408

Kono, M., M. Sasatsu, and T. Aoki (1983) R-plasmids in *Corynebacterium xerosis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**: 506-508.

Koval, S.F., and R.G.E. Murray (1986) the superficial protein arrays on bacteria. *Microbiol. Sci.* **3**: 357-362

Kraut, J. (1977) Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 331-358

Kuen, B., and W. Lubitz (1996) Analysis of S-layers proteins and genes. In: Crystalline Bacterial Cell Surface Proteins. pp. 77-102. In: Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum, and M. Sára (eds.) R.G. Landes, Academic Press, Austin, Texas

Kuen, B., A. Koch, E. Asenbauer, M. Sára, and W. Lubitz (1997) Molecular characterization of the second S-layer gene *sbsB* of *Bacillus stearothermophilus* PV72 expressed by oxidative stress. *J. Bacteriol.* **179**: 1664-1670

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lanéelle, M.-A., and J. Asseleau (1977) Glycolipids of *Brevibacterium vitarum*. *Biochem. Biophys. Acta* **486**: 205-208

Lechner, J., and M. Sumper (1987) The primary structure of procaryotic glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **262**: 9724-9729

Lee, C.W., S. Lucas, and M.J. Desomazeaud (1985) Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneforma bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* **26**: 201-105.

- Lehmann, K.B. und R.O. Neumann** (1896) pp. 1-448. In: Lehmann, J.F. (ed.) Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik
- Lewis, L.O., and A.A. Youston** (1988) Bacteriophage attachment to the S-layer of the mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Curr. Microbiol.* **17**: 55-60
- Liebl, W.** (1991) The genus *Corynebacterium*-nonmedical, pp. 1157-1171. In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, and K.H. Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*, Springer Verlag, New York.
- Lindahl, M., A. Faris, T. Wadström, and S. Hjertén** (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative hydrophobicity of bacterial cells. *Biochem. et Biophys. Acta* **677**: 471-476
- Liu, J., C.E. Barry III, G.S. Besra, and H. Nikaido** (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **271**: 29545-29551
- Lupas, A, H. Engelhardt, J. Peters, U. Santarius, S. Volker, and W. Baumeister** (1994) Domain structure of the *Acteogenium kivui* surface layer revealed by electron crystallography and sequence analysis. *J. Bacteriol.* **176**: 1224-1233
- Marienfeld, S., E.-M. Uhlemann, R. Schmid, R. Krämer, and A. Burkovski** (1997) Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek.* **72**: 291-297
- Martin, J.F.** (1989) Molecular genetics of amino acid producing corynebacteria, pp. 25-59. In: S. Baumberg, I. Hunter and M. Rhodes (eds.), *Society for General Microbiology Symposium*. Cambridge University Press.
- Matrix Science Ltd.** (2000) Peptide mass fingerprint: To many peptides <http://mascot/cgi/index.pl?page=../home.html>
- Matuschek, M., G. Burchardt, K. Sahm, and H. Bahl** (1994) Pullulanase of *Thermonaerobacterium thermosulphurigenes* EM1 (*Clostridium thermosulphorogenes*): molecular analysis of the gene, composite structure of the enzyme, and a common model for its attachment to the cell surface. *J. Bacteriol.* **176**: 3295-3302
- McPherson, R.A.** (1995) Evolution of polymerase chain-reaction to a quantitative laboratory tool. *Clinical Chemistry* **41**: 1065-1067
- Messner, P. and U.B. Sleytr** (1992) Crystalline bacterial cell surface layers. pp. 213-274. In A.H. Rose (ed.) *Advances in Microbial Physiology*. Vol 3, Academic Press, London
- Michel, G., and C. Bordet** (1976) Cell walls of *Nocardiae*, pp. 141-159. In: N. Goodfellow, G.H. Brownell, and J.A. Serrano (eds.). *The biology of the Nocardiae*, Academic Press, London
- Miller, T.L.** (1985) Steroid transformation, pp. 297-318. In: M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Oxford.

- Minnikin, D.E., and M. Goodfellow** (1976) Lipid composition in the classification and identification of *Nocardia* and related taxa. PP. 160-169. In: M. Goodfellow, G.H. Brownwell, and J.A. Serrano (eds.). The biology of *Nocardiae*. Academic Press, New York.
- Minnikin, D.E., T. Pirouz, and M. Goodfellow** (1977) Polar lipid composition in the classification of some *Actinomadura* species. Int. J. Syst. Bacteriol. **27**: 118-121
- Minnikin, D.E., M. Goodfellow, and A.G. O'Donnel** (1978) Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. pp 85-160 In: Bousfield, I.J., and A.G. Calley (eds.) Coryneform Bacteria. Academic Press, London.
- Minnikin, D.E.** (1982) Complex lipids: Their chemistry, biosynthesis and roles. pp. 98-184. In C. Ratledge, and J. Stanford (eds.) The Biology of Mycobacteria. Vol.1. Academic Press, London
- Minnikin, D.E., and A.G. O'Donnel** (1984) *Actinomycetes* envelope and peptidoglykan composition. pp. 337-388 In M. Goodfellow, M. Mordarski, and S.T. Williams (eds.). The biology of *Actinomycetes*. Academic Press, London
- Miwa, K., K. Matsui, N. Terabe, S. Nakamori, K. Sano, and H. Momose** (1984) Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. **48**: 2901-2903.
- Morinaga, Y., M. Tsuchiya, K. Miwa, and K. Sano** (1987) Expression of *Escherichia coli* promoters in *Brevibacterium lactofermentum* using shuttle vector pEB77003. J. Biotechnol. **5**: 305-312
- Mormann, S** (2001) Erstellung einer minimalen BAC-Karte von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Diplomarbeit, Universität Bielefeld
- Niederweis, M., E. Maier, T. Lichtinger, R. Benz, and R. Krämer** (1995) Identification of channel-forming activity in the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **177**: 5176-5718
- Nikaido, H.** (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science **264**: 382-388
- Nunheimer, T.D. J. Birnbaum, E.D. Ihnen, and A.L. Demain** (1970) Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl. Microbiol. **20**: 215-217
- O'Farrell, P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**: 4007-4021
- Osborn, M.J.** (1979) Biosynthesis and assembly of the lipopolysaccharides of the outer membrane. In: M. Inouye (ed.) Bacterial Outer Membranes. pp. 15-43. John Wiley and Sons, New York.
- Paul, T.R., and T.J. Beveridge** (1992) Reevaluation of cell envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze substitution protocols. J. Bacteriol. **174**: 6508-6517

- Peyret, J.L., N. Nayan, G. Joliff, T. Gulik-Krzywicki, L. Mathieu, E. Schlechter, and G. Leblon** (1993) Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **9** (1): 97-109
- Puech, V., N. Bayan, K. Salim, G. Leblon, and M. Daffé** (2000) Characterization of the mycolyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* **35** (5): 1026-1041
- Pühler, A. und J. Kalinowski** (1995) Molekulargenetik am Beispiel Aminosäure-produzierender Corynebakterien. *Biologie in unserer Zeit* **4**: 221-229.
- Reyes, O., A. Guyonvarch, C. Bonamy, V. Salti, F. David, and G. Leblon** (1991) ,Integron'-bearing vectors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive *Corynebacteria*. *Gene* **107**: 61-68
- Richter, W., F. Hänel, and M. Hilliger** (1985) Freeze-fracture observations of *Corynebacterium glutamicum*: the occurrence of an outer-membrane like structure and the influence of temperature on the cytoplasmatic membrane. *J. Basic Microbiol.* **25**: 527-536
- Römpf** (1999) Lexikon: Biotechnologie und Gentechnik. 2. Auflage. Deckwer, W.-D., A. Pühler; and R.D. Schmid. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ronning, D.R., T. Klabunde, G.S. Besra, V.D. Vissa, J.T. Belisle, and J.C. Sacchettini** (2000) Crystal Structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nature Struct. Biol.* **7** (2): 141-146
- Rosenberg, M., D. Gutnik, and E. Rosenberg** (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Let.* **9**: 29-33
- Rossol, I., and A. Pühler** (1992) The *Corynebacterium glutamicum aecD* gene encodes a C-S lyase with β -elimination activity that degrades aminoethylcystein. *J. Bacteriol.* **174**: 2968-2977
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Santamaria, R., J.A. Gil, J.M. Mesas, and J.F. Martin** (1984) Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2237-2246.
- Sára, M, and U.B. Sleytr** (1996) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from cell structure to biomimetics. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **65**: 83-111
- Sára, M, and U.B. Sleytr** (2000) Minireview: S-Layer Proteins. *J. Bact.* **182** (4): 859-868

- Sathyamoorthy, N, and K. Takayama** (1987) Purification and characterization of a novel mycolic acid exchange molecule from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem. **262**: 13417-13423
- Schäfer, A., J. Kalinowski, R. Simon, A.-H. Seep-Feldhaus, and A. Pühler** (1990) High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol. **172**: 1663-1666
- Schäfer, A., J. Kalinowski, and A. Pühler** (1994a) Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. Appl. Environm. Microbiol. **60**: 756-759.
- Schäfer, A., A. Schwarzer, J. Kalinowski, and A. Pühler** (1994b) Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **176**: 7309-7319.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler** (1994c) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene **145**: 69-7
- Schatz, G., and B. Dobberstein** (1996) Common principles of protein translocation across membranes. Science **271**: 1519-1526
- Schwarzer, A., and A. Pühler** (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. BIO/Technology **9**: 1195-1204.
- Sleytr, U.B.** (1978) Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly and function. Int. Rev. Cytol. **53**: 1-64
- Sleytr, U.B., and P. Messner** (1988) Crystalline surface layers in procaryotes. J. Bacteriol. **170**: 2891-2897
- Sleytr, U.B., and P. Messner** (1989) Crystalline surface layers on bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **37**: 311-339
- Sleytr, U.B.,** (1994) Basic and applied S-layer research: an overview. FEMS Microbiol. Reviews. **20**: 5-12
- Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum, and M. Sára** (1996) (eds.) Crystalline Bacterial Cell Surface Layer Proteins. In: R.G. Landes. Academic Press, Austin, Texas
- Sleytr, U.B., and M. Sara** (1997) Bacterial and archaeal S-layer protein: structure function-relationships and their biotechnological applications. **15**: 20-26
- Sleytr, U.B., H. Bayley, M. Sára, A. Breitwieser, S. Küpcü, C. Mader, S. Weigert, F.M. Unger, P. Messner, B. Jahn-Schmid, B. Schuster, D. Pum, K. Douglas, N.A. Clark, J.T. Moore, T.A.**

- Winningham, S. Levy, I. Frithsen, J. Pankovc, P. Beale, H.P. Gillis, D.A. Choutov, K.P. Martin** (1997b) Applications of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews*. **20**: 151-175
- Sleytr, U.B., and T.J. Beveridge** (1999) Review: Bacterial S-layer. *Trends in Microbiol.* **7 (6)**: 253-260
- Sleytr, U.B., P. Messner, D. Pum, and M. Sára** (1999) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**: 1034-1054
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler** (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *BIO/Technology* **1**: 784-794.
- Southern, E.M.R., R. Anand, W.R.A. Brown, and D.S. Fletcher** (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucl. Acids. Res.* **15**: 5925-5942
- Stackebrandt, E., and C. R. Woese** (1982) The evolution of prokaryotes. In: M. J. Carlile, J. F. Collins, and B. E. B. Mosely (eds.) *Molecular and cellular aspects of microbial evolution*. pp 2-31. Cambridge University Press, Cambridge
- Sumper, M., E. Berg, R. Mengele, and I. Stroebel** (1990) Primary structure and glycolisation of the S-layer protein of *Halofax volcanii*. *J. Bacteriol.* **172**: 7111-7118
- Suzuki T., H. Honda, and R. Katsumata** (1972) Production of antimicrobial compounds analogous to chloramphenicol by *n*-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2223-2228.
- Takeuchi, M., and A. Yokota** (1993) Evaluation of cell-wall sugar composition as a taxonomic marker of some coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**: 505-512
- Takeuchi, M., and A. Yokota** (1989) Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**: 233-252
- Tauch, A.** (1992) Transposonmutagenese in *Corynebacterium glutamicum* mit dem Erythromycin-Resistenz-Transposon aus *Corynebacterium xerosis*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Tauch, A., F. Kassing, J. Kalinowski, and A. Pühler** (1995) The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying Chloramphenicol, kanamycin and tetracycline resistances is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, **33**: 168-179.
- Tauch, A.** (2000) Lückenschluß des *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Genoms durch Erstellen einer geordneten BAC-Karte. Persönliche Mitteilung, Universität Bielefeld.
- Tauch, A.** (2001) Aktueller Stand des *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Genomprojektes. Persönliche Mitteilung, Universität Bielefeld.

- Teresawa, M., H. Yukawa, and Y. Takayama** (1985) Production of L-aspartic acid from *Brevibacterium* by the cell re-using process. *Process Biochem.* **20**: 124-128.
- Thomas, S., J.W. Austin, W.D. McCubbin, C.M. Kay, and T.J. Trust** (1992) Roles of the structural domains in the morphology and surface anchoring of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*. *J. Mol. Biol.* **228**: 652-661
- Tomiyasu, I.** (1982) Mycolic acid composition and thermally adaptive changes in *Nocardia asteroides*. *J. Bacteriol.* **151**: 828-837
- Tomiyasu, I., and I. Yano** (1984) Isonicotinic acid hydrazide induced changes and inhibition in mycolic acid synthesis in *Nocardia* and related taxa. *Arch. Microbiol.* **137**: 316-323
- Tosaka, O., H. Enei, and Y. Hirose** (1983) The production of L-lysine by fermentation. *Trends Biotechnol.* **1**: 70-74.
- Towbin, H., Staehelin, T., and J. Gordon** (1979) Electrophoretic Transfer of proteins from polyacrylamtic gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- Wang, E., M.M. Garcia, M.S. Blake, Z. Pei, and M.J. Blaser** (1993) Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. *J. Bacteriol.* **175**: 4979-4984
- Wasinger, V.C. et al., Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I.** (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**: 1090-1099
- Wiker, H.G., M. Harboe, S. Nagai, and J. Bennedsen** (1990) Quantitative and qualitative studies on the major extracellular antigen of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and *Mycobacterium bovis* BCG. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**: 830-838
- Wilson** (1989) *Foams: Physics, Chemistry and Structure*. Springer Verlag, Berlin
- Wohlleben, W., G. Muth, and J. Kalinowski** (1993) Genetic Engineering of Gram Positive Bacteria, pp. 457-505. In: H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler and P. Stadler (eds.), *Biotechnology*, Vol. 2. VCH, Weinheim.
- Wolf, H., A. Pühler, and E. Neumann** (1989) Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 282-289.
- Yokota, T., T. Omori, and T. Kodoma** (1987) Purification and properties of haloalkane dehalogenase from *Corynebacterium* sp. strain m15-3. *J. Bacteriol.* **169**: 4049-4054.
- Young, D., T. Garbe, R. Lathigra, C. Aboud-Zeid** (1990) pp. 1-35. In: J. McFadden (ed.), *Molecular Biology of the Mycobacteria*, Surrey University Press, Guilford, United Kingdom

Zhang S., A. Handa Corrigan, and R.E. Spier (1992) Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors. *J. Biotechnol.* **25(3)**: 289-306.

Zajic, J.E., H. Guignard, and D.F. Gerson (1977) Emulsifying and surface active agents from *Corynebacterium hydrocarboclastum*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 1295-1301.

VII Anhang

1 Alignment von PS1A aus *C. glutamicum* ATCC13032 und PS1 aus *C.g.* ATCC17965

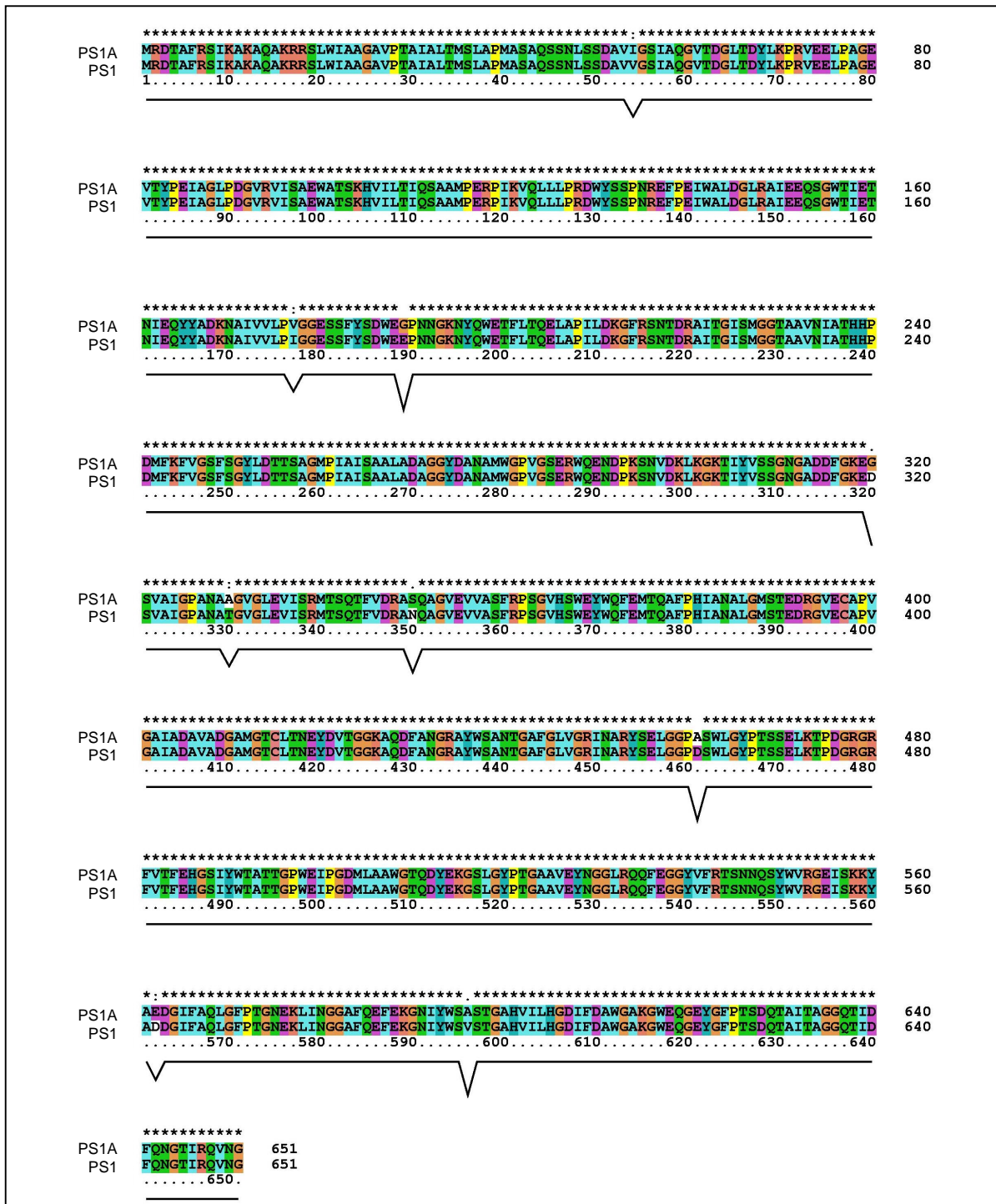


Abb.VII.1: Proteinalignment des PSA1-Proteins von *C. glutamicum* ATCC13032 und PS1 von *C. glutamicum* ATCC17965. (*) = identische AS; (:) = ähnliche AS; (.) = ähnliche Struktur

2. Alignment von *csp4* und *csp5* / PS1D und PS1E

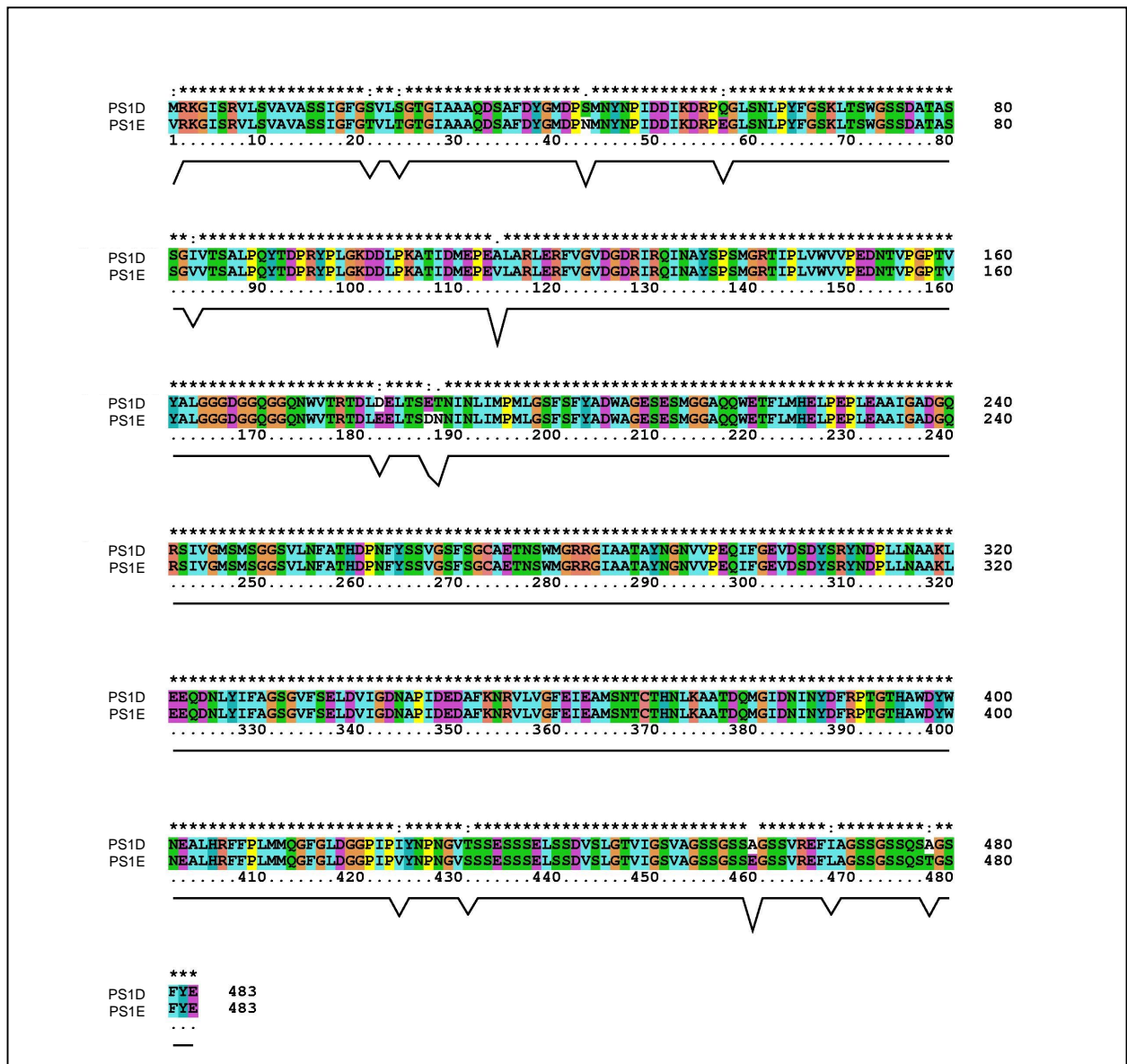


Abb.VII.2.1: Alignment von PS1D und PS1E aus *C. glutamicum* ATCC13032-Protein. (*) = identische AS; (:) = ähnliche AS; (.) = ähnliche Struktur

| | | |
|---|---|------|
| ***** ** * ** * ** * ** * | | |
| msp4 | -ATCGGTAAAGGAATTCCCGCGTCTCTCGGTAGCGGTTGCTAGTCTATTTGGATTTCGGTTCGGTGTGCTTGGAAACCG | 79 |
| msp5 | -ATCGGTAAAGGAATTCCCGCGTCTCTCGGTAGCGGTTGCTAGTCTAATCGGATTTCGGAACTGTACTGACAGGCACCG | 79 |
| ***** * ***** ***** | | |
| msp4 | GCATCGCAGCAGCTCAAGACTCTGCATTTGACTACGGTATGGATCCGAGCATGAACACAACCCGATCGCAGCATCAAG | 159 |
| msp5 | GCATCGCAGCAGCTCAAGACTCTGCATTTGACTACGGTATGGATCCAAACATGAACACAACCCGATCGATGACATCAAG | 159 |
| ***** ** * ** * ** * ** * ***** ***** | | |
| msp4 | GATCGTCCCAGGGTTATCCAACCTTCCTACTTCGGAAGCAAATAACAGCTGGGGTCATCAGATGCCACCGCCTC | 239 |
| msp5 | GATCGTCCCAGAGTTGTCCAATCTTCCTACTTCGGAAGTAAATTGACCAGCTGGGGTCATCAGATGCCACCGCCTC | 239 |
| ***** ** * ** * ** * ** * ***** ***** | | |
| msp4 | ATCCGGCATCGTCACTCCGCACTCCCGCAATACACCGACCCACGCTACCCCTCGGCAAAGACGACCTGCCAAAGCAA | 319 |
| msp5 | ATCCGGCGTCTGTGACCTCCGCGCTCCCGCAGTACACCGATCCGCGCTACCCCTCGGCAAAGACGACCTGCCAAAGCAA | 319 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | CCATCGACATGGAGCCAGAAGCTTTGCGCGCTTGAGCGATTCGTGCGCGTTGACGGTGTGATCGCATCCGCCAATCAAC | 399 |
| msp5 | CCATCGACATGGAGCCAGAAGTCTTTGCGCGCTTGAGCGATTCGTGCGCGTTGACGGTGTGATCGCATCCGCCAATCAAC | 399 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | GCGTACTCGCCATCAATGGGACGCACCAATTCCTCTAGTCTGGTTCGTGCCAGAGACAACACCGTGCCTGGCCACCGGT | 479 |
| msp5 | GCGTACTCGCCATCAATGGGACGCACCAATTCCTCTAGTCTGGTTCGTGCCAGAGACAACACCGTGCCTGGCCACCGGT | 479 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | CTACGCACTCGGCGCGGCGACGGTGGCCAAGCGGCCAAAACCTGGGTCAACCGCACCGACCTTGATGAGTTGACCACTG | 559 |
| msp5 | CTACGCACTCGGCGCGGCGTACGGTGGCAAGCGGCCAGAACTGGGTCAACCGCACCGACCTTGAGGAATTAACCACTG | 559 |
| * * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | AAACAACATCAACCTCATCATGCCATGCTCGGATCTTTTAGTTTCTACGCTGACTGGGCGAGCGAAAGCGAATCCATG | 639 |
| msp5 | AAACAACATCAACCTCATCATGCCATGCTCGGATCTTTTAGTTTCTACGCTGACTGGGCGAGCGAAAGCGAATCCATG | 639 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | GGTGGTGCACAACAGTGGGAAACATTCCTCATGCACGAACCTACCGAGCCGCTAGAAGCGCCATCGGCGCAGACGGGCA | 719 |
| msp5 | GGTGGTGCACAACAGTGGGAAACATTCCTCATGCACGAACCTACCGAGCCGCTAGAAGCGCCATCGGCGCAGACGGGCA | 719 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | ACGCAGCATCGTCCGATGCCATGTCGGGGGATCGGTGCTGAACCTTGCAGCGCATGACCCCAACTTTTATTCCTCTG | 799 |
| msp5 | ACGCAGCATCGTCCGATGTCATGTCGGGGGATCAGTGTGAACCTTGCAGCGCATGACCCCAACTTTTACTCCTCGG | 799 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | TCGGCTCATTTTCTGGATGTGCCGAAACCAACTCCTGGATGGGGCGCGTGGCATCGCAGCCATGCCTACAACGGCAAT | 879 |
| msp5 | TCGGCTCATTTTCTGGATGTGCCGAAACCAACTCCTGGATGGGACCGCGTGGCATCGCAGCCATGCCTACAACGGCAAT | 879 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | GTCGTGCTGAGCAATCTTTGGTGAAGTAGACAGTGAATTAACCTCCTGCTATAACGATCCTTTGCTCAACGCTGCGAAGCT | 959 |
| msp5 | GTCGTGCTGAGCAATCTTTGGTGAAGTAGACAGTGAATTAACCTCCTGCTATAACGATCCTTTGCTCAACGCTGCGAAGCT | 959 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | CGAAGAACAAGACAACCTCTACATCTTCGCCGGTTCGGGTGTGTTCTCTGAACAGATGTATCGGTGACAACGCACCGA | 1039 |
| msp5 | CGAAGAACAAGACAACCTCTACATCTTCGCCGGTTCGGGTGTGTTCTCTGAACAGATGTATCGGTGACAACGCACCGA | 1039 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | TTGATGAGGATGCGTTCAAAAACCGCGTCTGGTTGGTTTGAAATCGAAGCTATGTCCAACACCTGCACCCATAACCTC | 1119 |
| msp5 | TTGATGAGGATGCGTTTAAAAACCGCGTCTGGTTGGTTTGAAATCGAAGCTATGTCCAACACCTGCACCCATAACCTC | 1119 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | AAGGCTGCGACCGATCAAAATGGGATCGACAACATCAACTACGATTTCCGACCAACCGGAACCCACCGCTGGGATTAAG | 1199 |
| msp5 | AAGGCTGCGACTGATCAAAATGGGATCGACAACATTAACATGATTTCCGACCAACCGGTAATCATGCTTGGGACTATTG | 1199 |
| *** ** * ** * ** * ** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | GAACGAAGCGCTCCACCGCTTCTTCCCGTTGATGATGCAGGGCTTCGGCCTCGACGGTGGTCCCATCCCGATCTATAACC | 1279 |
| msp5 | GAATGAGGCACTGCACCGTTCTTCCCGTTGATGATGCAGGGCTTCGGCCTCGACGGTGGTCCCATCCCGATCTATAACC | 1279 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | CTAACGGTGTGACCTCCAGCGAGTCTTCCTCAGAACTGCTTCTGATGTGAGCCTTGGCACCGTGTGCGGTAGTGTGGCG | 1359 |
| msp5 | CTAACGGTGTGCTCTAGTGTGCTTCTTCTGAGCTGTCGCTGATGTGAGTCTTGGCACCGTGTGCGGTAGTGTGGCG | 1359 |
| ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | | |
| msp4 | GGAAGCTCCGGATCAAGTGCAGGACGACCGTCCGAGAGTTCATTCAGGAAAGTCCGGATCAAGCCAATCAGCAGGAAG | 1439 |
| msp5 | GGAAGCTCCGGATCAAGTGAAGGACGACCGTCCGAGAGTTCATTCAGGAAAGTCCGGATCAAGCCAATCAGCAGGAAG | 1439 |
| ***** ***** | | |
| msp4 | CTTCTACGAATAA 1452 | |
| msp5 | CTTCTACGAATAG 1452 | |

Abb.VII.2.2: DNA-Alignment der Gene *msp4* und *msp5*

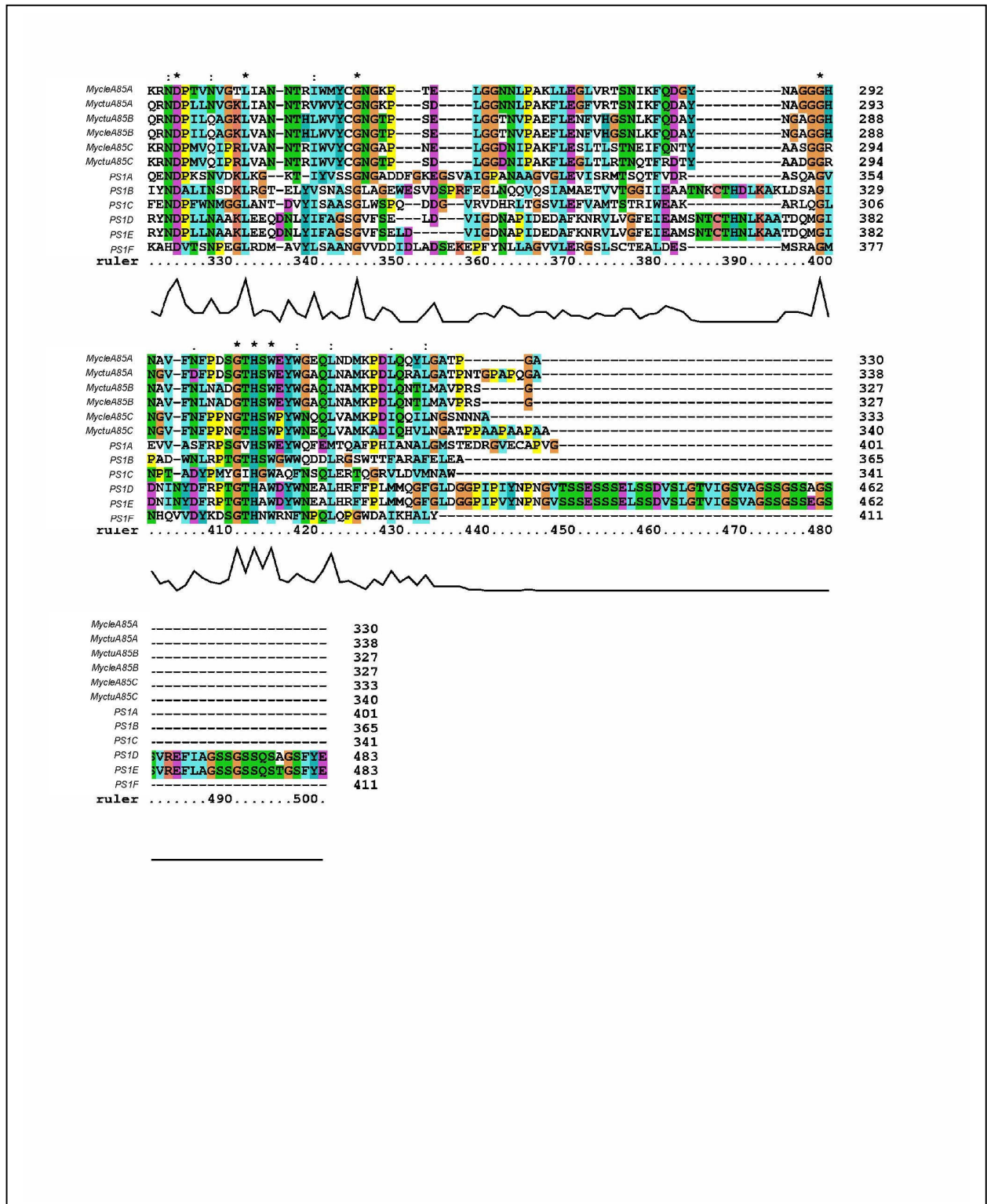
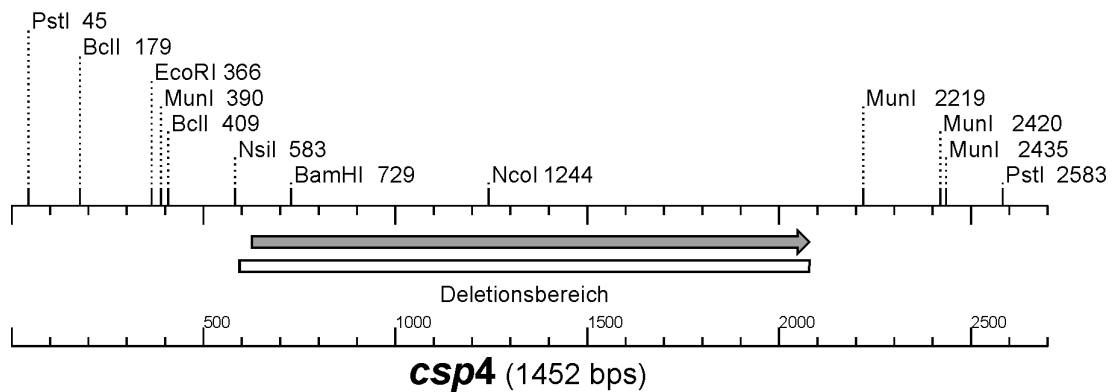
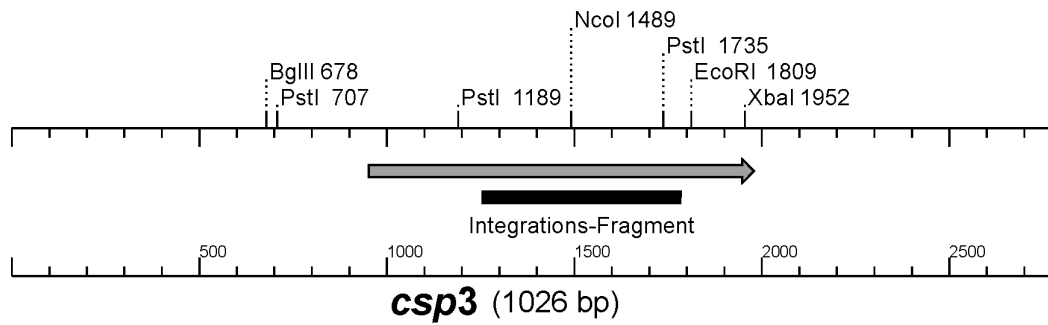
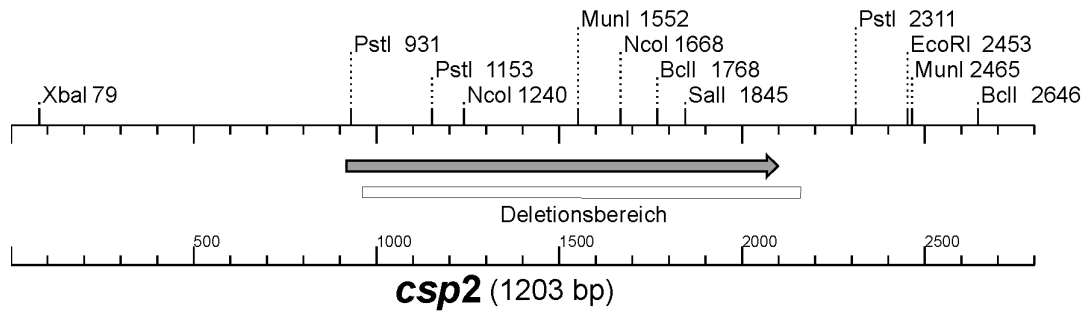
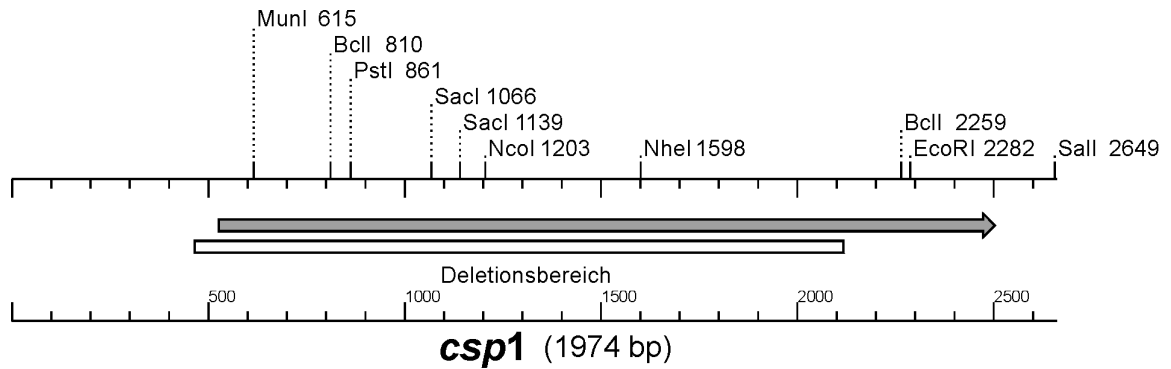
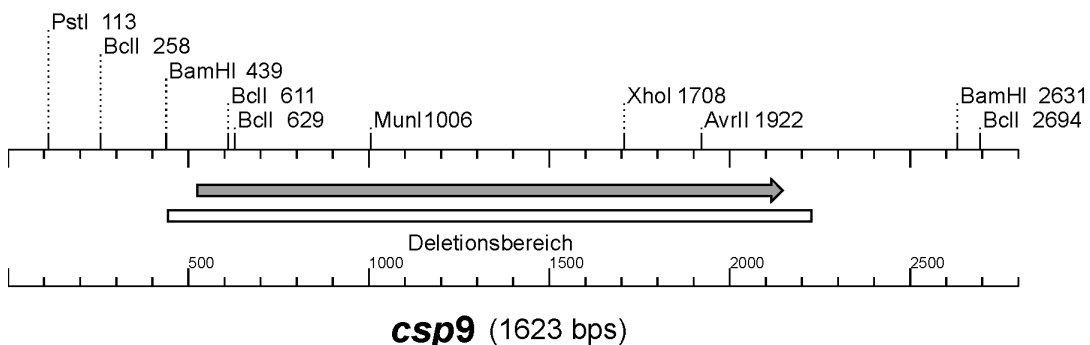
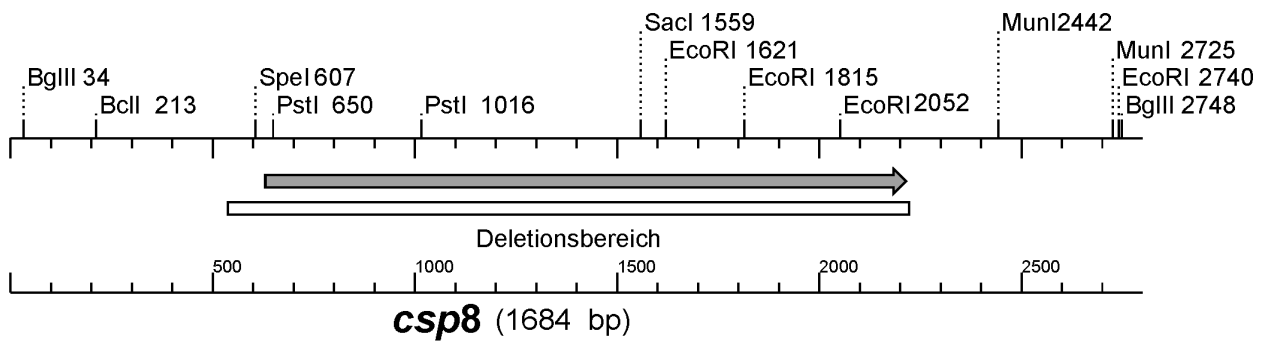
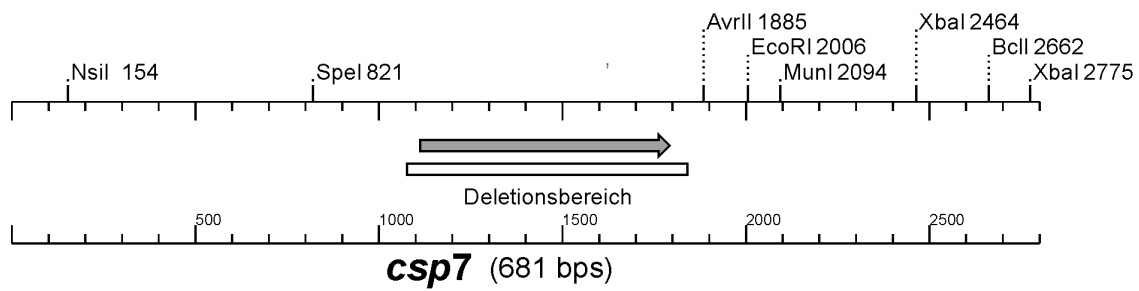
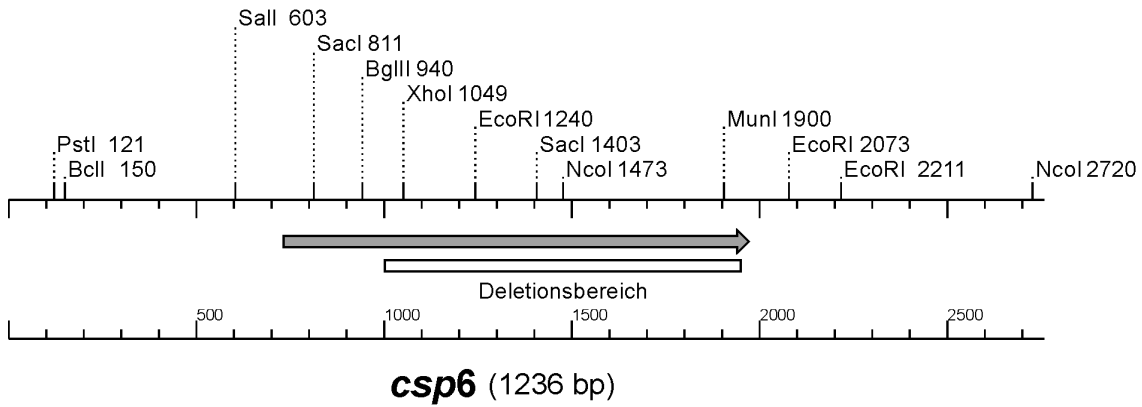
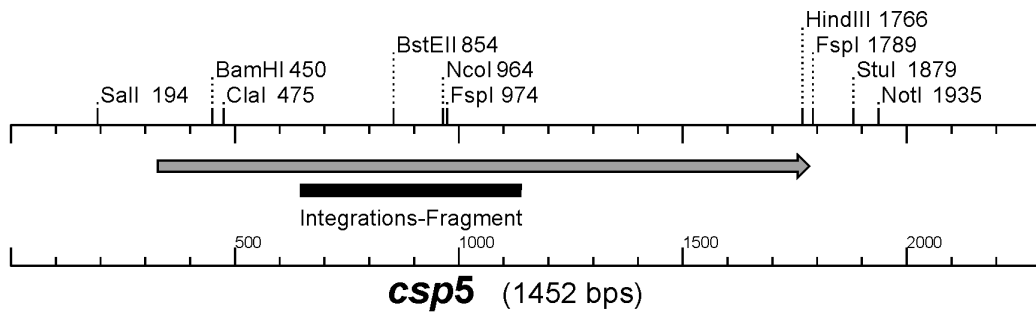


Abb.VII.3: Multiples Alignment (2. Seite) der Proteine PS1A-F aus *C. glutamicum* ATCC13032 und Antigen85ABC aus *Mycobacterium tuberculosis* (*Myctu*) und *M. leprae* (*Mycle*)

4 *csp* Gen- und Mutationskarten





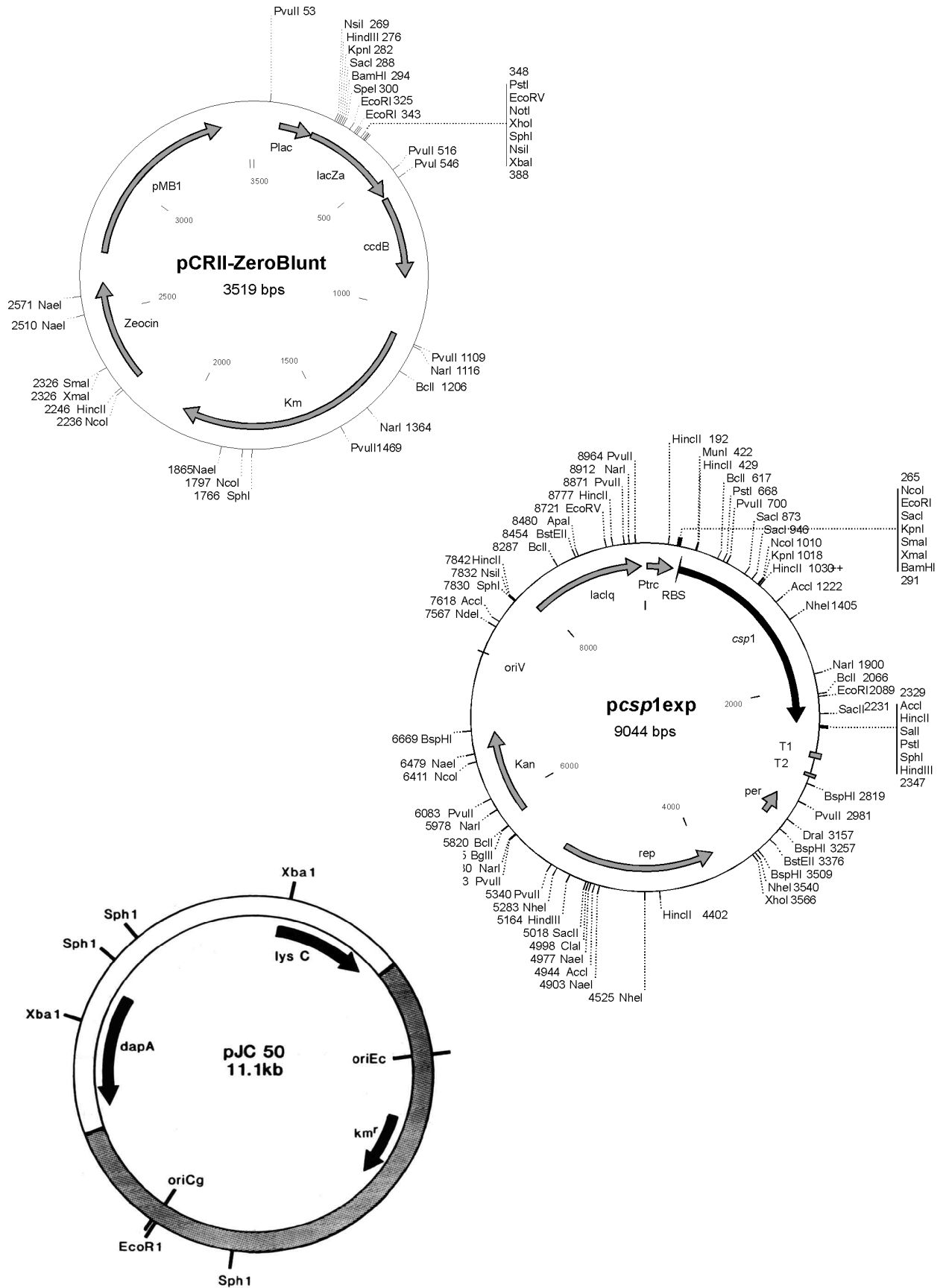


Abb.VII.5b: Karten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

6 MASCOT-Daten (2D-Gel)

| Nr. | orf | Hit | Masse (Da) | pI | mögliche Funktion | SP |
|-----|----------|------|------------|-------|---|------|
| 1 | 6a6_093 | 77 | 43824 | 4,69 | Elongations-Factor TU (EF-TU) | - |
| 2 | 3k6_054 | 33 | 19414 | 4,47 | Adenylat-Kinase | - |
| 3 | 5g19_007 | 54 | 12628 | 13,26 | Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment | +/- |
| 4 | 4i12_043 | 41 | 13659 | 5,94 | Pre-mRNA Splicing factor ATP dependent | - |
| 5 | 3f13_077 | 57 | 17247 | 12,00 | ? | - |
| 6 | 4i9_037 | 40 | 17825 | 4,12 | ? | - |
| 7 | 5f5_068 | 75 | 36029 | 4,94 | Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase | - |
| 8 | 1p3_025 | 53 | 34305 | 5,87 | ? | - |
| 9 | 4b11_031 | 53 | 13629 | 4,65 | Thioredoxin | - |
| 10 | 5b22_063 | 86 | 70630 | 4,6 | PS1 | + |
| 11 | 5b22_063 | 147 | 70630 | 4,6 | PS1 | + |
| 12 | 4i4_064 | 39 | 49709 | 4,49 | YOAR | - |
| 13 | 4m8_018 | 80 | 42616 | 4,52 | PS1B | + |
| 14 | 4m8_018 | 98 | 42616 | 4,52 | PS1B | + |
| 15 | 5b22_054 | 81 | 37163 | 5,2 | PS1C | + |
| 16 | 5b22_054 | 140 | 37163 | 5,2 | PS1C | + |
| 17 | 5f5_072 | 52 | 16121 | 10,56 | <i>Mycobacterium leprae</i> Fragment | - |
| 18 | 3d23_020 | 71 | 31598 | 5,25 | Rhs E | + |
| 19 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 20 | 2c4_067 | 49 | 16515 | 11,86 | ? | - |
| 21 | 5g19_057 | 55 | 79402 | 8,89 | NARH | - |
| 22 | 5c6_068 | 33 | 79175 | 6,06 | Hypothetisches Protein | +/- |
| 23 | 4i4_072 | 53 | 58903 | 4,57 | ? | - |
| 24 | 1m8_015 | 54 | 50245 | 4,73 | Thiamin Biosynthese Protein THIC | - |
| 25 | 1p11_003 | 54 | 50220 | 4,80 | Fumarate Hydratase | - |
| 26 | 3k10_070 | 56 | 59614 | 4,9 | putative Aldehyd Dehydrogenase | - |
| 27 | 1p11_066 | 80 | 44916 | 4,39 | 2-Phospho-Glycerat Enolase | - |
| 28 | 4c8_035 | 47 | 37810 | 5,25 | Hypothetisches Protein | - |
| 29 | 1g1_030 | 67 | 35871 | 4,87 | O-Acetyl-Cystein-Synthase | +/- |
| 30 | 3n13_008 | 55 | 29262 | 4,67 | Elongationsfactor TS | - |
| 31 | 5i15_064 | 67 | 24332 | 5,94 | Hypothetisches Protein | + |
| 32 | 3c5_013 | 54 | 16884 | 4,4 | putative Dehydronopterin Aldolase | - |
| 33 | 6a4_052 | 39 | 15393 | 4,28 | Hypothetisches Protein | - |
| 34 | 5i15_070 | 35 | 11,806 | 3,53 | Fragment auf <i>Streptomyces coelicolor</i> Cosmid | - |
| 35 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 36 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 37 | 2m19_061 | 53 | 63389 | 4,79 | Acyl CoenzymA Carboxylase | - |

Tab.VII.6.1: MASCOT-Daten der isolierten Spots des 2D-Gels des Zellhüllenproteinextraktes von *C. glutamicum* ATCC13032. ‚SP‘ gibt die mögliche Existenz eines Signalpeptides, ermittelt mit SignalP (+/- = Signalpeptid möglich, aber nicht sicher), wieder. n.b. = Bestimmung nicht möglich / ? = Proteinfunktion nicht bekannt.

| Nr. | orf | Hit | Masse | pl | Funktion | SP |
|-----|----------|------|-------|------|---|------|
| 1 | 1m15_100 | 61 | 40285 | 4.18 | Rpf2 | + |
| 2 | 4b11_034 | 47 | 22459 | 4.33 | Hypothetisches Protein | - |
| 3 | 5b22_048 | 65 | 35990 | 6.50 | putatives integrales Membranprotein | - |
| 4 | 5c4_054 | 92 | 40804 | 4.65 | Maltose bindendes Protein | + |
| 5 | 1m15_100 | 52 | 40285 | 4.18 | Rpf2 | + |
| 6 | 3k6_039 | 64 | 29476 | 5.16 | Antifreeze Glycoprotein AFGP | + |
| | 3k10_002 | 61 | 32956 | 4.54 | Hypothetisches Protein | + |
| 7 | 1p11_072 | 47 | 13211 | 3.34 | <i>Neurospora crassa</i> DNA linkage group II | + |
| 8 | 5b22_048 | 69 | 35972 | 6.50 | putatives integrales Membranprotein | - |
| 9 | 3d23_020 | 68 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 10 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 11 | 6a6_061 | 42 | 13289 | 4.32 | <i>M. bovis</i> RPLL Ribosomales Protein L7/L12. | +/- |
| 12 | 5l15_064 | 53 | 24340 | 5.94 | Lipoprotein NLPD (Fragment) | + |
| 13 | 3d23_020 | 87 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 14 | 6d13_083 | 80 | 36029 | 5.03 | Lipolytisches Enzym G-D-S | + |
| 15 | 3d23_020 | 83 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 16 | 4m8_018 | 185 | 41652 | 4.52 | PS1B | + |
| 17 | 3k6_039 | 78 | 29476 | 5.16 | Antifreeze Glycoprotein AFGP | + |
| 18 | 6a4_086 | 45 | 21083 | 4.13 | Hypothetisches Protein | +/- |
| 19 | 3k6_039 | 113 | 29476 | 5.16 | Antifreeze Glycoprotein AFGP | + |
| 20 | 1k10_001 | 78 | 57901 | 9.47 | Putative DNA-Helicase | - |
| | 5a8_085 | 73 | 71226 | 5.89 | <i>Streptomyces coelicolor</i> cosmid C57A / <i>D. radiodurans</i> R1 | - |
| 21 | 2c16_073 | 65 | 11370 | 4.88 | Trehalase | - |
| 22 | 5l15_064 | 49 | 24340 | 5.94 | Lipoprotein NLPD | + |
| 23 | 5k10_021 | 64 | 28225 | 4.81 | Chymotrypsin-Precursor | + |
| | 4n1_088 | 56 | 16062 | 4.07 | Arabinogalactan.Protein | - |
| 24 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 25 | 6d10_085 | 38 | 22506 | 4.14 | Uracil Phosphoribosyltransferase | - |
| 26 | 5i10_010 | 53 | 26348 | 4.78 | HmuO [<i>Corynebacterium diphtheriae</i>] | - |
| 27 | 5b22_063 | 84 | 70643 | 4.60 | PS1 | + |
| 28 | 5b22_063 | 137 | 70643 | 4.60 | PS1 | + |
| 29 | 5p3_072 | 49 | 38092 | 4.38 | putativ sekretiertes Protein (NLP / P60) | + |
| 30 | 5p3_072 | 75 | 38092 | 4.38 | putativ sekretiertes Protein (NLP / P60) | + |
| 31 | 3d23_020 | 134 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 32 | 3d23_020 | 51 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 33 | 4b06_006 | 81 | 23096 | 4.42 | Lipoprotein BLC der äußeren Membran | + |
| 34 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 35 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 36 | 3n13_012 | 32 | 30100 | 5.15 | 30S Ribosomales Protein S2 | - |
| 37 | 2e23_007 | 48 | 35193 | 4.51 | Myo-Inositol-Dehydrogenase | - |
| 38 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 39 | 3d23_020 | 40 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 40 | 2b21_069 | 59 | 20843 | 4.58 | Antifreeze Glycoprotein (AFGP) | + |
| 41 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 42 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 43 | 3d23_020 | 61 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |
| 44 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 45 | 4b06_006 | 55 | 23092 | 4.42 | Lipoprotein BLC der äußeren Membran | + |
| 46 | 1m15_069 | 48 | 53012 | 4.08 | PS1C | + |
| 47 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 48 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 49 | 5c6_022 | 30 | 43368 | 4.12 | putativ sekretiertes Protein | + |
| 50 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 51 | 1m15_100 | 40 | 40285 | 4.18 | Rpf2 | + |
| 52 | 2b21_061 | 35 | 33177 | 5.90 | <i>Corynebacterium glutamicum</i> urease operon | - |
| 53 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 54 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 55 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 56 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 57 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 58 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 59 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 60 | 5f5_039 | 78 | 69371 | 4.34 | Sequenz 333 von Patent WO0100805; Sequenz 20 von patent US 5726299. | - |
| | 297_001 | 70 | 48555 | 4.35 | putatives Membran Fusions Protein / putative aromatische Effluxpumpe | - |
| 61 | 5f5_039 | 69 | 69371 | 4.34 | Sequenz 333 von Patent WO0100805; Sequenz 20 von patent US 5726299. | - |
| | 297_001 | 62 | 48555 | 4.35 | putatives Membran Fusions Protein / putative aromatische Effluxpumpe | - |
| 62 | 2l3_046 | 48 | 23156 | 6.08 | ? | - |
| 63 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 64 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 65 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 66 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 67 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 68 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 69 | 3d23_020 | 072 | 31167 | 5.25 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein | + |

| | | | | | | |
|-----|----------------------|----------|----------------|---------------|---|--------|
| 70 | 3d23_020 4m8_058 | 78 63 | 31167 30824 | 5.25 7.69 | <i>E. coli</i> RhsE; Hemolysin-type Calcium bindendes Protein putative Glycosyltransferase | + |
| 71 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 72 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 73 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 74 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 75 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 76 | 4b06_022 | 62 | 34264 | 3.88 | Protein der äußeren Membran | + |
| 77 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 78 | 5bb22_065 | 51 | 10103 | 11.10 | PS1-(Fragment) | +/- |
| 79 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 80 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 81 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 82 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 83 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 84 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 85 | 5k12_033 | 81 | 31633 | 3.75 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 86 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 87 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 88 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 89 | 4n21_015 | 55 | 37179 | 3.72 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 90 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 91 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 92 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 93 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 94 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 95 | 4n21_015 | 48 | 37179 | 3.72 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 96 | 4n21_015 | 71 | 37179 | 3.72 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 97 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 98 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 99 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 100 | 2j6_014 Q66741 | 73 74 | 11615 3793 | 11.19 mag | Sequenz 649 von Patent WO0100844 Fragment eines Hüllproteins – <i>Equine anemia virus</i> | evtl |
| 101 | 6f24_082 | 41 | 25494 | 4.33 | Pyridoxal Phosphorylase | - |
| 102 | 2j6_014 Q66741 | 53 | 11615 3793 | 11.19 mag | Sequenz 649 von Patent WO0100844 Fragment eines Hüllproteins – <i>Equine anemia virus</i> | +/- |
| 103 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 104 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 105 | 3k6_039 | 48 | 29476 | 5.16 | Antifreeze Glycoproteine (AFGP) | + |
| 106 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 107 | 5k12_033 | 57 | 31633 | 3.75 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 108 | 5k12_033 | 39 | 31633 | 3.75 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 109 | 4c8_026 5g19_070 | 51 45 | 10820 48737 | 9.96 4.70 | Sequenz 54 von Patent WO0107624 Homoserin Dehydrogenase | - - |
| 110 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 111 | 2h12_002 5b22_054 | 60 44 | 19105 37180 | 12.81 5.20 | Homoserin O-Acetyltransferase PS1-Homolog 5b22 | - + |
| 112 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 113 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 114 | 5k12_033 | 45 | 31633 | 3.75 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 115 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 116 | 5k12_033 | 52 | 31633 | 3.75 | Glutamat bindendes Protein | + |
| 117 | 1m15_069 | 48 | 53012 | 4.08 | PS1-Homolog 1m15 | + |
| 118 | 4n21_015 | 49 | 37179 | 3.72 | ? | + |
| 119 | 4n21_015 | 49 | 37179 | 3.72 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 120 | 4n21_015 | 52 | 37179 | 3.72 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 121 | 3k6_039 | 50 | 29476 | 5.16 | Antifreeze Glycoproteine (AFGP) | + |
| 122 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 123 | 4n21_015 | 43 | 37179 | 3.72 | Eisen Anguibactin-bindendes Protein | + |
| 124 | 6f24_082 1p11_040 | 36 33 | 25494 33032 | 4.33 4.72 | Pyridoxal Phosphorylase | - |
| 125 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 126 | 3k6_039 | 36 | 29464 | 5.16 | Antifreeze Glycoprotein (AFGP) | + |
| 127 | 3a19_041 | 55 | 29435 | 9.53 | Sequence 463 from Patent WO0100844 | - |
| 128 | 2k5_045 | 54 | 15134 | 6.13 | Virulenz assoziiertes Protein | - |
| 129 | 2k6_045 | 52 | 15134 | 6.13 | Virulenz assoziiertes Protein | - |
| 130 | 1i02_015 | 52 | 18974 | 4.26 | ? | - |
| 131 | 1g1_006 | 47 | 30695 | 4.41 | putativer ABC-Transporter | - |
| 132 | 5f5_068 | 63 | 36023 | 4.94 | Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase | - |

Tab.VII.6.2: MASCOT-Daten der isolierten Spots des 2D-Gels des aufkonzentrierten Überstandes von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. ‚SP‘ gibt die mögliche Existenz eines Signalpeptides, ermittelt mit SignalP, wieder (+/- = Signapeptid möglich, aber nicht sicher). n.b. = Bestimmung nicht möglich ? = Proteinfunktion nicht bekannt.

7 Lysinproduktion

Sämtliche Aminosäureproduktionsmessungen wurden bei der Degussa AG (Halle-Künsebeck) durchgeführt.

| Stamm (Plasmid) | Lysin [g/l] | | Lysin [g/g] | |
|-------------------------------------|-------------|--------|-------------|-------|
| | 48 h | 72 h | 48 h | 72 h |
| WT (pJC1) | 0,060 | 0,055 | 0,001 | 0,001 |
| $\Delta csp1$ (pJC1) | 0,043 | 0,031 | 0,001 | 0,001 |
| $\Delta csp2$ (pJC1) | 0,063 | 0,059 | 0,001 | 0,001 |
| $\Delta csp1_{\Delta csp2}$ (pJC1) | 0,025 | 0,040 | 0,000 | 0,001 |
| WT (pJC50) | 10,796 | 10,507 | 0,202 | 0,196 |
| $\Delta csp1$ (pJC50) | 10,154 | 10,788 | 0,190 | 0,201 |
| $\Delta csp2$ (pJC50) | 10,156 | 11,253 | 0,190 | 0,210 |
| $\Delta csp1_{\Delta csp2}$ (pJC50) | 9,285 | 10,749 | 0,180 | 0,201 |

Tab.VII.7: Daten der Lysinproduktionsmessung verschiedener *C. glutamicum* *csp*-Mutanten. Die Basislysinproduktion wurde durch das Plasmid pJC50 erreicht (Cremer *et al.*, 1991), als Kontrolle diente der Leervektor pJC1.

8 Bestimmung der Mycolsäurezusammensetzung

| Stamm | C32:1 | C32:0 | C34:1 | C34:0 | C36:2 | C36:1 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| RES167 | 6,46 | 44,16 | 26,05 | 7,02 | 7,08 | 2,04 |
| $\Delta csp1$ | 6,25 | 45,05 | 26,37 | 7,21 | 7,29 | 2,02 |
| $\Delta csp2$ | 5,72 | 40,35 | 38,86 | 7,30 | 12,82 | 3,27 |
| <i>csp3int</i> | 2,97 | 45,87 | 30,32 | 10,05 | 8,17 | 2,34 |
| $\Delta csp4$ | 6,03 | 40,07 | 32,75 | 6,69 | 9,52 | 2,41 |
| $\Delta csp6$ | 3,41 | 50,93 | 30,97 | 11,40 | 8,94 | 3,38 |
| $\Delta csp7$ | 5,79 | 39,13 | 32,97 | 6,69 | 9,52 | 2,41 |
| $\Delta csp8$ | 5,72 | 38,78 | 33,42 | 6,83 | 10,26 | 2,63 |

Tab.IV.8: Mycolsäurezusammensetzung von *Corynebacterium glutamicum* WT (RES167) verschiedener *csp*-Einfachmutanten. Die Analyse erfolgte durch Hochtemperatur-Gaschromatographie bei der DSMZ.

9 MIC-Test

C. glutamicum ATCC13032 (Res167)

| Endkonzentration Ethambutol [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] | o.D. | | o.D. | o.D. (%) |
|--|--------------|--------------|------------|----------|
| | 1. Messreihe | 2. Messreihe | Mittelwert | |
| 0,000 | | | 0,609 | 100 |
| 0,125 | 0,566 | 0,544 | 0,555 | 91,13 |
| 0,250 | 0,449 | 0,442 | 0,446 | 73,23 |
| 0,500 | 0,358 | 0,344 | 0,351 | 57,74 |

| | | | | |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| 1,000 | 0,243 | 0,251 | 0,247 | 40,56 |
| 2,000 | 0,128 | 0,130 | 0,129 | 21,18 |
| 4,000 | 0,036 | 0,059 | 0,048 | 7,80 |
| 8,000 | 0,029 | 0,028 | 0,029 | 4,76 |
| 16,000 | 0,022 | 0,033 | 0,028 | 4,52 |
| 32,000 | 0,025 | 0,023 | 0,024 | 3,94 |
| 64,000 | 0,022 | 0,026 | 0,024 | 3,94 |

*C. glutamicum*_{Δcsp1}

| Endkonzentration Ethambutol [µg/µl] | o.D. | | o.D. Mittelwert | o.D. (%) |
|--|--------------|--------------|--------------------|----------|
| | 1. Messreihe | 2. Messreihe | | |
| 0,000 | | | 0,472 | 100 |
| 0,125 | 0,302 | 0,299 | 0,301 | 70,37 |
| 0,250 | 0,215 | 0,232 | 0,224 | 52,34 |
| 0,500 | 0,027 | 0,028 | 0,028 | 6,44 |
| 1,000 | 0,009 | 0,007 | 0,008 | 1,87 |
| 2,000 | 0,005 | 0,006 | 0,006 | 1,41 |
| 4,000 | 0,006 | 0,007 | 0,007 | 1,64 |
| 8,000 | 0,005 | 0,007 | 0,006 | 1,41 |
| 16,000 | 0,005 | 0,006 | 0,006 | 1,41 |
| 32,000 | 0,003 | 0,008 | 0,006 | 1,41 |
| 64,000 | 0,003 | 0,004 | 0,004 | 0,94 |

*C. glutamicum*_{Δcsp2}

| Endkonzentration Ethambutol [µg/µl] | o.D. | | o.D. Mittelwert | o.D. (%) |
|--|--------------|--------------|--------------------|----------|
| | 1. Messreihe | 2. Messreihe | | |
| 0,000 | | | 0,289 | 100 |
| 0,125 | 0,224 | 0,177 | 0,201 | 69,38 |
| 0,250 | 0,201 | 0,213 | 0,207 | 71,63 |
| 0,500 | 0,169 | 0,140 | 0,155 | 53,46 |
| 1,000 | 0,015 | 0,024 | 0,020 | 6,75 |
| 2,000 | 0,016 | 0,018 | 0,017 | 5,88 |
| 4,000 | 0,015 | 0,016 | 0,016 | 5,54 |
| 8,000 | 0,019 | 0,014 | 0,017 | 5,88 |
| 16,000 | 0,013 | 0,014 | 0,014 | 4,84 |
| 32,000 | 0,010 | 0,012 | 0,011 | 3,81 |
| 64,000 | 0,012 | 0,015 | 0,014 | 4,84 |

*C. glutamicum*_{csp3int}:

| Endkonzentration Ethambutol [µg/µl] | o.D. | | o.D. Mittelwert | o.D. (%) |
|--|--------------|--------------|--------------------|----------|
| | 1. Messreihe | 2. Messreihe | | |
| 0,000 | | | 0,555 | 100 |
| 0,125 | 0,508 | 0,436 | 0,472 | 85,05 |
| 0,250 | 0,393 | 0,368 | 0,381 | 68,56 |
| 0,500 | 0,330 | 0,324 | 0,327 | 58,92 |
| 1,000 | 0,203 | 0,227 | 0,217 | 38,74 |
| 2,000 | 0,072 | 0,072 | 0,072 | 12,97 |
| 4,000 | 0,037 | 0,033 | 0,035 | 6,31 |
| 8,000 | 0,029 | 0,023 | 0,026 | 4,68 |
| 16,000 | 0,023 | 0,031 | 0,027 | 4,86 |
| 32,000 | 0,022 | 0,021 | 0,022 | 3,87 |
| 64,000 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 3,06 |

*C. glutamicum*_Δ*csp1-csp1exp*

| Endkonzentration Ethambutol [µg/µl] | o.D. | | o.D. | o.D. (%) |
|--|--------------|--------------|------------|----------|
| | 1. Messreihe | 2. Messreihe | Mittelwert | |
| 0,000 | | | 0,568 | 100 |
| 0,125 | 0,539 | 0,545 | 0,542 | 95,42 |
| 0,250 | 0,400 | 0,390 | 0,395 | 69,54 |
| 0,500 | 0,322 | 0,305 | 0,314 | 55,19 |
| 1,000 | 0,173 | 0,124 | 0,149 | 26,14 |
| 2,000 | 0,057 | 0,062 | 0,060 | 10,48 |
| 4,000 | 0,026 | 0,032 | 0,029 | 5,11 |
| 8,000 | 0,031 | 0,024 | 0,028 | 4,84 |
| 16,000 | 0,021 | 0,024 | 0,023 | 3,96 |
| 32,000 | 0,026 | 0,025 | 0,026 | 4,58 |
| 64,000 | 0,026 | 0,021 | 0,024 | 4,14 |

Tab.VII.9: Daten der Ermittlung der minimal inhibierenden Konzentration (MIC) von Ethambutol für verschiedene *Corynebacterium glutamicum* *csp*-Mutanten und den mit *csp1exp* komplementierten Δ*csp1*-Stamm. Rote Zahlen weisen auf nicht mehr vorhandenes Wachstum hin.

10 Abkürzungen und Symbole

| | | |
|----------------|---|---|
| 1D | - | Eindimensional |
| 2D | - | Zweidimensional |
| A | - | Ampere |
| AB | - | Antibiotikum |
| Abb. | - | Abbildung |
| AEC | - | S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein |
| ATCC | - | American Type Cultur Collection |
| BHIS | - | Brain-Heart-Infusion (+ Sorbitol) |
| bp | - | Basenpaare |
| BPB | - | Bromphenolblau-Ladungspuffer |
| BSA | - | Rinderserumalbumin |
| bzw. | - | beziehungsweise |
| C. | - | <i>Corynebacterium</i> |
| C.g. | - | <i>Corynebacterium glutamicum</i> |
| c ₋ | - | Zenti (10 ⁻²) |
| d | - | Tag |
| Da | - | Dalton (1 Da = 1,6605402 * 10 ⁻²⁴ g) |
| DAB | - | Diaminobenzoat |
| DC | - | Dünnschichtchromatographie |
| DTT | - | Dithiothreitol |
| CSPD | - | 3-(4-methoxy Spiro(1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3,3,1, ^{13,7}]decan)-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz |
| <i>E. coli</i> | - | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | - | Ethylendiamin-Tetraessigsäure |
| EtBr | - | Ethidiumbromid |
| Eppi | - | Eppendorfgefäß |
| EtOH | - | Ethanol |
| exp. | - | Expression (-smutante) |
| G | - | Glucose |
| g | - | Gramm |

| | | |
|----------------|---|---|
| ggf. | - | gegebenenfalls |
| h | - | Stunde |
| HPTLC | - | <i>high-performance-thin-layer-chromatographie</i> |
| IEF | - | Isoelektrische Fokussierung |
| int | - | Integration (-smutante) |
| IPTG | - | Isopropylgalactosid |
| k | - | Kilo (10^3) |
| kD | - | Kilodalton |
| kb | - | Kilobasenpaare |
| l | - | Liter |
| LB | - | Luria-Bertani Broth |
| M. | - | <i>Mycobacterium</i> |
| M | - | molar |
| M _μ | - | Mega (10^6) |
| m | - | Meter |
| m _l | - | Milli (10^{-3}) |
| MIC | - | <i>minimal inhibitory concentration</i> (Test zur Bestimmung der AB-Sensitivität) |
| min | - | Minuten |
| MM1 | - | Minimalmedium1 |
| μ _l | - | Mikro (10^{-6}) |
| n _l | - | Nano (10^{-9}) |
| N | - | Normalität |
| NBT | - | Nitroblau-Tetrazoliumsazl |
| nt | - | Nukleotide |
| <i>orf</i> | - | <i>open reading frame</i> (offenes Leseraster) |
| o.D. | - | optische Dichte |
| PAGE | - | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pI | - | Isoelektrischer Punkt |
| rpm | - | Umdrehungen pro Minute |
| r | - | resistent |
| RT | - | Raumtemperatur |
| SDS | - | Natrium-Dodecylsulfat |
| sec | - | Sekunde |
| SP | - | Signalpeptid |
| Std. | - | Stunde |
| Tab. | - | Tabelle |
| TLC | - | <i>thin-layer-chromatographie</i> = DC |
| T _m | - | Schmelztemperatur |
| U | - | Unit (Enzymeinheit) |
| u.a. | - | unter anderem |
| ü/n | - | über Nacht |
| UV | - | ultraviolettes Licht |
| V | - | Volt |
| vgl. | - | vergleiche |
| v/v | - | Volumenanteil |
| W | - | Watt |
| w/v | - | Mengeanteil (g) pro Volumen (ml) |
| X-Gal | - | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid |
| X-Phosphat | - | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat |
| z.B. | - | zum Beispiel |
| Δ | - | Deletion (-smutante) |
| ∅ | - | Durchmesser |
| ∞ | - | unendlich |
| Ω | - | Ohm (Einheit für elektrischen Widerstand) |

Danksagung

Herrn Professor Dr. Alfred Pühler danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die wissenschaftliche Betreuung. Herrn Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und dafür, daß er mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei der gesamten Corynebakterien-Gruppe für das äußerst angenehme Arbeitsklima. Hervorzuheben sind Dr. Andreas Tauch, der immer für die Beantwortung von Fragen zur Verfügung stand und Nicole Bischoff für die Hilfe bei der Durchführung der MIC-Test. Gleicher Dank gebührt Dr. Nicole Dusch und Marc-Oliver Luther für ihre Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der 2D-Gele und die sehr gute Einweisung in die MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Desweiteren bin ich natürlich Daniel Rey und Christian Rückert, mit denen ich die Höhen und Tiefen des Laboralltags durchlebt habe, zu Dank verpflichtet. Nicht vergessen darf ich Olaf Brockmann-Gretza, der schon seit Beginn unseres Studiums den gleichen Weg wie ich bestreitet. Weiterhin bedanke ich mich bei Nicole Hansmeier, Patrizia Wonderschütz und Dietrich Deutenberg, die mir im Rahmen eines Praktikums bei der Durchführung einiger Experimente geholfen haben.

Zu besonderem Dank bin ich Dr. Karsten Niehaus von der Arbeitsgruppe Phytopathologie verpflichtet. Ohne seine Unterstützung hätten die Arbeiten für den Funktionsnachweis der Proteine niemals in so kurzer Zeit durchgeführt werden können. Auch bei Dr. Dieter Kapp und Heiko Scheidle bedanke ich mich für ihre Hilfe.

Bei Dr. Brigitte Bathe bedanke ich mich für die Unterstützung, die sie mir seitens der Degussa AG hat zukommen lassen. Ebenso für die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit.

Dr. Lothar Eggeling vom Forschungszentrum Jülich danke ich für interessante Anregungen und die Zusendung des Plasmides pJC50.

Bei Herrn Professor Dr. R. Eichenlaub bedanke ich mich für die Betreuung des Graduiertenkollegs, dessen Mitglied ich war.

Ein besonderer Dank geht an meine Schwiegerfamilie Gedamke, die immer sehr großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat.

Herrn U. Mariotte danke ich für die vielen aufmunternden Gespräche in „le Stick's“ Tequi-Bar.

Mein größter Dank aber gilt meine Frau Sabine, dafür, daß sie der wichtigste Teil meines Lebens ist.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur ganz oder annähernd entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Diese Dissertation wurde von Prof. Dr. Alfred Pühler (Inhaber des Lehrstuhls für Genetik an der Universität Bielefeld) betreut.

Bielefeld, den 5. Juni 2001
