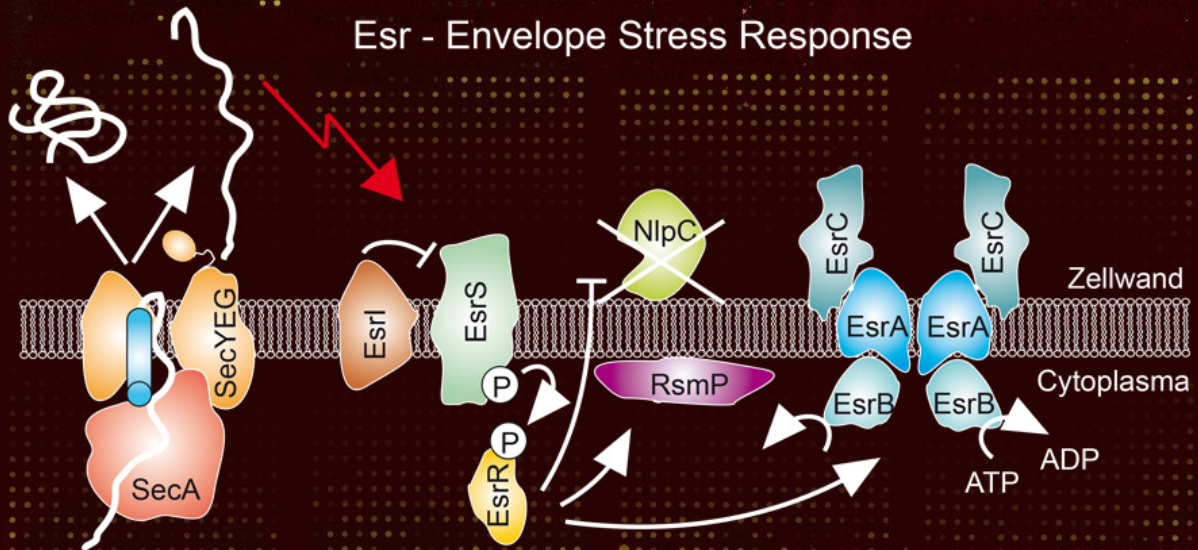


Esr - Envelope Stress Response



Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

Ava Rebecca Chattopadhyay

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

Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

Ava Rebecca Chattopadhyay

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 62

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-845-7

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

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2013

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 62

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2012)

ISSN 1866-1785

ISBN: 978-3-89336-845-7

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

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

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Summary	3
III. Einleitung	5
1 Biotechnologische Herstellung rekombinanter Proteine	5
1.1 Die sekretorische Produktion rekombinanter Proteine	6
2 <i>Corynebacterium glutamicum</i> als Wirtsorganismus zur Herstellung rekombinanter Proteine	9
3 Stressantworten in Mikroorganismen aufgrund von Proteinexpression und -sekretion	12
3.1 Die Überexpression von Proteinen kann zur Induktion der Hitzeschockantwort führen	13
3.2 Schutz durch die extracytoplasmatische Protease HtrA	14
3.3 Schutz der Zellhülle durch den Sigmafaktor σ^E	15
3.4 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem CpxAR	16
3.5 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem CssRS	17
3.6 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem BaeSR	18
3.7 Schutz der Zellhülle durch das „Phage Shock“ Protein (Psp)-System	18
3.8 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem LiaSR	19
4 Die biotechnologische Nutzung von Zellhüllenschutzsystemen	20
4.1 Die Nutzung des Wissens über das Psp-System	20
4.2 Die Nutzung des Wissens über das CssRS-System	20
5 Genomweite Transkriptionsanalysen zur Definition von Zellhüllenstress- antworten als Reaktion auf die Überexpression und Sekretion von Proteinen	21
6 Mögliche Engpässe bei der Expression und Sekretion heterologer Proteine in <i>C. glutamicum</i>	22

II

7	Ziel der Arbeit	23
IV.	Material und Methoden	25
1	Chemikalien und Enzyme	25
2	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	25
2.1	Bakterienstämme	25
2.2	Plasmide	26
2.3	Oligonukleotide	27
3	Mikrobiologische Methoden	30
3.1	Nährmedien.....	30
3.2	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	31
4	Molekularbiologische Methoden	34
4.1	DNA-Isolierung	34
4.2	DNA- / RNA-Konzentrationsbestimmung	34
4.3	Agarosegelelektrophorese	34
4.4	Aufreinigung von DNA.....	35
4.5	Amplifikation von DNA per PCR (Polymerasekettenreaktion)	35
4.6	Restriktion von DNA	36
4.7	Dephosphorylierung von DNA.....	36
4.8	Ligation von DNA	36
4.9	Klonierungen	36
4.10	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	38
4.11	Sequenzierung von DNA	40
4.12	Konstruktion von Deletionsmutanten in <i>C. glutamicum</i> (Schäfer <i>et al.</i> , 1994), modifiziert	40
5	Genomweite Transkriptionsanalysen mit Hilfe von DNA-Microarrays	41
5.1	Isolierung von RNA	41

5.2	Analyse der isolierten RNA mit Hilfe von denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel	41
5.3	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA.....	42
5.4	Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA auf DNA-Microarrays ...	43
5.5	Auslesen der DNA-Microarrays.....	44
5.6	Auswertung der DNA-Microarray-Daten.....	44
6	Biochemische Methoden	44
6.1	Analyse von Proteinexpression und –sekretion in <i>C. glutamicum</i>	44
6.2	Western Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979), modifiziert.....	46
6.3	Herstellung von löslichem Rohextrakt mit <i>E. coli</i>	47
6.4	Aufreinigung von Proteinen mit Hexahistidintag mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose.....	48
6.5	Umpufferung von gereinigtem Protein per PD-10 Säule	49
6.6	Thrombin-Verdau	49
6.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	49
6.8	Gelretardationsexperimente	49
6.9	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
7	Bioinformatische Methoden	50
7.1	Die DNA-Motivsuche mit MEME (Bailey & Elkan, 1994).....	50
V.	Ergebnisse	51
1	Untersuchung des Transkriptoms von <i>C. glutamicum</i> bei Expression und Tat-abhängiger Sekretion heterologer Proteine.....	51
1.1	GFP als Modellprotein.....	53
1.2	MalE als Modellprotein	76
1.3	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 Δ TatAC als Simulation einer ausgelasteten Tat-Translokase	77
1.4	Fazit der Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf die Tat-abhängige Translokation von Proteinen in <i>C. glutamicum</i>	85

IV

2	Untersuchung ausgewählter Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion heterologer Proteine	86
2.1	<i>htrA</i> (<i>cg0998</i>) liegt in <i>C. glutamicum</i> in der gleichen Anordnung wie in <i>M. tuberculosis</i> hinter einem Zweikomponentensystem	87
2.2	Transkriptionelle Regulation von Genen, die für Proteine mit PspC- („Phage Shock“ Protein C) oder PspA-Domäne kodieren, als Reaktion auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion eines heterologen Proteins in <i>C. glutamicum</i>	101
VI.	Diskussion	125
1.1	Die Expression des signalpeptidlosen GFP induziert die SOS-Antwort .	125
1.2	Die Expression sowie die Sekretion von Cg0955-GFP führt zur Repression von Genen, die in die Kupferhomöostase involviert sind – und teilweise Tat-abhängig transloziert werden	127
1.3	Die Expression und Sekretion von PhoD ^{Bs} -GFP führt zur Induktion von Genen für Chaperone in <i>C. glutamicum</i>	129
1.4	Auch nach längerer Expression und Sekretion von PhoD ^{Bs} -GFP erfolgen keine spezifischen Reaktionen auf die Sekretion des heterologen Proteins....	131
1.5	<i>C. glutamicum</i> zeigt auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion des Modellproteins TorA-MalE keine Reaktionen auf transkriptioneller Ebene	132
1.6	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 Δ TatAC als Simulation vollständiger Auslastung der Tat-Translokase zeigt transkriptionelle Reaktionen	133
1.7	Fazit zur Expression und Tat-abhängigen Sekretion von heterologen Proteinen in <i>C. glutamicum</i>	137
2	Hinweise auf eine Beteiligung der Zweikomponentensysteme CgtRS2 und CgtSR7 am Schutz der Zellhülle	139
2.1	Das Zweikomponentensystem CgtRS2.....	139
2.2	Das Zweikomponentensystem CgtSR7.....	147
VII.	Literatur	155

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AmyE	Amylase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion – Sorbitol
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CM	Innere Membran / Cytoplasmamembran
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Farad
FA	Formaldehyd
<i>g</i>	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
IgG	Immunglobulin G
IM	Innere Membran / Cytoplasmamembran
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobasenpaar(e)
Km ^R	Kanamycinresistenz
l	Liter
LB	Luria Bertani
LV	Leervektor

VI

m	milli (10^{-3}) oder Meter
M	molar (mol/l)
MalE	Maltose-Bindeprotein
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
MOM	mycobakterielle äußere Membran
MOPS	3- <i>N</i> -Morpholinopropansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OM	äußere Membran („outer membrane“)
PCR	“Polymerase chain reaction” (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PhoD	Phosphodiesterase
RBS	Ribosomenbindestelle
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sp ^R	Spectinomycinresistenz
TAE	Tris-Acetat-ETDA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TNI	Tris-NaCl-Imidazol
TorA	TMAO-Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol- <i>tert</i> -octylphenylether
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
Z	Zellfraktion
μ	mikro (10^{-6})
Ω	Ohm

Einbuchstabencode der Aminosäuren:

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutaminsäure	E	Serin	S
Glutamin	Q	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

I. Zusammenfassung

Die biotechnologische Produktion von heterologen Proteinen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Hierbei ist eine sekretorische Produktionsvariante von erheblichem Vorteil, da diese Kosten und Zeit im Aufarbeitungsprozess spart. *Corynebacterium glutamicum* ist ein vielversprechender Wirtsorganismus sowohl für die Sec- als auch für die Tat-abhängige sekretorische Proteinproduktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen die transkriptionellen Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Tat-abhängige Sekretion von Modellproteinen untersucht, um im Idealfall Engpässe bei dieser Produktionsstrategie zu identifizieren. Zum anderen wurden die Zweikomponentensysteme CgtRS2 und CgtSR7 von *C. glutamicum* untersucht, da es Hinweise darauf gab, dass diese Systeme an der Regulation von transkriptionellen Reaktionen beteiligt sein könnten, die durch die Sec-abhängige Sekretion von Proteinen induziert werden. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- i. Anhand der Untersuchung verschiedener Tat-Signalpeptid-Protein-Varianten konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene kaum Tat-sekretionsspezifische Reaktionen zeigt. Nur auf die Sekretion einer einzigen Tat-Signalpeptid-Protein-Variante erfolgte die Repression zweier Gene für putative Tat-Substrate. Dies deutet auf eine annähernd ausgelastete Tat-Translokase bei Sekretion dieser Variante hin. Bei den vier weiteren untersuchten Tat-Signalpeptid-Protein-Varianten wurden keine Tat-sekretionsspezifischen Reaktionen beobachtet.
- ii. Eine *C. glutamicum* *tatAC* Deletionsmutante, die als Simulation einer vollständig ausgelasteten Tat-Translokase untersucht wurde, zeigte hingegen verschiedene transkriptionelle Unterschiede im Vergleich zur *C. glutamicum* *qcrA* Deletionsmutante, der das wichtigste Tat-Substrat QcrA und somit der funktionale *bc₁aa₃*-Superkomplex fehlt. Neben dem Fehlen des Superkomplexes führt das Fehlen einer funktionellen Tat-Translokase zu oxidativem Stress und leichtem Kupferstress in der Zelle. Da die Simulation einer vollständig ausgelasteten Tat-Translokase im Gegensatz zur Sekretion aller untersuchten Tat-Signalpeptid-Protein-Varianten zu oxidativem Stress führte, scheint das Ausmaß von Expression und Sekretion der Tat-Signalpeptid-Protein-Varianten nicht so hoch gewesen zu sein, dass eine vollständige Auslastung der Tat-Translokase auftrat. Dies deutet darauf hin, dass sehr wahrscheinlich noch signifikant größere Mengen als die in dieser Arbeit erzielten Mengen an heterologen Proteinen in *C. glutamicum* exprimiert und

Tat-abhängig sekretiert werden können bevor eine vollständige Auslastung der Tat-Translokase auftritt.

iii. Der Antwortregulator des Zweikomponentensystem CgtRS2 bindet an den Upstreambereich von *htrA*, das Gen für eine extracytoplasmatische, am Abbau von falsch gefalteten Proteinen auf der *trans*-Seite der Cytoplasmamembran beteiligte Protease, das als Reaktion auf Sec-abhängige Proteinsekretion hochreguliert wird. Sehr wahrscheinlich ist dieses Zweikomponentensystem somit an der Regulation der *htrA* Genexpression beteiligt.

iv. Das Zweikomponentensystem EsrSR (ehemals CgtSR7) ist positiv autoreguliert und dient dem Schutz der Zellhülle. In aktivierter Form reprimiert es das Gen für die Zellwandpeptidase NlpC. Außerdem aktiviert es die Gene für einen ABC-Transporter, der zur Antibiotika-Toleranz beiträgt, für RsmP, das die Zellform und -hülle stabilisiert, und für cytoplasmatische Chaperone. Mit Hilfe der identifizierten Zielgene konnte ein Konsensus-Bindemotiv für EsrR definiert werden. Aufgrund der Induzierbarkeit des EsrSR Systems durch Sec-abhängig sekretierte Proteine kann das erweiterte Wissen über das EsrSR-System und seine Zielgene nun als ein neuer und vielversprechender Ausgangspunkt für die gezielte Optimierung der Gewinnung von heterologen Proteinen über den Sec-Weg von *C. glutamicum* dienen.

II. Summary

The impact of biotechnological production of heterologous proteins is steadily increasing. Herein secretory protein production is advantageous since it saves both time and money during downstream processing. *Corynebacterium glutamicum* is a promising host organism for Sec- as well as Tat-dependent secretory protein production. In this work on the one hand the transcriptional response to Tat-dependent secretion of model proteins in *C. glutamicum* was analysed to ideally identify bottlenecks within this production strategy. On the other hand the two-component systems CgtRS2 and CgtSR7 of *C. glutamicum* were studied as there was evidence of involvement of these systems in regulation of transcriptional responses induced by Sec-dependent protein secretion. The following results were obtained.

- i. Studying several variants of fusion proteins containing different Tat signal peptides *C. glutamicum* did hardly show any response to Tat-dependent secretion on the transcriptional level. Only upon secretion of one single variant of a model protein in combination with a Tat signal peptide there was repression of two genes encoding putative Tat substrates. This indicates a Tat translocase nearly at full-capacity during secretion of this variant. The examination of four further variants of fusion proteins containing Tat signal peptides did not result in transcriptional responses to Tat-dependent secretion.
- ii. However, a *C. glutamicum* *tatAC* deletion mutant examined to simulate a Tat translocase completely used to capacity showed several transcriptional differences in comparison to a *C. glutamicum* *qcrA* deletion mutant which is deficient of the most important Tat substrate contributing to functionality of the *bc₁aa₃* supercomplex. Besides deficiency of the more effective respiration branch, lack of the functional Tat translocase caused oxidative stress and slight copper stress in the cell. Since the simulation of a Tat translocase at maximum capacity caused oxidative stress in contrast to secretion of all studied variants of fusion proteins containing Tat signal peptides, the dimension of expression and secretion of the variants of fusion proteins seems not to be sufficiently high to use the Tat translocase's full capacity. This indicates the possibility to express and secrete significantly higher amounts of heterologous protein in *C. glutamicum* compared to the amounts achieved in this work before complete capacity utilisation of the Tat translocase occurs.

iii. The response regulator of the CgtRS2 two-component system binds the upstream region of *htrA* encoding an extracytoplasmic protease degrading misfolded proteins on the *trans* side of the cytoplasmic membrane which was found to be upregulated in response to Sec-dependent protein secretion. Therefore with high probability this two component system is involved in regulation of gene expression of *htrA*.

iv. The two-component system EsrSR (formerly CgtSR7) is positively autoregulated and contributes to protection of the cell envelope. In it's activated state it represses the gene encoding the cell wall peptidase NlpC. Moreover it activates the genes encoding an ABC-transporter contributing to resistance to antibiotics, the gene for RsmP which stabilises the shape and the envelope of the cell and genes encoding cytoplasmic chaperones. By use of the identified target genes the consensus binding motif of EsrR was defined. Due to the inducibility of EsrSR by Sec-dependently secreted proteins the enlarged knowledge of the two component system EsrSR and it's target genes provides a new and promising starting point to directedly optimise Sec-dependent heterologous protein production in *C. glutamicum*.

III. Einleitung

1 Biotechnologische Herstellung rekombinanter Proteine

Die biotechnologische Herstellung rekombinanter Proteine gewinnt immer mehr an Bedeutung (Waegeman & Soetaert, 2011, Mattanovich *et al.*, 2012). So werden biotechnologisch hergestellte Enzyme zum Beispiel in der Nahrungsmittel-, Leder- oder Textilindustrie, als Futtermittelzusatz, in Spül- und Waschmitteln oder in Kosmetika eingesetzt (Kirk *et al.*, 2002). Einen Überblick über industriell genutzte Enzyme gibt die Liste der „Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products“ (amfep, Vereinigung der Hersteller und Entwickler von Darreichungsformen von Enzymprodukten) aus dem Jahr 2009 mit über 60 verschiedenen Enzymen (amfep, 2009). Den größten Marktanteil an rekombinanten Proteinen besitzt jedoch die pharmazeutische Industrie. Hier stieg die Zahl der von FDA (Food and Drug Administration) und EMEA (European Medicines Agency) zugelassenen rekombinanten Therapeutika seit der Zulassung des rekombinanten Proteins Insulin durch die amerikanische FDA 1982 bis zum Jahr 2009 auf über 150 an (Ferrer-Miralles *et al.*, 2009). In Deutschland stieg der Umsatz entsprechender Biotechnologie-Unternehmen im Jahr 2011 im Vergleich zum Jahr 2010 um etwa 10% auf über 2,6 Milliarden Euro (BMBF, 2012). Insgesamt wird der Weltmarkt für Biopharmazeutika auf ungefähr 70-80 Milliarden U.S. Dollar (Walsh, 2010) und für industrielle Enzyme auf circa 2,5 Milliarden U.S. Dollar (Demain & Vaishnav, 2009) geschätzt.

Bei der Herstellung von Proteinen und Peptiden ist die Wahl eines geeigneten Wirtssystems die Voraussetzung für eine erfolgreiche Produktion. Grundsätzlich können Bakterien, Hefen, filamentöse Pilze oder Säugerzellen als Wirtssystem dienen. Das ideale Wirtssystem sollte in einem preisgünstigen Medium schnell wachsen können, einfach genetisch zu modifizieren sein, eine hohe Ausbeute an rekombinantem Protein liefern und – falls für die Funktionalität des gewünschten Proteins erforderlich – in der Lage sein, wichtige posttranslationale Modifikationen wie Disulfidbrücken oder Glykosylierungen einzuführen. Darüber hinaus sollte die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins so einfach und somit so preisgünstig wie möglich sein (Waegeman & Soetaert, 2011). Wenn für die Funktionalität des gewünschten Proteins keine Glykosylierung notwendig ist, fällt die Wahl des Wirtssystems aufgrund schneller und preisgünstiger Kultivierung sowie

hoher Proteinausbeuten zumeist auf ein bakterielles Wirtssystem. Um das rekombinante Protein nicht aus der Masse der wirtseigenen Proteine aufzureinigen zu müssen, kann es durch Fusion an ein Signalpeptid in Gram-negativen Bakterien ins Periplasma und in Gram-positiven Bakterien direkt in den Kulturüberstand transloziert werden. Dies erleichtert die folgende Aufreinigung des gewünschten Proteins erheblich und spart somit Kosten sowie Zeit im Produktionsprozess.

1.1 Die sekretorische Produktion rekombinanter Proteine

In Bakterien gibt es zwei hauptsächlich genutzte Transport-Wege, um Proteine über die Cytoplasmamembran zu translokieren (Abbildung 1) (Natale *et al.*, 2008). Die Translokation eines Proteins über den Sec-Weg (general secretion pathway) erfolgt stets in ungefaltetem Zustand (Oxender *et al.*, 1980, du Plessis *et al.*, 2011). Demgegenüber werden Proteine, die über den Tat-Weg (twin arginine translocation) transloziert werden, in einer vollständig gefalteten Konformation transloziert (Creighton *et al.*, 1995, Hou & Brüser, 2011). Um über einen dieser Wege transloziert zu werden, müssen die Proteine ein N-terminales Signalpeptid für den jeweiligen Transportweg besitzen, das über eine positiv geladene N-Region, eine zentrale hydrophobe H-Region und eine polare C-Region verfügt (Milstein *et al.*, 1972, von Heijne, 1990).

1.1.1 Die Sec-abhängige Proteintranslokation

Einen aktuellen Überblick über den Sec-Translokationsweg geben du Plessis *et al.* (du Plessis *et al.*, 2011). Wie in Abbildung 1 dargestellt ist, gibt es für ungefaltete Proteine, die über den Sec-Translokationsweg transloziert werden, zwei verschiedene Mechanismen des „Targeting“ (Zuführung) zur Translokase. So können Proteine mit Sec-Signalpeptid zum einen posttranslational und zum anderen cotranslational mit Hilfe des SRP (signal recognition particle, Signalerkennungspartikel) zur Sec-Translokase dirigiert werden. Beim posttranslationalen „Targeting“ zur Translokase wird das Protein in verschiedenen Gram-negativen Bakterien durch das Chaperon SecB in ungefaltetem, translokationskompetentem Status gehalten (Kumamoto & Beckwith, 1983, Driessen, 2001). SecB ist jedoch beispielsweise in Gram-positiven Bakterien nicht vorhanden. Welches Protein das posttranslationale Targeting in Organismen, die nicht über SecB verfügen, übernimmt, ist nicht bekannt. Beim cotranslationalen „Targeting“ bindet

SRP an das Sec-Signalpeptid des naszierenden Proteins und bringt den aus Ribosom, naszierendem Protein und SRP bestehenden Komplex an die Membran zum SRP-Rezeptor FtsY (Poritz *et al.*, 1990, Luirink *et al.*, 1992, Luirink *et al.*, 1994). Mit Hilfe von FtsY wird das sekretorische Protein an die Sec-Translokase übergeben (Valent *et al.*, 1998). In *E. coli* werden mittels des cotranslationalen SRP-Wegs vorwiegend integrale Membranproteine in die Cytoplasmamembran integriert (Facey & Kuhn, 2010). Sec-abhängig translozierte Proteine werden mit Hilfe der ATPase SecA, die den Motor der Translokase darstellt, durch einen Kanal, der von den integralen Membranproteinen SecY, SecE und SecG gebildet wird, transloziert (Lill *et al.*, 1989, Brundage *et al.*, 1990). Während oder kurz nach der Translokation wird dann das Signalpeptid durch die Signalpeptidase I (Lep in *E. coli*) abgespalten (Chang *et al.*, 1978).

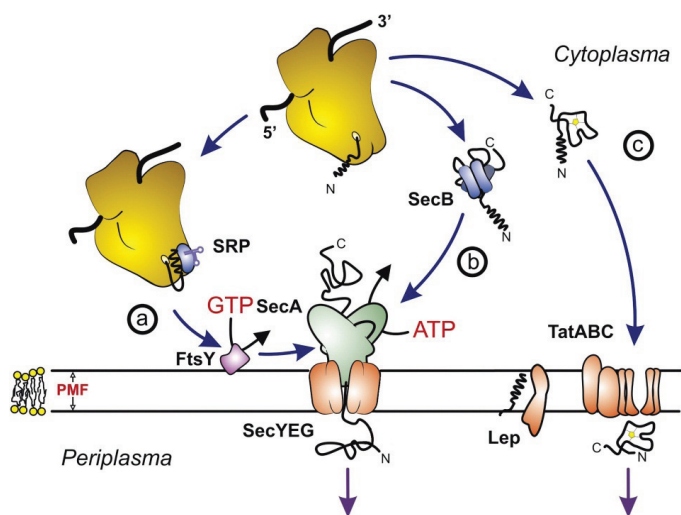


Abbildung 1: Schematische Darstellung des generellen Sekretionswegs (Sec) und des Twin Arginin Translokationswegs (Tat). Das „Targeting“ eines Proteins zur Sec-Translokase kann cotranslational (a) oder posttranslational (b) erfolgen, das „Targeting“ eines Proteins zur Tat-Translokase erfolgt stets posttranslational nach vollständiger Faltung des Proteins im Cytoplasma (c). Nach Natale *et al.*, 2008 modifiziert.

1.1.2 Die Tat-abhängige Proteintranslokation

Einen aktuellen Überblick über den Tat-Weg geben Hou und Brüser (Hou & Brüser, 2011). Namensgebend für den Tat-Weg sind die beiden nahezu invariablen aufeinanderfolgenden Argininreste im Signalpeptid von Tat-Substraten (Chaddock *et al.*, 1995). Wie in Abbildung 1 dargestellt ist, müssen Tat-abhängig translozierte Proteine vor der Translokation im Cytoplasma eine vollständig gefaltete Konformation

einnehmen. Darüber hinaus binden eine Vielzahl Tat-abhängig translozierter Substrate im Cytoplasma einen Kofaktor und einige Tat-Substrate multimerisieren vor der Translokation (Prickril *et al.*, 1986, Berks, 1996). Nachdem die Tat-Substrate die korrekte Konformation eingenommen haben, kommt es nach derzeitigem Kenntnisstand in einem ersten Schritt zu einem unspezifischen Kontakt zwischen dem Tat-Signalpeptid und der Cytoplasmamembran (Musser & Theg, 2000, Hou *et al.*, 2006, Bageshwar *et al.*, 2009). Anschließend wird das Tat-Signalpeptid durch einen Rezeptorkomplex aus TatB und TatC gebunden (Cline & Mori, 2001, Alami *et al.*, 2003). Daraufhin erfolgt die Assoziation von mehreren TatA-Molekülen (und eventuell TatE-Molekülen) an den TatBC-Substrat-Komplex (Mori & Cline, 2002). Für diesen Schritt wird die protonenmotorische Kraft benötigt. Für den Vorgang der Translokation existieren zurzeit zwei unterschiedliche Modelle. Zum einen könnte das gefaltete Protein durch eine an die Größe des Proteins angepasste TatA-Pore transloziert werden (Sargent *et al.*, 2001). Zum anderen könnte durch die Assemblierung mehrerer TatA-Moleküle um den Komplex aus dem zu translozierenden Protein, TatB und TatC die Integrität der Membran derart beeinträchtigt werden, dass diese lokal permeabel für das Substrat würde (Brüser & Sanders, 2003).

1.1.3 Die Nutzung von *Bacillus*-Arten zur sekretorischen Proteinproduktion

Für die sekretorische Proteinproduktion industrieller Enzyme werden häufig *Bacillus*-Arten genutzt (Ferrari *et al.*, 1993). Der Vorteil einiger *Bacillus*-Arten besteht darin, dass diese natürlicherweise zur Sekretion einer großen Menge an homologen Enzymen befähigt sind, und zusätzlich den Status eines GRAS-Organismus (generally recognized as safe) besitzen. Außerdem produzieren sie, anders als beispielsweise *E. coli*, keine Lipopolysaccharide (Endotoxine), die bei der Herstellung pharmazeutischer Proteine quantitativ abgetrennt werden müssten. Allerdings befinden sich unter den natürlicherweise sekretierten Enzymen auch Proteasen, die für die Stabilität sekretierter heterologer Proteine ein Problem darstellen können (Simonen & Palva, 1993, Westers *et al.*, 2004, Harwood & Cranenburgh, 2008). Somit stellen *Bacillus*-Arten keineswegs perfekte Wirtssysteme dar. Es besteht also ein zunehmend größer werdender Bedarf an alternativen Wirtssystemen für die (sekretorische) Proteinproduktion.

2 *Corynebacterium glutamicum* als Wirtsorganismus zur Herstellung rekombinanter Proteine

Ein industriell nutzbares Wirtssystem sollte außer den oben genannten Eigenschaften wie schnellem Wachstum, einfacher genetischer Modifizierbarkeit und einer hohen rekombinanten Proteinausbeute zudem als GRAS-Organismus anerkannt sein. All diese Bedingungen erfüllt *Corynebacterium glutamicum*. Dieses Bakterium gehört zu den GC-reichen Gram-positiven Bakterien, ist putativ anaerob bis aerob, nicht beweglich und nicht sporulierend. Es gehört der Gattung *Actinomycetales* an und wurde bei der Suche nach einem Glutamatproduzenten im Jahr 1957 erstmals beschrieben (Kinoshita *et al.*, 1957, Kinoshita *et al.*, 1958, Abé *et al.*, 1967). Seitdem wird dieses Bakterium industriell unter anderem zur Produktion von Glutamat, Lysin und weiteren Aminosäuren eingesetzt (Leuchtenberger *et al.*, 2005) und ist daher der Industrie in Bezug auf Fermentationsbedingungen gut bekannt.

Eine Besonderheit der *Corynebacterineae*, einer Untergruppe der *Actinomycetales*, sind Mycolsäuren in der Zellhülle (Stackebrandt *et al.*, 1997). So besitzen Organismen dieser Untergruppe neben der Cytoplasmamembran eine äußere Mycolatschicht, die kovalent an die Zellwand gebunden ist. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erinnert die Mycolatschicht dieser Gram-positiven Bakterien stark an die äußere Membran Gram-negativer Bakterien (Hoffmann *et al.*, 2008, Zuber *et al.*, 2008). Dies ist in Abbildung 2 gezeigt.

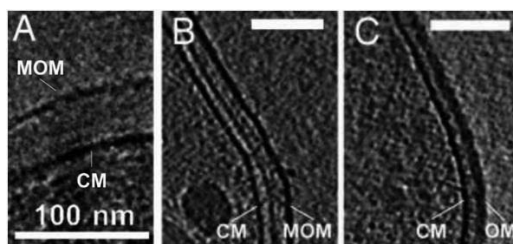


Abbildung 2: Cryo-Elektronen-Mikroskopie (A) einer *C. glutamicum* Wildtyp Zelle und Cryo-Elektronen-Tomografie von *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (B), einem Vertreter der *Corynebacterineae*, und *E. coli* (C), einem Gram-negativen Bakterium. CM – Cytoplasmamembran, MOM – Mycobakterielle „Outer Membrane“, OM – „Outer Membrane“; der Balken entspricht 100 nm. Aus (Hoffmann *et al.*, 2008).

Obwohl diese äußere Mycolatschicht eine effektive Permeabilitätsbarriere für die Aufnahme kleiner Substanzen wie Glycerin oder Acetat darstellt (Puech *et al.*, 2000), sind über die Cytoplasmamembran translozierte Proteine in *C. glutamicum* im

Kulturüberstand lokalisiert, unabhängig davon, ob sie mit Hilfe des Sec- oder des Tat-Wegs transloziert werden. Dies ist seit den ersten Studien mit translozierten Proteinen in *C. glutamicum* so beschrieben. Die Expression sowie Sekretion heterologer Proteine durch *C. glutamicum* ist daher grundsätzlich, trotz der vorhandenen äußeren Membran, möglich. Schon 1986 wurde gezeigt, dass *C. glutamicum*, damals noch *Brevibacterium lactofermentum*, in der Lage ist, eine α -Amylase aus *B. amyloliquefaciens* zu exprimieren und Sec-abhängig in den Kulturüberstand zu sekretieren (Smith *et al.*, 1986). In weiteren Arbeiten, die sich mit der Expression und Sec-abhängigen Sekretion von Cellulasen aus *Cellulomonas fimi* (Paradis *et al.*, 1987), einer Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (Liebl *et al.*, 1992), Proteasen aus *Dichelobacter nodosus* und *B. subtilis* (Billman-Jacobe *et al.*, 1995), dem Fibronektin bindenden Antigen 85A aus *Mycobacterium tuberculosis* (Salim *et al.*, 1997) und einer Transglutaminase aus *Streptovorticillium mobaraense* (Kikuchi *et al.*, 2003) beschäftigten, konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Proteine nach Expression und anschließender Sekretion stets im Kulturüberstand lokalisiert sind. Somit unterstreichen diese Arbeiten das Potential von *C. glutamicum* als Wirtsstamm für die industrielle Expression sowie für die Sekretion heterologer Proteine. Im Rahmen der Untersuchung der natürlicherweise durch *C. glutamicum* in den Kulturüberstand sekretierten Proteine wurde klar, dass ein weiterer Vorteil des Organismus darin besteht, dass dieser keine intrinsische proteolytische Aktivität im Kulturüberstand aufweist (Joliff *et al.*, 1992). Dies ist ein herausragender Vorteil von *C. glutamicum* gegenüber *B. subtilis*. In letzterem konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von heterologen sekretierten Proteinen durch Deletion der Gene für sekretierte Proteasen erhöht werden kann (Wu *et al.*, 1991, Westers *et al.*, 2004).

Im Jahr 2006 wurde in *C. glutamicum* erstmalig ein heterologes Protein Tat-abhängig sekretiert (Kikuchi *et al.*, 2006). Hierbei handelte es sich um ein Fusionsprotein aus dem Signalpeptid der Tat-abhängig sekretierten Trimethylamin-N-oxido (TMAO)-Reduktase TorA aus *E. coli* und dem grün fluoreszierenden Protein GFP aus *Aequorea victoria*. Im Zuge dessen wurde gezeigt, dass die Tat-Translokase in *C. glutamicum* aus TatA, TatB, TatC und TatE besteht, wobei TatB und TatE für die Translokation nicht essentiell sind, da auch eine Minimaltranslokase aus TatA und TatC funktional ist. TatB steigert jedoch erheblich die Effizienz der Translokation. TatE ist homolog zu TatA und kann dieses funktionell ersetzen, wenn es von einem Plasmid exprimiert wird (Kikuchi *et al.*, 2006). Für dieses Fusionsprotein, TorA-GFP

wurde im Folgenden auch gezeigt, dass *C. glutamicum* im Vergleich zu *Staphylococcus carnosus* und *Bacillus subtilis* der beste Expressions- und Sekretionswirt ist. Während das Tat-abhängig sekretierte TorA-GFP in *S. carnosus* in der Zellwand lokalisiert blieb und nicht in das Kulturmedium freigesetzt wurde, wurde es im etablierten Expressions- und Sekretionswirt *B. subtilis* zwar in das Medium sekretiert, dies allerdings in inaktiver Form (Meissner *et al.*, 2007). Als weiteres Beispiel der heterologen Expression und Tat-abhängigen Sekretion in *C. glutamicum* ist die Produktion einer Proteinglutaminase aus *Chryseobacterium proteolyticum* zu nennen, bei der zwei unterschiedliche Tat-Signalpeptide genutzt wurden, die zu unterschiedlich effektiver Sekretion führten (Kikuchi *et al.*, 2008). Wie schon Brockmeier *et al.* Für die Sec-abhängige Sekretion zeigen konnten, führt die Kombination eines reifen Proteins mit unterschiedlichen Signalpeptiden jeweils zu unterschiedlich effektiver Sekretion (Brockmeier *et al.*, 2006). Außerdem muss ein Signalpeptid, das mit einem bestimmten Protein zu effektiver Sekretion führt, mit einem anderen fusionierten Protein nicht automatisch zu gleich effektiver Sekretion führen. Daher ist ein breites Spektrum an Signalpeptiden notwendig, um das optimale Signalpeptid für ein zu sekretierendes Protein ausfindig zu machen. Aus diesem Grund wurden in *C. glutamicum* durch proteinbiochemische (Suzuki *et al.*, 2009) und bioinformatische Ansätze (Watanabe *et al.*, 2009, Müller, nicht veröffentlicht) sekretierte Proteine und somit unterschiedliche Signalpeptide identifiziert, welche zur sekretorischen Produktion heterologer Proteine genutzt werden können. Grundsätzlich sind homologe Signalpeptide aus dem Wirtsorganismus heterologen Signalpeptiden nicht zwangsläufig überlegen. Im Fall des GFP führte beispielsweise das homologe Signalpeptid der Phosphodiesterase PhoD aus *C. glutamicum* zwar zu effektiverer Sekretion als das heterologe Signalpeptid der TMAO-Reduktase TorA aus *E. coli*, war jedoch weniger effektiv als das ebenfalls heterologe Signalpeptid der Phosphodiesterase PhoD aus *B. subtilis* (Meissner *et al.*, 2007). Neben der Auswahl eines für die Sekretion eines bestimmten heterologen Proteins bestmöglichen Signalpeptids ist es jedoch auch möglich, anderweitig den Prozess der heterologen Proteinproduktion sowie –sekretion zu verbessern. Dies zeigt eine aktuelle Studie zur Optimierung der heterologen Expression und Tat-abhängigen Sekretion eines Proteins in *C. glutamicum* (Teramoto *et al.*, 2011). Der Ansatz in dieser Studie mit dem Ziel der Verbesserung der Ausbeute an sekretiertem GFP beruhte darauf, den Einfluss der verwendeten

Ribosomenbindestelle vor dem Gen für das zu exprimierende heterologe Protein zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Frage gestellt, ob die Expression sowie Sekretion durch die Zugabe von verschiedenen zweiwertigen Ionen in das Medium gesteigert werden kann. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute an Tat-abhängig sekretiertem GFP durch die Auswahl einer guten Signalsequenz, durch Verbesserung der Ribosomenbindestelle und durch Zugabe von Ca^{2+} ins Medium drastisch verbessert werden kann (Teramoto *et al.*, 2011). Somit kann grundsätzlich festgehalten werden, dass die selektive Optimierung einzelner, die Sekretion beeinflussender Parameter einen fördernden Einfluss auf die Menge der sekretorischen Proteinproduktion in *C. glutamicum* haben kann. Jedoch ist hierfür die Kenntnis über mögliche Engpässe, welche die Effektivität der Expression sowie der Sekretion heterologer Proteine beeinflussen, notwendig. Eine Möglichkeit, um Hinweise auf derartige Engpässe und somit auf Möglichkeiten der Verbesserung von Expression und Sekretion heterologer Proteine zu bekommen, besteht darin, globale Analysen auf Metabolom-, Transkriptom- oder Proteomebene durchzuführen. So konnte beispielsweise die Sekretion einer Transglutaminase aus *S. mobaraense* in *C. glutamicum* auf der Basis von ^{13}C Stoffflussanalysen verbessert werden (Umakoshi *et al.*, 2011). Zur Optimierung der Aminosäureproduktion werden solche globale Analysen schon seit längerem genutzt (Wendisch, 2008).

Für einige dieser globalen Analysen, wie zum Beispiel der genomweiten Transkriptionsuntersuchungen, ist die Kenntnis der Genomsequenz des zu untersuchenden Organismus eine wichtige Voraussetzung. Das Genom des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde durch die Universität Bielefeld und die Kitasato Universität (Japan) jeweils in Industriekooperationen sequenziert (Tauch *et al.*, 2002, Kalinowski *et al.*, 2003, Ikeda & Nakagawa, 2003).

3 Stressantworten in Mikroorganismen aufgrund von Proteinexpression und –sekretion

Die Expression und Sekretion von Proteinen in Mikroorganismen kann zur Induktion von Stressantworten führen. Die Kenntnis dieser Stressantworten aufgrund von Proteinexpression und Sekretion kann ausgenutzt werden, um den Prozess der Proteinexpression und –sekretion rational zu optimieren. Klassisch wurden Optimierungen durch Zufallsmutagenesen des Produktionsstamms oder durch Veränderungen der Anzuchtbedingungen bewerkstelligt. Je besser ein Prozess wie

die Expression und Sekretion von Proteinen jedoch verstanden ist, umso effektiver kann er verändert und optimiert werden. Dies kann zum Beispiel durch gezielte Deletion von Genen oder Überexpression von Proteinen bewerkstelligt werden. Daher besteht in der Wissenschaft das Bestreben, Prozesse wie die Expression und Sekretion heterologer Proteine zu untersuchen und zu verstehen. Beispielsweise wurde festgestellt, dass die Überexpression von Proteinen die Hitzeschockantwort induzieren kann. Wenn ein exprimiertes Protein anschließend aus dem Cytoplasma in den Kulturüberstand oder in das Periplasma transloziert wird, kann das wiederum die Induktion von Zellhüllenschutzsystemen bewirken. Die Induktion solcher Schutzsysteme der Zellhülle oder auch der Hitzeschockantwort kann mit Hilfe von Transkriptomvergleichen untersucht werden. Anschließend können die Effektoren dieser Schutzsysteme unter Umständen zur gezielten Optimierung von Expression und Sekretion genutzt werden. Im Folgenden sollen daher einige solcher untersuchten Schutzsysteme erläutert werden.

3.1 Die Überexpression von Proteinen kann zur Induktion der Hitzeschockantwort führen

Schon im Jahr 1985 wurde festgestellt, dass die Überexpression eines heterologen Proteins in *E. coli* zur Induktion von Hitzeschockproteinen wie Chaperonen (GroEL / ES, DnaK / J / GrpE) und Proteasen (Lon) führt (Goff & Goldberg, 1985). Unter der Hitzeschockantwort wird die Hochregulation von Genen für molekulare Chaperone und Proteasen verstanden, die dazu dient, entfaltete oder falsch gefaltete Proteine in die richtige Konformation zu überführen oder abzubauen (Neidhardt *et al.*, 1984, Goff *et al.*, 1984).

Bei der Expression heterologer Proteine, die meist in großen Mengen exprimiert werden, stellt die korrekte Faltung und die damit einhergehende Löslichkeit häufig eine große Herausforderung dar. Basierend auf der erwähnten Studie von Goff und Goldberg wurde die Koexpression von Chaperonen oder Chaperonkombinationen auf ihren Nutzen bei der Überexpression von Proteinen in vielen weiteren Studien untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Koexpression von Chaperonen durchaus einen positiven Einfluss auf die Ausbeute eines exprimierten Proteins haben kann. Allerdings zeigte sich auch, dass für jedes Protein individuell getestet werden muss, ob und welche Chaperone oder Chaperonkombinationen einen positiven Einfluss haben (Thomas *et al.*, 1997, Schlieker *et al.*, 2002, Hoffmann & Rinas, 2004, de

Marco *et al.*, 2007). Da bei der Hitzeschockantwort wie beschrieben auch die Expression von Proteasen induziert wird, die die Ausbeute eines exprimierten Proteins dezimieren können, wurden auch Protease-defiziente Stämme konstruiert, die ebenfalls Ausbeutesteigerungen des produzierten Proteins bewirkten (Gottesman, 1990). Ein vielgenutztes Beispiel ist der Stamm *E. coli* BL21 (DE 3), der unter anderem Deletionen der cytoplasmatischen Protease Lon sowie der Protease OmpT der äußeren Membran aufweist.

3.2 Schutz durch die extracytoplasmatische Protease HtrA

So wie im Cytosol die intrazellulären Chaperone und Proteasen als Schutz für die Zelle bei Hitzestress und Proteinüberexpression dienen, gibt es auch im Periplasma sowie der Zellhülle Proteasen, welche diese Kompartimente vor der Akkumulation von ungefalteten Proteinen schützen. So ist beispielsweise das HtrA-Homolog DegP eine derartige periplasmatische Protease in *E. coli*, die als Reaktion auf Hitzestress, aber auch auf Überexpression sekretierter Proteine induziert wird (Strauch & Beckwith, 1988, Lipinska *et al.*, 1988, Lipinska *et al.*, 1989). Zur Familie der HtrA-Proteine gehören Serinproteasen mit ein bis zwei C-terminalen PDZ-Domänen. Die PDZ-Domänen dienen der Interaktion mit Proteinen und sind an der Erkennung der C-Termini von entfalteten Proteinen der äußeren Membran und an der Multimerisierung der HtrA-Proteasen beteiligt (Iwanczyk *et al.*, 2007). HtrA-Homologe sind sowohl in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien als auch in Mitochondrien, Chloroplasten und Säugerzellen vorhanden (Clausen *et al.*, 2011). Die meisten Bakterien besitzen ein oder mehrere HtrA-Homologe. In *E. coli* und *B. subtilis* gibt es zum Beispiel jeweils drei HtrA-Homologe, wohingegen *C. glutamicum* nur ein HtrA-Homolog besitzt. DegP aus *E. coli* ist das am besten untersuchte HtrA-Homolog. Das Außergewöhnliche an diesem Protein ist, dass es sowohl eine Protease- als auch eine Chaperonaktivität aufweist (Spiess *et al.*, 1999). DegP kann falsch gefaltete oder ungefaltete Proteine mit Hilfe der PDZ1-Domäne binden und diese entweder durch die Chaperonaktivität in die korrekte Konformation überführen oder sie mittels der Proteaseaktivität abbauen. Darüber hinaus können Proteine, die für die äußere Membran bestimmt sind, im Periplasma durch DegP vor dem Abbau durch andere Proteasen geschützt werden (Krojer *et al.*, 2008). Zusammengefasst trägt DegP durch die Protease- sowie Chaperonaktivität dazu bei,

die Zellhülle vor Proteinaggregaten zu schützen, die für die Zelle toxisch wären (Hunke & Betton, 2003).

3.3 Schutz der Zellhülle durch den Sigmafaktor σ^E

Eine derart wichtige Schutzfunktion wie die Proteinqualitätskontrolle in der Zellhülle muss der jeweiligen Stresssituation entsprechend reguliert sein. Das Gen für DegP kann in *E. coli* sowohl durch den extracytoplasmatischen Sigmafaktor σ^E als auch durch das Zweikomponentensystem CpxAR aktiviert werden (Lipinska *et al.*, 1988, Danese *et al.*, 1995). Diese beiden Antwortsysteme für Zellhüllenstress sind ihrerseits komplex reguliert wie in Abbildung 3 dargestellt ist (Ruiz & Silhavy, 2005). So wird die σ^E Antwort beispielsweise durch ungefaltete Zellhüllenproteine oder Hitzestress ausgelöst (Erickson & Gross, 1989, Meccas *et al.*, 1993). In inaktivem Zustand ist der Sigmafaktor σ^E durch den membranständigen Antisigmafaktor RseA gebunden. Die Deaktivierung des Antisigmafaktors RseA erfolgt nur nach Deaktivierung des Koinhibitors RseB und drei proteolytischen Spaltungen. Im Detail wird der Koinhibitor RseB, sobald ungefaltete Proteine der äußeren Membran (OMPs, „outer membrane proteins“) im Periplasma vorhanden sind, durch diese ungefalteten Proteine, sofern sie ein β -Strang-Motiv präsentieren, deaktiviert. Im Anschluss kann die membranständige HtrA-Protease DegS RseA spalten. Um proteolytische Aktivität zu besitzen, muss DegS durch Binden eines C-Terminus eines OMPs mit Hilfe der PDZ-Domäne seinerseits ebenfalls aktiviert werden. Durch diesen ersten proteolytischen Schritt wird eine zweite Schnittstelle für die Protease RseP zugänglich. Durch Spalten der zweiten Schnittstelle wird ein RseA-Rest samt σ^E ins Cytoplasma freigegeben. Dort kann σ^E nach einem dritten proteolytischen Schritt, der Abspaltung des RseA-Rests durch die Protease ClpXP, bei der Transkription des σ^E -Regulons mitwirken (Hasselblatt *et al.*, 2007, Chaba *et al.*, 2011, Kulp & Kuehn, 2011). Zu diesem Regulon gehören mehr als 60 Gene, unter anderem die Gene für das HtrA-Homolog DegP, die Peptidylprolylisomerasen FkpA und SurA, das periplasmatische Chaperon Skp, die Disulfidisomerase DsbC, den Sigmafaktor σ^E , den Antisigmafaktor RseA und den Inhibitor RseB (Rhodius *et al.*, 2006). Durch die Induktion der Antisigmafaktors RseA und des Inhibitors RseB kann die σ^E -Antwort schnell wieder inaktiviert werden, sobald kein Induktor (OMPs) mehr vorhanden ist.

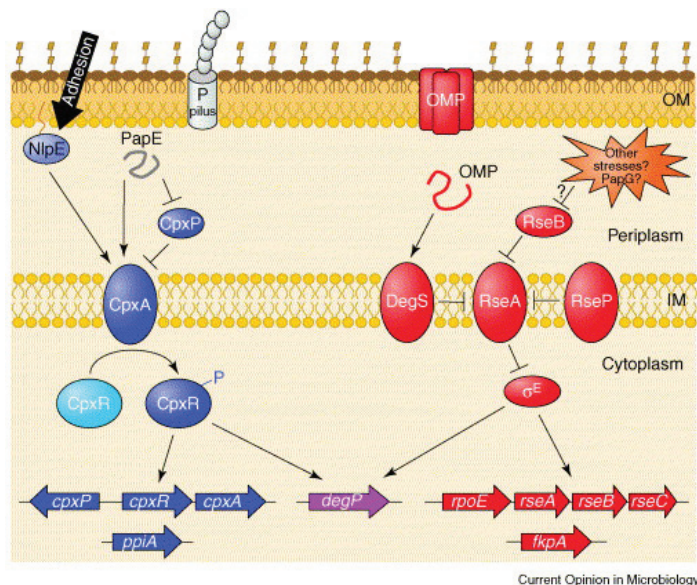


Abbildung 3: Übersicht über die Zellhüllenschutzsysteme CpxAR und σ^E aus *E. coli*. Das CpxAR-System ist ein Zweikomponentensystem, das zum Beispiel durch Überexpression des Lipoproteins NlpE der äußeren Membran (OM), der P-Pilus Untereinheit PapE oder durch Oberflächenadhäsion in Anwesenheit von NlpE aktiviert werden kann. Das akzessorische Protein CpxP fungiert als Feedbackinhibitor. Der Sigmafaktor σ^E wird durch nicht korrekt gefaltete Proteine der äußeren Membran, die sich im Periplasma befinden, aktiviert. In inaktivem Zustand ist er durch den Antisigmafaktor RseA, der in der inneren Membran (IM) lokalisiert ist, gebunden. Die Freisetzung erfolgt nach sequentieller Inaktivierung des Inhibitors RseB, Aktivierung von DegS durch entfaltete Proteine der äußeren Membran, einer anschließenden ersten Spaltung von RseA und einer folgenden zweiten Spaltung von RseA durch RseP. Aktiver CpxR sowie der freie Sigmafaktor σ^E bewirken die Transkription ihrer jeweiligen Zielgene (Ruiz & Silhavy, 2005).

3.4 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem CpxAR

Wie durch den Sigmafaktor σ^E kann das Gen für die periplasmatische Protease DegP in *E. coli* auch durch das CpxAR-System reguliert werden (Danese *et al.*, 1995). Dieses Zweikomponentensystem besteht aus der Sensorkinase CpxA und dem Antwortregulator CpxR. Wie bei einem Zweikomponentensystem üblich, reagiert die membranständige Sensorkinase CpxA auf einen extracytoplasmatischen Stimulus mit einer geänderten Autophosphorylierungsaktivität. In aktiviertem Zustand phosphoryliert sie ihren zugehörigen Antwortregulator CpxR, der daraufhin in aktiver, phosphorylierter Form als Transkriptionsregulator seine Zielgene regulieren kann (Gao & Stock, 2009). Wie in Abbildung 3 gezeigt ist, verfügt das Zweikomponentensystem CpxAR zusätzlich noch über ein akzessorisches Protein, CpxP, das als negativer Feedback-Regulator fungiert (Raivio *et al.*, 1999). Daher wird das Cpx-System auch als Dreikomponentensystem bezeichnet. Neben den zu

Beginn der Untersuchung des Cpx-Systems gefundenen Stimuli wie der Überexpression des Lipoproteins NlpE und der P-Pilus Assemblierung in Abwesenheit des Chaperons PapD (Snyder *et al.*, 1995, Jones *et al.*, 1997), wurden inzwischen zahlreiche weitere Bedingungen gefunden, die das Cpx-System aktivieren (Hunke *et al.*, 2012). Wie schon im Regulon von σ^E befinden sich im Regulon des Cpx-Systems außer dem Gen für die Protease DegP noch Gene für Proteine, die an der Disulfidbrückenbildung beteiligt sind, wie zum Beispiel das Gen für die Disulfidoxidoreduktase DsbA, Gene für Peptidylprolylisomerasen wie PpiA und PpiD, das Gen für das periplasmatische Chaperon Spy und die Gene für das Zweikomponentensystem CpxAR selbst sowie den Feedbackinhibitor CpxP.

3.5 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem CssRS

So wie es in *E. coli* Zweikomponentensysteme gibt, die auf sekretierte Proteine reagieren, um zu vermeiden, dass aggregierte Proteine im Periplasma akkumulieren, wurde auch in *B. subtilis* mit CssRS (Control oft the cellular response to Secretion Stress) ein Zweikomponentensystem entdeckt, das Bestandteil einer generellen Sekretionsstressantwort ist (Hyyryläinen *et al.*, 2001). Dieses weist Ähnlichkeit zum Cpx-System aus *E. coli* auf und reguliert die beiden HtrA-Proteasen HtrA und HtrB. Aktiviert wird dieses Zweikomponentensystem beispielsweise bei Sekretion der α -Amylase AmyQ aus *B. amyloliquefaciens*, der Lipase A aus *B. subtilis* und des humanen Interleukin-3 (Hyyryläinen *et al.*, 2001, Westers *et al.*, 2006). Entgegen dieser beschriebenen Funktion als generelle Sekretionsstressantwort konnte bei der Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen von *B. subtilis* weder auf die Expression und Sekretion der nativen alkalischen Phosphatase PhoA aus *E. coli* noch auf die Expression und Sekretion von Fusionsproteinen, in welchen der reife Teil von PhoA an das Signalpeptid beziehungsweise an das Signalpeptid plus Prosequenz einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* fusioniert wurde, eine Stressantwort nachgewiesen werden (Kouwen *et al.*, 2010). Bei dieser Untersuchung waren weder Zielgene des auf Sekretionsstress reagierenden CssRS-Systems noch Zielgene des alternativen Sigmafaktors σ^W , der auf Membran- und Zellwandstress reagiert, reguliert. Die Tatsache, dass in diesem Fall kein Zellhüllenschutzsystem induziert wurde, ist umso überraschender, da bei Sekretion des Fusionsproteins aus dem reifen Part von PhoA und dem Signalpeptid plus Prosequenz der Lipase aus *S. hyicus* eine größere Menge an sekretiertem PhoA im Kulturmedium als im Fall der

AmyQ nachgewiesen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass der durch die Sekretion ausgelöste Stress nicht ausschließlich durch die Menge des sekretierten Proteins bestimmt wird, sondern auch individuell von der Natur des sekretierten Proteins abhängt. Das Signalpeptid plus Prosequenz der Lipase aus *S. hyicus* könnte durch schnelle Faltung von PhoA zu einer niedrigen Konzentration von ungefaltetem Protein an der Zellhülle führen und aus diesem Grund keine Induktion der Stressantwort auslösen, wohingegen das in geringerer Menge sekretierte AmyQ das CsrRS-System induziert.

3.6 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem BaeSR

In *E. coli* existiert mit dem Zweikomponentensystem BaeSR ein weiteres System, das, wie auch das Cpx-System, die vermehrte Expression des periplasmatischen Chaperons Spy bewirken kann. Es kann durch Überexpression der P-Pilus Untereinheit PapG, durch Sphäroblastierung oder durch Indol induziert werden (Raffa & Raivio, 2002). Weiterführende Untersuchungen des BaeSR-Systems identifizierten als weitere Zielgene des Systems beispielsweise „Multidrug“ Efflux Pumpen. Dies deutet neben dem Schutz der Zellhülle auf eine Funktion des Systems bei der Abwehr antimikrobieller Substanzen hin (MacRitchie *et al.*, 2008, Leblanc *et al.*, 2011).

3.7 Schutz der Zellhülle durch das „Phage Shock“ Protein (Psp)-System

Ein weiteres Schutzsystem von *E. coli* ist das „Phage Shock“ System (Phagenschocksystem), das als Reaktion auf das Protein des Phagengens IV des filamentösen f1 Phagen entdeckt wurde (Brissette *et al.*, 1990). Wie Joly *et al.* zusammengefasst haben, scheint die „Phage Shock“ Antwort dem Schutz der Integrität der Cytoplasmamembran zu dienen (Joly *et al.*, 2010). Eine schematische Darstellung des „Phage Shock“ Systems ist in Abbildung 4 (A) gezeigt (Wolf *et al.*, 2010). Die Membranproteine PspB und PspC sind an der Reizwahrnehmung beteiligt (Brissette *et al.*, 1991, Weiner *et al.*, 1991). Das Protein PspA dient in *E. coli* sowohl als Effektorprotein zum Schutz der Membran als auch als Inhibitor des Transkriptionsaktivators PspF (Jovanovic *et al.*, 1996, Kleerebezem *et al.*, 1996). Als Effektorprotein kann es als Homomultimer aus 36 Untereinheiten ringförmige Strukturen bilden, um die Cytoplasmamembran zu stabilisieren (Hankamer *et al.*,

2004). Die Transkription der „Phage Shock“ Gene erfolgt in *E. coli* durch den alternativen Sigmafaktor σ^{54} (Weiner *et al.*, 1991). Inzwischen ist eine Vielzahl von Stimuli zur Induktion der „Phage Shock“ Antwort bekannt (Joly *et al.*, 2010). So können beispielsweise die Überexpression von Sekretin (wie dem Genprodukt IV des f1-Phagens) oder von mutierten Proteinen der äußeren Membran als Stimuli zur Induktion der „Phage Shock“ Antwort dienen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Sekretion über Sec oder Tat zur Induktion der „Phage Shock“ Antwort führen kann. Homologe zu „Phage Shock“ Proteinen wurden sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien gefunden. Sogar in Chloroplasten gibt es das Protein Vipp1, das dem bakteriellen PspA ähnlich ist und in *E. coli* PspA als Effektor funktionell ersetzen kann (Westphal *et al.*, 2001, DeLisa *et al.*, 2004).

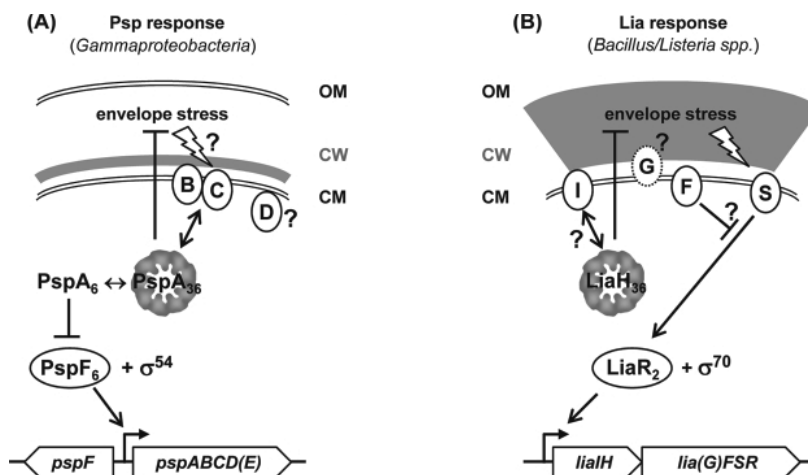


Abbildung 4: Schematische Darstellung der „Phage Shock“ Antwort (A) und der Lia Antwort (B). In Gammaproteobakterien wie *E. coli* erfolgt die Reizwahrnehmung der „Phage Shock“ Antwort teilweise über die Membranproteine PspB und PspC. PspA, das in inaktivem Zustand als Hexamer den Transkriptionsaktivator der „Phage Shock“ Antwort PspF inhibiert, stabilisiert im induzierten System als Multimer aus 36 Untereinheiten die Cytoplasmamembran und wirkt so Zellhüllenstress entgegen. Die Transkription des *pspABCD(E)*-Operons erfolgt mit Hilfe des Sigmafaktors σ^{54} . In *B. subtilis* wird durch das Zweikomponentensystem LiaSR ein Operon reguliert, das auch ein Gen für das PspA-Homolog LiaH enthält. Das LiaRS-System wird durch den negativen Feedbackregulator LiaF, der ebenfalls im selben Operon liegt, reprimiert und durch zellwandaktive Antibiotika wie Bacitracin induziert (Wolf *et al.*, 2010)

3.8 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem LiaSR

Auch der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* besitzt eine „Phage Shock“-ähnliche Antwort, die durch das sogenannte Lia-System reguliert wird, wie in

Abbildung 4 (B) dargestellt ist. Das Lia-System ist ein Zweikomponentensystem, bestehend aus der Histidinsensorkinase LiaS und dem Antwortregulator LiaR (Mascher *et al.*, 2004). Ebenfalls im gleichen Operon liegt das Gen für den negativen Feedbackregulator LiaF (Jordan *et al.*, 2006). Das Lia-System ist nach der Reaktion auf Antibiotika wie Bacitracin und Vancomycin, die die Lipid II-Biosynthese inhibieren, benannt (Lipid II cycle Interfering Antibiotic response). Als Effektorprotein des Lia-Systems dient LiaH. Dieses weist Homologie zum Effektorprotein PspA aus *E. coli* auf und kann ebenso wie dieses als Homomultimer aus 36 Untereinheiten ringförmige Strukturen ausbilden. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass LiaH eine Rolle beim Schutz vor zellwandaktiven Antibiotika und einigen Oxidantien spielt (Wolf *et al.*, 2010).

4 Die biotechnologische Nutzung von Zellhüllenschutzsystemen

4.1 Die Nutzung des Wissens über das Psp-System

Ein Zusammenhang zwischen dem „Phage Shock“ System und effektiver Sekretion wurde aufgrund der Induktion von PspA bei der Expression eines Proteins der äußeren Membran erkannt (Kleerebezem & Tommassen, 1993). Dabei wurde entdeckt, dass die Sekretion in einer *pspA*-Deletionsmutante weniger effektiv sein kann als im Wildtyp. Dieses Wissen wurde für die Optimierung der sekretorischen Proteinproduktion genutzt. Sowohl für den Gram-negativen Organismus *E. coli* als auch für den Gram-positiven Organismus *Streptomyces lividans* wurde gezeigt, dass eine Koexpression von PspA die Sec- und Tat-abhängige Sekretion verbessern kann (DeLisa *et al.*, 2004, Aldor *et al.*, 2005, Vrancken *et al.*, 2007).

4.2 Die Nutzung des Wissens über das CsrRS-System

Auch die Kenntnis um die Induktion der extracytoplasmatischen Proteasen HtrA und HtrB durch das CsrRS-Zweikomponentensystem in *B. subtilis* konnte schon biotechnologisch genutzt werden. Obwohl das CsrRS-System ursprünglich als Reaktion auf Sekretionsstress entdeckt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Zweikomponentensystems und die damit einhergehenden geringeren Level der Proteasen HtrA und HtrB einen positiven Effekt auf die Expression von Membranproteinen in *B. subtilis* haben können (Zweers *et al.*, 2009). Einzeldelationen der Gene *htrA* oder *htrB* zeigten im Gegensatz zur Deletion der Gene des CsrRS-Systems jedoch keinen positiven Effekt. Der Grund hierfür liegt

wahrscheinlich darin, dass die Deletion des Gens für eine der beiden Proteasen zur Hochregulation des Gens für die jeweilig andere Protease führt (Noone *et al.*, 2001).

5 Genomweite Transkriptionsanalysen zur Definition von Zellhüllenstressantworten als Reaktion auf die Überexpression und Sekretion von Proteinen

Genomweite Transkriptionsanalysen stellen ein geeignetes Mittel dar, um Reaktionen auf transkriptioneller Ebene auf die Expression und Sekretion von Proteinen zu untersuchen. Gene, die unter Stressbedingungen dieser Art reguliert sind, können interessante Ziele zur Verbesserung der Expression und Sekretion von Proteinen darstellen, sei es durch Deletion oder durch Überexpression der durch diese Gene kodierten Proteine. In jedem Fall trägt das bessere Verständnis der Reaktionen auf Expression und Sekretion von Proteinen dazu bei, diesen Prozess rational optimieren zu können.

So konnte in einer umfassenden vergleichenden Studie, welche die Reaktionen auf die Expression von sekretierten Proteinen, Lipoproteinen und Membranproteinen auf transkriptioneller Ebene in *B. subtilis* untersuchte, die Hochregulation der Gene für das CssRS-System und für die Proteasen HtrA und HtrB bei Expression der sekretierten neutralen Protease NprE und der sekretierten Xylanase XynA aus *B. subtilis* beobachtet werden (Marciniak *et al.*, 2012). Somit wurde die Induktion des CssRS-Systems bei Expression von sekretierten Proteinen erwartungsgemäß bestätigt. Die sekretierten zellwandassoziierten Proteine USP45 aus *Lactococcus lactis* und β -Lactamase aus *E. coli* induzierten außer dem CssRS-System zusätzlich auch das LiaRS-System, das die vermehrte Expression des PspA-Homologs LiaH bewirkt. Die Überexpression der Membranproteine LmrA („Multidrug“ Transporter) aus *L. lactis* und XylP (Xylosidtransporter) aus *Lactobacillus pentosus* induzierte die Membranprotease YkrL, ein Homolog der Membranprotease HtpX aus *E. coli*, und den alternativen Sigmafaktor σ^W samt dessen Regulon. Als allgemeine Reaktionen auf Überexpression der Proteine wurden Chaperone wie DnaK, DnaJ GroEL und GroES, Untereinheiten der Clp-Protease, das Operon *nrfA-ywcH*, das auf Stress-induzierte Proteinfehlfunktionen reagiert, sowie TrxA und TrxB, die thiol-spezifischem oxidativem Stress entgegenwirken, induziert (Marciniak *et al.*, 2012). All diese

regulierten Gene stellen somit potentielle Ansatzpunkte dar, um die Expression und Sekretion von Proteinen in *B. subtilis* zu optimieren.

6 Mögliche Engpässe bei der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *C. glutamicum*

Wie in Abbildung 5 dargestellt ist, können bei der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *C. glutamicum* potentielle Engpässe bei der Transkription und Translation, bei der Faltung, beim „Targeting“ des Proteins zur Translokase, bei der Translokation über die Cytoplasmamembran oder bei der Passage von Zellwand- und Mycolatschicht auftreten. Solche Engpässe können mit globalen Analysen des Transkriptoms, des Metaboloms, von Stoffflussraten oder des Proteoms aufgedeckt werden. Je nachdem, ob es sich um ein Tat-abhängig oder Sec-abhängig sekretiertes Protein handelt, können Schwierigkeiten bei der Faltung intrazellulär bei Tat-Substraten oder extrazellulär bei Sec-Substraten auftreten. Wie die Passage durch die Zellwand und durch die Mycolsäureschicht erfolgt und ob hierbei Engpässe auftreten können, ist bisher nicht bekannt.

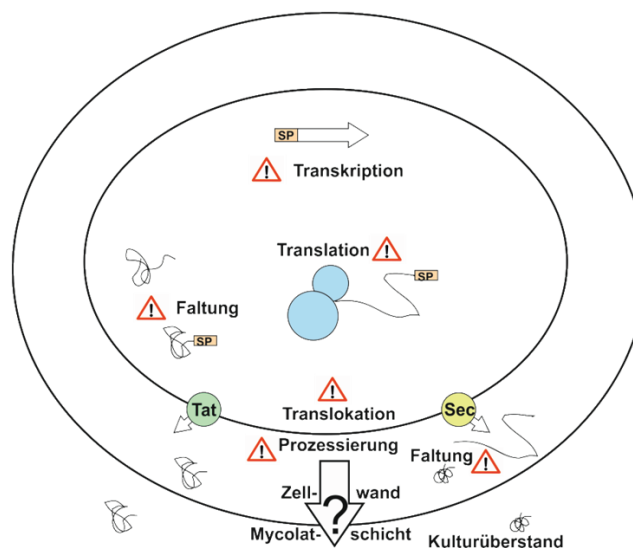


Abbildung 5: Mögliche Engpässe bei der Expression und Sekretion von Proteinen in *C. glutamicum*. Die Möglichkeit von Engpässen besteht bei der Transkription, der Translation, der Faltung, der Translokation, der Prozessierung und der Passage durch Zellwand und Mycolatschicht. Regulierte Gene, die an diesen Prozessen beteiligt sein könnten, stellen somit möglicherweise Engpässe dar. Solche Gene können durch Überexpression zur gezielten Optimierung der Expression und Sekretion genutzt werden. Ebenso können Gene, die für störende Faktoren kodieren, deletiert werden.

Erste Befunde über transkriptionelle Reaktionen von *C. glutamicum* als Reaktion auf Expression und Sekretion heterologer Proteine liegen in der Dissertation von Sandra Scheele vor (Scheele, 2012). Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression und Tat-abhängige Sekretion einer katalytisch inaktiven Sorbitol / Xylitloxidase keine transkriptionellen Reaktionen auslöst. Dies könnte drei mögliche Ursachen haben. Erstens könnte die Menge des sekretierten Enzyms nicht hoch genug sein, um Reaktionen auf transkriptioneller Ebene auszulösen. Zweitens könnten an der Expression und Tat-abhängigen Sekretion beteiligte Faktoren in *C. glutamicum* konstitutiv exprimiert sein und daher nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Und drittens könnte die Tat-abhängige Sekretion keinerlei Stress hervorrufen, da *C. glutamicum* sehr gut zur Expression und Tat-abhängigen Sekretion heterologer Proteine geeignet ist (Kikuchi *et al.*, 2006, Meissner *et al.*, 2007, Teramoto *et al.*, 2011). Die Expression und Sec-abhängige Sekretion der Amylase AmyH führte hingegen zur Hochregulation von sechs Genen, unter anderem der Gene für die cytoplasmatischen Chaperone GroES / EL und des Gens für die extracytoplasmatische Protease HtrA (Scheele, 2012). Die Induktion von HtrA deutet auf vermehrten Stress in der Zellhülle durch ungefaltete Proteine hin und entspricht somit den bekannten Reaktionen der Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* als Antwort auf die erhöhte Sec-abhängige Sekretion von Proteinen.

7 Ziel der Arbeit

Im Gegensatz zu den gut untersuchten Organismen *E. coli* und *B. subtilis* wurde in *C. glutamicum* Zellhüllenstress aufgrund der Sekretion von Proteinen bislang nicht systematisch untersucht. In einer einzigen Untersuchung in dieser Arbeitsgruppe wurde als Antwort auf die Sec-abhängige Sekretion eines Proteins die Hochregulation einiger Gene beschrieben (Scheele, 2012). Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion von Proteinen eingehend analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Regulation einzelner Gene, die bei Expression und Sec-abhängiger Sekretion von Proteinen hochreguliert waren, näher untersucht werden.

Zur Untersuchung der Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion von Proteinen sollten genomweite Transkriptionsvergleiche per DNA-Microarrays mit verschiedenen Modellproteinen, die nach Faltung im Cytoplasma über den Tat-Weg sekretiert werden, angefertigt werden. Ziel dieser

Untersuchungen war es, ein besseres Verständnis der Vorgänge während Expression und Tat-abhängiger Sekretion zu gewinnen und, im Idealfall, mögliche Engpässe zu identifizieren.

Unter den bei Expression und Sec-abhängiger Sekretion regulierten Genen in *C. glutamicum* wurde beispielsweise die Hochregulation des Gens für die extracytoplasmatische Protease HtrA und die Hochregulation des Gens *cg0706*, das für ein Membranprotein mit PspC-Domäne kodiert, beobachtet (Scheele, 2012, Kleine, nicht veröffentlicht). Diese beiden Gene liegen jeweils neben den Genen für Zweikomponentensysteme im Genom von *C. glutamicum*. Da es in den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* zahlreiche Beispiele dafür gibt, dass Zweikomponentensysteme wie das Cpx-System oder das Css-System als Reaktion auf Sekretionsstress die Regulation ihrer Zielgene aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass die beiden genannten Zweikomponentensysteme an einer Reaktion auf Sekretionsstress beteiligt sein könnten. Daher sollten diese beiden Zweikomponentensysteme näher charakterisiert werden. Der Fokus sollte hierbei auf den Zielgenen liegen, die durch das jeweilige Zweikomponentensystem reguliert werden, da diese Hinweise auf die physiologischen Funktionen dieser beiden Zweikomponentensysteme geben könnten.

IV. Material und Methoden

1 Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) und SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) verwendet. Biochemikalien und Enzyme mit den dazugehörigen Puffern stammten von den Firmen Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), GE Healthcare (München), Invitrogen (Life Technologies GmbH, Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Frankfurt / Main), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Zusätze für Nährmedien stammten von Becton Dickinson / Difco GmbH (Heidelberg). Nitrocellulosemembranen wurden von GE Healthcare (München; ehemals Whatman GmbH, Dassel) bezogen. Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Produkte anderer Hersteller sind an entsprechender Stelle aufgelistet.

2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10] proAB⁺ lacI^R Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987) Agilent Technologies Life Sciences and Chemical Analyses, Waldbronn (ehemals Stratagene)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	(Studier & Moffatt, 1986) Merck KGaA, Darmstadt (ehemals Novagen)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtyp	(Kinoshita <i>et al.</i> , 1958)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 ΔTatAC	<i>tatAC</i>	(Meissner <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 Δ <i>cgtRS2</i> pCLTON2::CgtR2	<i>cgtRS2</i> , in Anwesenheit von plasmidkodiertem <i>cgtR2</i> konstruiert; Spec ^R	diese Arbeit
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 Δ <i>cgtSR7</i> pEKEx3::CgtR7	<i>cgtSR7</i> , in Anwesenheit von plasmidkodiertem <i>cgtR7</i> konstruiert; Spec ^R	diese Arbeit

2.2 Plasmide

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pEKEx2	P_{tac} , $lacI^q$, Km^R , pBL1 $oriV_{C.g.}$, pUC18 $oriV_{E.c.}$	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1994)
pEKEx2Linker	pEKEx2-Derivat mit Ribosomenbindestelle hinter dem <i>tac</i> -Promotor	(Müller, nicht publiziert)
pEKExL_Tat25_GFP	pEKEx2Linker-Derivat mit <i>copO-gfp</i> Hybridgen	(Müller, nicht publiziert)
pEKExL_Tat5_GFP	pEKEx2Linker-Derivat mit <i>cg0955-gfp</i> Hybridgen	(Müller, nicht publiziert)
pCGTorA-GFP	pEKEx2-Derivat mit <i>torA-gfp</i> Hybridgen	(Meissner <i>et al.</i> , 2007)
pCGPhoD ^{Bs} -GFP	pEKEx2-Derivat mit <i>phoD^{Bs}-gfp</i> Hybridgen	(Meissner <i>et al.</i> , 2007)
pEKEx2::GFP	pEKEx2-Derivat mit <i>gfp</i> (die verwendete GFP-Variante ist wie in den anderen GFP-Konstrukten GFPuv von Clontech (Crameri <i>et al.</i> , 1996))	(Lausberg <i>et al.</i> , 2012)
pEKEx2-AmyE_C _{His}	pEKEx2-Derivat mit <i>amyE</i> mit C-terminalem His-Tag	(Freudl, nicht publiziert)
pEKExL_TorA-MalE	pEKEx2Linker-Derivat mit <i>torA-malE</i> Hybridgen	(Müller, nicht publiziert)
pEKEx2-MalE	pEKEx2-Derivat mit <i>malE</i> (mit authentischem Signalpeptid)	(Lausberg, nicht publiziert)
pEKEx2Linker::CgtR2	pEKEx2Linker-Derivat mit <i>cgtR2</i> (<i>cg0996</i>)	diese Arbeit
pEKEx2Linker::CgtR7	pEKEx2Linker-Derivat mit <i>cgtR7</i> (<i>cg0709</i>)	diese Arbeit
pEKEx3	P_{tac} , $lacI^q$, Sp^R , pBL1 $oriV_{C.g.}$, pUC18 $oriV_{E.c.}$	(Hoffelder <i>et al.</i> , 2010)
pEKEx3::CgtR2	pEKEx3-Derivat mit <i>cgtR2</i> (<i>cg0996</i>)	diese Arbeit
pEKEx3::CgtR7	pEKEx3-Derivat mit <i>cgtR7</i> (<i>cg0709</i>)	diese Arbeit
pK19mobsacB	$oriV_{E.c.}$, $oriT$, <i>mob</i> , <i>sacB</i> , Km^R	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK19mobsacB-Δ <i>qcrA</i>	pK19mobsacB-Derivat mit den flankierenden Regionen von <i>qcrA</i> (<i>cg2404</i>)	(Koch-Koerfges, 2011)
pK19mobsacB::Δ <i>cgtRS2</i>	pK19mobsacB-Derivat mit den flankierenden Regionen von <i>cgtRS2</i> (<i>cg0996-cg0997</i>)	(Kocan <i>et al.</i> , 2006)
pK19mobsacB::Δ <i>cgtSR7</i>	pK19mobsacB-Derivat mit den flankierenden Regionen von <i>cgtSR7</i> (<i>cg0707-cg0709</i>)	(Kocan <i>et al.</i> , 2006)

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pEC-XC99E	P_{trc} , $lacI^q$, Cm^R , pGA1 mini-replicon _{C.g.} , pUC18 $oriV_{E.c.}$	(Kirchner & Tauch, 2003)
pCLTON1	P_{tet} , $tetR$, Km^R , pBL1 $oriV_{C.g.}$, pUC18 $oriV_{E.c.}$	(Lausberg <i>et al.</i> , 2012)
pCLTON2	P_{tet} , $tetR$, Sp^R pBL1 $oriV_{C.g.}$, pUC18 $oriV_{E.c.}$	diese Arbeit
pCLTON2::CgtR2	pCLTON2-Derivat mit <i>cgtR2</i> (cg0996)	diese Arbeit
pET-28b	P_{T7} , $lacI$, Km^R , pBR322 $oriV_{E.c.}$, Sequenz für ein Hexahistidintag und eine Thrombinschnittstelle vor der MCS	Merck KGaA, Darmstadt (ehemals Novagen)
pET-28b::Nhis-CgtR2	pET-28b-Derivat mit <i>cgtR2</i> (cg0996) mit N-terminalem mittels Thrombin abspaltbarem Hexahistidintag	(Brockner, nicht publiziert)
pET-28b::CgtR2	pET-28b-Derivat mit <i>cgtR2</i> (cg0996)	diese Arbeit
pET-28b::Nhis-CgtR7	pET-28b-Derivat mit <i>cgtR7</i> (cg0709) mit N-terminalem mittels Thrombin abspaltbarem Hexahistidintag	(Brockner, nicht publiziert)

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')	Referenz
GFP_fw_Pst1	AAC <u>TGC AGA</u> AGG AGA TAT AGA TAT GAG TAA AGG AGA AGA ACT TTT CAC TG	diese Arbeit
GFP_rv_EcoR1	CGG <u>AAT TCT</u> TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG CC	diese Arbeit
cg0996P-BamHI-fw	CGC <u>GGA TCC</u> CAT GCG CCG TTC CCA GTG	(Kleine, nicht publiziert)
cg0996P-XbaI-rv	CGC <u>TCT AGA</u> CGT ACA GCT TGC TCG TCA TC	(Kleine, nicht publiziert)
Cg0998P-BamHI-fw	CGC <u>GGA TCC</u> TCT ATC GCG CCG TCA GC	(Kleine, nicht publiziert)
Cg0998P2-rv	CGC <u>GCT AGC</u> AGG AGT TGG TTT CTG ATG G	(Kleine, nicht publiziert)
Cg2151P-BamHI-fw	TTG CGG ATG TGT TGA TCG A	(Kleine, nicht publiziert)
Cg2151P2-Nhe-rv	CGC <u>GCT AGC</u> CGT TCT CCT CAA TCT TGG A	(Kleine, nicht publiziert)
Cg2380P-BamHI-fw	CGC <u>GGA TCC</u> GGT AGT TAA CCA GAC TGT TTT G	(Kleine, nicht publiziert)
Cg2380P-XbaI-rv	CGC <u>TCT AGA</u> CCA TTG TTA CTT GCA ACC GC	(Kleine, nicht publiziert)
cg0390P_fw	CGA AAT GCT GCG CTG AAT G	diese Arbeit
cg0390P_rv	GTT CGC CAC CAT GTC AGA C	diese Arbeit

Name	Sequenz (5' → 3')	Referenz
cg0391P_fw	CGG CGC GGT GAT CGT GG	diese Arbeit
cg0391P_rv	GGT CAA CGA GAT GGG ATC C	diese Arbeit
cg2896P_fw	GCC CAA TCT GTC ATG GCT TC	diese Arbeit
cg2896P_rv	GCG CAG CCG TTG AAA AAG C	diese Arbeit
cg1109P_fw	CAT GGG GGT CGA TGT TAC C	diese Arbeit
cg1109P_rv	GTG CTG CGA ATG CTG CCA C	diese Arbeit
cg2061P_fw	GAG ATG GTG CTT TGC ACG TG	diese Arbeit
cg2061P_rv	GCA ACA AGA AGT GCT GCA GC	diese Arbeit
cg3327P_fw	GAA CAG GTG CTT GCC GTA AG	diese Arbeit
cg3327P_rv	GCA GTC CAT CAA TAA GCT GC	diese Arbeit
cg1018P_fw	CAC CAC GCC AGC CAA TCG	diese Arbeit
cg1018P_rv	GGT CCG GCG ATT CCA GCT AG	diese Arbeit
cg0623P_fw	GCT GCA GCA GCC GCT AAG	diese Arbeit
cg0623P_rv	CCA CCA CGC CCA GGG ATG	diese Arbeit
cg0624P_fw	GTG GCT TTG CTT TCA CCG TG	diese Arbeit
cg0624P_rv	CAT AGT GCG ACT GCA GCT G	diese Arbeit
cg0625P_fw	CTT CGC AAG AAC TTA CAT TTT CC	diese Arbeit
cg0625P_rv	GCT AAA GCC ACG GTT GCA G	diese Arbeit
cg0793P_fw	CTG TGG CGG ATC GGG GAG	diese Arbeit
cg0793P_rv	CAT GGC GGT GGA AAC AGC	diese Arbeit
cg1325P_fw_R7	CAT GTA GAA ACA GTC CGC C	diese Arbeit
cg1325P_rv_R7	CAT AGG CCG GAT TCC AAC C	diese Arbeit
cg0706P_fw_R7	CAC CGC TTG CCC CGC AG	diese Arbeit
cg0706P_rv_R7	CAC CGG GTC GAT TTG ATA AC	diese Arbeit
cg3322P_fw_R7	GGC CGC GAC CGA AAA AGC	diese Arbeit
cg3322P_rv_R7	CGA GGC AGC CGC AAT GAT C	diese Arbeit
cg3079P_fw_R7	GAG GGT AAG CCG CAA TAA AG	diese Arbeit
cg3079P_rv_R7	GGA TGC CTG CTG AAG AGC	diese Arbeit
cg3077P_fw_R7	GCT AAC TGT CAA TAT TGC CC	diese Arbeit
cg3077P_rv_R7	GGA GAA TTT ATT AAT CCC CC	diese Arbeit
cg0781P_fw_R7	CCG ATC ATC GGC ATC ATG	diese Arbeit
cg0781P_rv_R7	CAC CTA AAG CTT CGG AGG	diese Arbeit
cg2684P_fw_R7	GTG GTG CGT GGG CCA GAC	diese Arbeit
cg2684P_rv_R7	CAG CCA GGA CGG ACC TAG	diese Arbeit
cg3142P_fw_R7	CGT GTT CTG CCG AGA GTG	diese Arbeit
cg3142P_rv_R7	GTG CTG CTG ATC TTT CGG	diese Arbeit
cg2331P_fw_R7	GGT GAC GGA GCT TCT ACC	diese Arbeit
cg2331P_rv_R7	GTT GCG GGA GTT CTT GCG	diese Arbeit
cg2812P_fw_R7	GTG TTT CTG GGT TTA TTC GTG	diese Arbeit

Name	Sequenz (5' → 3')	Referenz
cg2812P_rv_R7	CAT CGT CCG AAT TGT TGG C	diese Arbeit
cg2444P_fw_R7	CTA TGT CCG CTA CCT GGG	diese Arbeit
cg2444P_rv_R7	CCT AAC TTC CTG TCG AGT AC	diese Arbeit
cg3264P_fw_R7	GGA CCC CCT TGA ATT GAG G	diese Arbeit
cg3264P_rv_R7	GTT GTC GAA CGA TGC CAT G	diese Arbeit
cg0451P_fw_R7	CAG CTG CGG ATG AGC AG	diese Arbeit
cg0451P_rv_R7	CAA CTC TTT ACG CCG CTG	diese Arbeit
cg0705P_fw_R7	GCA ACA GGT GGC GTG AAT C	diese Arbeit
cg0705P_rv_R7	CAG ATT TTT GAG GAC CTT TGG	diese Arbeit
cg3100P_fw_R7	GTT TAT GGC TGT TAA TTT TGC G	diese Arbeit
cg3100P_rv_R7	GTA CGG AAA CCA CAG AGT TG	diese Arbeit
cg3143P_fw_R7	CGT GTT CAT CAT GCT GTA CG	diese Arbeit
cg3143P_rv_R7	GAA CCC ACT CGG CCA GC	diese Arbeit
cg3307_fw_R7	GTC CGT GCG TCA ATA CGA AC	diese Arbeit
cg3307_rv_R7	CGG GTC AGC AAC AAT GTT GC	diese Arbeit
cg2796P_fw_R7	CCT GGC TGA GAA CAA CAC	diese Arbeit
cg2796P_rv_R7	CAT TGA GTT TGG CAG CTT CC	diese Arbeit
cg2332P_fw_R7	CTG GTC ACC CCA CAG ATA G	diese Arbeit
cg2332P_rv_R7	GCT CAA AGA CTT GAC CGG C	diese Arbeit
nlpC_prom_fw	ATG TCA CAT AGT GAG ATC ATT GCT G	(Brocker <i>et al.</i> , 2011)
nlpC_Promotor_rv	CTG CTA CAG CCT TGC GAG TTG C	(Brocker, 2006)
cg0706P_WT_Konsens_fw	CAA ACC ATC AGG GAA GAC CCT GAA CGC C	diese Arbeit
cg0706P_WT_Konsens_rv	GGC GTT CAG GGT CTT CCC TGA TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut1_fw	CGC TCC ATC AGG GAA GAC CCT GAA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut1_rv	GGC GTT CAG GGT CTT CCC TGA TGG AGC G	diese Arbeit
R7_0706_Mut2_fw	CAA ATT GTC AGG GAA GAC CCT GAA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut3_fw	CAA ACC ACT CGG GAA GAC CCT GAA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut3_rv	GGC GTT CAG GGT CTT CCC GAG TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut4_fw	CAA ACC ATC AAT TAA GAC CCT GAA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut4_rv	GGC GTT CAG GGT CTT AAT TGA TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut5_fw	CAA ACC ATC AGG GCG AGC CCT GAA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut5_rv	GGC GTT CAG GGC TCG CCC TGA TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut6_fw	CAA ACC ATC AGG GAA GAA TTT GAA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut6_rv	GGC GTT CAA ATT CTT CCC TGA TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut7_fw	CAA ACC ATC AGG GAA GAC CCA CTA CGC C	diese Arbeit
R7_0706_Mut7_rv	GGC GTA GTG GGT CTT CCC TGA TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut8_fw	CAA ACC ATC AGG GAA GAC CCT GAG GCC C	diese Arbeit

Name	Sequenz (5' → 3')	Referenz
R7_0706_Mut8_rv	GGG CCT CAG GGT CTT CCC TGA TGG TTT G	diese Arbeit
R7_0706_Mut9_fw	CAA ACC ATC AGG GAA CCC TGA ACG CC	diese Arbeit
R7_0706_Mut9_rv	GGC GTT CAG GGT TCC CTG ATG GTT TG	diese Arbeit

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen gedruckt.

Überlappende Bereiche für Crossover-PCRs sind fett gedruckt.

Ribosomenbindestellen sind kursiv gedruckt.

3 Mikrobiologische Methoden

3.1 Nährmedien

Angaben pro 1l Nährmedium

3.1.1 Luria-Bertani(LB)-Medium (Miller, 1972)

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

3.1.2 BHI-Medium

Brain Heart Infusion	37 g
----------------------	------

3.1.3 BHIS-Medium

Brain Heart Infusion	37 g
D-Sorbitol	91 g

3.1.4 CGXII-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993), modifiziert

(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
Harnstoff	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
MOPS	42 g

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Dies erfolgte durch Zugabe von circa 10 NaOH-Plätzchen und anschließender Titration mit NaOH-Lauge. Das Medium in 800 ml Gesamtvolumen 20 min autoklaviert und nach dem Autoklavieren folgende Zusätze steril zugegeben:

1% CaCl ₂	(autoklaviert)	1 ml
Spurensalze	(steril filtriert)	1 ml
Biotin (20 mg/ml)	(steril filtriert)	1 ml
Protokatechuat (30 mg/ml)	(steril filtriert)	1 ml
50% Glucose (w/v)	(steril filtriert)	80 ml

Spurensalze (pro l):

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g
MnSO ₄ x H ₂ O	10 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
CuSO ₄	0,2 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g

Die Spurensalze wurden zum Lösen mit konzentrierter HCl titriert.

Die Medien wurden je 20 min bei 121 °C, BHI und BHIS je 15 min bei 121 °C zur Sterilisierung autoklaviert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,6% Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Im Fall des Mineralmediums wurde der Agar als 2x Agar in Aqua bidest. autoklaviert.

3.2 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

3.2.1 Stammhaltung

Zur dauerhaften Stammhaltung wurden je 500 µl ÜN-Kultur mit 500 µl sterilem 87% Glyzerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die kurzfristige Lagerung erfolgte auf LB- oder BHIS-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 4 °C.

3.2.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in 5 ml LB (37 °C, *E. coli*) oder BHIS (30 °C, *C. glutamicum*) bei 170 rpm. Nach Bedarf wurden IPTG oder Antibiotika gemäß Tabelle 4 zugesetzt.

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika und Induktoren inklusive der eingesetzten Konzentration.

Antibiotikum / Induktor	Gelöst in	Endkonzentration	
		<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Kanamycin	Aqua bidest.	50 µg/ml	25 µg/ml
Chloramphenicol	100% Ethanol	25 µg/ml	7,5 µg/ml
Spectinomycin	Aqua bidest.	100 µg/ml	200 µg/ml
Tetrazyklin	70% Ethanol	10 µg/ml	-
IPTG	Aqua bidest.	1 mM	1 mM
Anhydrotetrazyklin	Aqua bidest.	-	250 ng/ml

3.2.3 Messung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Zur Verfolgung des Wachstums von Bakterienkulturen wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Die jeweilige Probe wurde zur Messung auf eine OD zwischen 0,1 und 0,8 in 1 ml Volumen eingestellt und gegen Wasser oder das Kultivierungsmedium als Referenz in 1 ml-Plastikküvetten in einem Photometer gemessen (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare, München, ehemals Amersham Biosciences). Die Verdünnung erfolgte im Referenzmedium.

3.2.4 Anzucht zur Isolierung von RNA für DNA-Microarrays

Die zu untersuchenden *C. glutamicum* Stämme wurden nach Bedarf aus Glycerinkultur ausgestrichen oder transformiert. Einzelkolonien hiervon wurden auf eine zweite Agarplatte umgestrichen. Die erste Vorkultur wurde in 5 ml BHIS im Röhrchen bei 30 °C und 170 rpm über Tag geschüttelt. Die zweite Vorkultur wurde in 50 ml des für die Hauptkultur vorgesehenen Mediums im 500 ml Schikanekolben bei 120 rpm und 30 °C im Minitron (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) geschüttelt. Da diese Kultur morgens noch in der exponentiellen Phase sein sollte, wurde sie entweder auf OD₆₀₀ 0,02 angeimpft und ungefähr 15 h über Nacht geschüttelt oder auf OD₆₀₀ 0,5 angeimpft, 6-10 h gekühlt (8 °C) und dann ungefähr 6 h bei 30 °C geschüttelt. Zur Anzucht der Hauptkultur gab es drei alternative Vorgehensweisen: Erstens bestand die Möglichkeit, die Hauptkultur in 50 ml des gewünschten Mediums im 500 ml Schikanekolben auf OD₆₀₀ 0,5 anzuimpfen, bis OD₆₀₀ 2 zu kultivieren und dann zu ernten. Zweitens konnte die Hauptkultur in 50 ml des gewünschten Mediums im 500 ml Schikanekolben auf OD₆₀₀ 0,5 angeimpft werden und bei OD₆₀₀ 2 für 1 h oder 4 h induziert kultiviert werden. Drittens konnte die Hauptkultur in 50 ml des gewünschten Mediums im 500 ml Schikanekolben auf OD₆₀₀ 0,5 angeimpft werden

und bei OD₆₀₀ 2 in zwei gleiche Kulturen geteilt und die eine Kultur für 1 h oder 4 h induziert und die zweite Kultur für 1 h oder 4 h uninduziert kultiviert werden. Zur Ernte wurden circa 20 ml Kultur auf 20 g Eis, das im 50 ml-Falcon auf -20 °C vorgekühlt war, 3 min bei 4 °C und 4500 g (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5810R, Rotor A-4-44, 5000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand und das Eis wurden abgeschüttet, das Pellet noch einmal anzentrifugiert und der übrige Überstand quantitativ per Pipette abgenommen. Das flüssigkeitsfreie Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Proteinexpression mit *E. coli*

Zur Proteinherstellung wurde *E. coli* BL21 (DE3) jeweils mit dem gewünschten pET-28b-Derivat transformiert. Je nach Bedarf wurden 100 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum im 500 ml Erlenmeyerkolben oder 500 ml im 2 l Erlenmeyerkolben 1:100 mit ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm im ISF-4-W (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3–0,6 kultiviert. Die Expression des Zielgens wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Expression bei 150 rpm und 20 °C im Minitron (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) 4–6 h durchgeführt. Die Zellen wurden durch 20 min Zentrifugation bei 6370 g (Beckmann Avanti J-25, Rotor JA-10, 6000 rpm) geerntet und bis zum Aufschluss bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Proteinexpression und –sekretion in *C. glutamicum*

Zur Proteinexpression und –sekretion wurde *C. glutamicum* mit dem gewünschten Expressionsvektor transformiert, Transformanten über Nacht in 5 ml BHIS mit den erforderlichen Selektionsmarkern bei 30 °C und 170 rpm im ISF-4-W (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) kultiviert und für die Expression in frischem BHIS-Medium oder CGXII-Medium mit den erforderlichen Selektionsmarkern und Induktoren auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft und 4 h bei 30 °C und 170 rpm im ISF-4-W (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) kultiviert. Geerntet wurden je nach Bedarf 2–4 ml Kultur und 1,8–3,6 ml Kulturüberstand durch Zentrifugation (4 °C, 13226 g in einer Tischzentrifuge, 10 min). Das Zellpellet wurde bis zum Aufschluss (siehe 6.1.1) bei -20 °C gelagert, Kulturüberstände wurden wie unter 6.1.2 beschrieben weiterbehandelt.

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 DNA-Isolierung

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des Mini Kits (Fermentas)

Die Plasmid-Isolierung aus 5 ml ÜN-Kultur erfolgte mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits nach Angaben des Herstellers, wobei *C. glutamicum* vor der alkalischen Lyse zwei bis drei Stunden bei 37 °C in der empfohlenen Menge Lysepuffer mit 20 mg/ml Lysozym geschwenkt wurde.

4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe des Midi Kits (Qiagen)

Die Plasmid-Isolierung aus 50-100 ml ÜN-Kultur erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits nach Angaben des Herstellers, wobei *C. glutamicum* vor der alkalischen Lyse zwei bis drei Stunden bei 37 °C in der empfohlenen Menge Lysepuffer mit 20 mg/ml Lysozym geschwenkt wurde.

4.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus *C. glutamicum* mit Hilfe des Dneasy Blood & Tissue Kits (Qiagen)

Die Plasmid-Isolierung aus 2 ml ÜN-Kultur erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Dneasy Blood & Tissue Kits nach Angaben des Herstellers, wobei *C. glutamicum* zwei Stunden bei 37 °C in der empfohlenen Menge Enzymlösung geschwenkt wurde.

4.2 DNA- / RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- oder RNA-Proben erfolgte mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers oder durch Abschätzung der Menge auf einem Agarosegel anhand des Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladders.

4.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurden diese mit 10x Probenpuffer versetzt und bei 80-110 Volt in 0,8-2%igen TAE-Agarosegelen in TAE-Puffer 30-90 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel ungefähr 5 Min in der Färbelösung gefärbt und wenige Minuten in der Entfärbelösung entfärbt. Zur Dokumentation wurde es unter UV-Licht fotografiert. Gele, die zur Aufarbeitung von

DNA angefertigt wurden, wurden fotografiert und das zu eluierende Gelstück auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 4.4 beschrieben.

Benötigte Lösungen:

TAE-Puffer (Laufpuffer)	40 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	20 mM	Essigsäure (96%)
	2,5 mM	Na ₂ EDTA
Agarose-Gel	0,8-2%	Agarose in 1x TAE-Puffer (je nach Größe des DNA-Fragments)
Färbelösung	0,25 µg/ml	Ethidiumbromid in ddH ₂ O
Entfärbelösung	ddH ₂ O	
10x Ladepuffer	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	50% (v/v)	Glyzerin
	0,25 mM	Na ₂ EDTA, pH 8
Marker	3 µl	Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
	oder 3 µl	Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

4.4 Aufreinigung von DNA

DNA, die mit Hilfe eines präparativen Agarose-Gels gereinigt wurde, wurde anschließend mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder mittels MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entsalzt.

DNA aus einer PCR oder nach einem Restriktionsverdau wurde anschließend mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder mittels MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entsalzt.

4.5 Amplifikation von DNA per PCR (Polymerasekettenreaktion)

DNA wurde mit der DreamTaq™ Green DNA Polymerase (Fermentas), mit dem Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix mit GC-Puffer (Finnzymes) oder mit dem High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) nach Angaben des jeweiligen Herstellers in Thermocyclern (T3 oder T3000, Biometra, Göttingen) amplifiziert. Die benötigten Primer (Oligonukleotide) wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und ihre Schmelztemperatur mit Oligo Calc (Salt Adjusted) (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) berechnet.

4.6 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.7 Dephosphorylierung von DNA

Dephosphorylierung von geschnittener DNA wurde bei Bedarf, um die Rezirkularisierung linearisierter Vektorenbackbones zu verhindern, mit Hilfe der FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.8 Ligation von DNA

Ligation von DNA wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) oder der T4 DNA Ligase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Standardmäßig wurden 50 ng Vektor und Insert im vierfachen molaren Überschuss eingesetzt.

4.9 Klonierungen

Zur Klonierung des Plasmids pEKEx2Linker::CgtR2 wurde das Plasmid pET-28b::Nhis-CgtR2 (Brocke, nicht veröffentlicht) mit dem Restriktionsenzym *NdeI* und das Plasmid pEKEx2Linker (Müller, nicht veröffentlicht) mit dem Restriktionsenzym *Acc65I* geschnitten. In beiden Vektoren wurden die überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Fragment (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers aufgefüllt, beide Vektoren mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten und das CgtR2 enthaltende Fragment aus pET-28b::Nhis-CgtR2 blunt beziehungsweise über *NotI* in den Vektor pEKEx2Linker kloniert.

Zur Klonierung des Plasmids pEKEx2Linker::CgtR7 wurde das Plasmid pET-28b::Nhis-CgtR7 (Brocke, nicht veröffentlicht) mit dem Restriktionsenzym *NdeI* und das Plasmid pEKEx2Linker (Müller, nicht veröffentlicht) mit dem Restriktionsenzym *Acc65I* geschnitten. In beiden Vektoren wurden die überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Fragment (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers aufgefüllt, beide Vektoren mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten und das CgtR7 enthaltende

Fragment aus pET-28b::Nhis-CgtR7 blunt beziehungsweise über *NotI* in den Vektor pEKEEx2Linker kloniert.

Zur Klonierung des Plasmids pEKEEx3::CgtR2 wurde aus dem Plasmid pEKEEx2Linker::CgtR2 das CgtR2 enthaltende Fragment über die Schnittstellen *HpaI* und *EcoRI* geschnitten und über dieselben Schnittstellen in das Plasmid pEKEEx3 (Hoffelder *et al.*, 2010) kloniert.

Zur Klonierung des Plasmids pEKEEx3::CgtR7 wurde aus dem Plasmid pEKEEx2Linker::CgtR7 das CgtR7 enthaltende Fragment über die Schnittstellen *PstI* und *EcoRI* geschnitten und über dieselben Schnittstellen in das Plasmid pEKEEx3 (Hoffelder *et al.*, 2010) kloniert.

Zur Klonierung des Plasmids pCLTON2 wurde das Fragment mit dem Gen für die Spectinomycin-Resistenz aus dem Plasmid pEKEEx3 (Hoffelder *et al.*, 2010) über die Schnittstellen *PstI* und *MunI* anstelle des Fragments mit dem Gen für die Kanamycin-Resistenz über dieselben Schnittstellen in pCLTON1 kloniert (Lausberg *et al.*, 2012).

Zur Klonierung des Plasmids pCLTON2::CgtR2 wurde CgtR2 über die Restriktionsschnittstelle *HindIII* aus pEKEEx3::CgtR2 ausgeschnitten, die überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Fragment (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers aufgefüllt und blunt in das Plasmid pCLTON2, das über die Restriktionsschnittstelle *SmaI* geschnitten wurde, kloniert. Ob das Fragment mit CgtR2 richtig herum im Plasmid war, wurde mit einem asymmetrischen Verdau überprüft (siehe 4.6).

Zur Klonierung des Plasmids pET-28b::CgtR2 wurde das Plasmid pET-28b::Nhis-CgtR2 über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NdeI* geschnitten, die überhängenden 5'-Enden mit Klenow-Fragment (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, U.S.A.; ehemals Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers aufgefüllt und religiert. Mit Hilfe eines Restriktionsverdaus wurde geprüft, ob die Sequenz für den His-Tag herausgeschnitten wurde (siehe 4.6).

Wenn das Insert per PCR amplifiziert wurde, wurde die Sequenz durch eine Sequenzierung überprüft (siehe 4.11).

4.10 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

4.10.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach der CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972), modifiziert

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 50 ml LB-Medium im 500 ml Erlenmeyerolben mit 400 µl Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 170 rpm bis OD₆₀₀ 0,4-0,8 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min bei 4500 g und 4 °C geerntet (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5810R, Rotor A-4-44, 5000 rpm) und der Überstand wie auch in allen folgenden Schritten verworfen. Die Pellets wurden in 40 ml steriler, eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung per Pipette resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut 10 min bei 4500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml steriler, eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung mit 10% Glycerin resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Nutzung bei -80 °C gelagert.

Benötigte Lösungen:

CaCl ₂ -Lösung	100 mM	CaCl ₂ -Lösung, steril, eiskalt
CaCl ₂ -Lösung mit 10% Glycerin	100 mM	CaCl ₂ -Lösung mit 10% (v/v) Glycerin, steril, eiskalt

4.10.2 Herstellen elektrokompeter *C. glutamicum* Zellen (van der Rest *et al.*, 1999), modifiziert

Zur Herstellung elektrokompeter *C. glutamicum* Zellen wurden 50 ml BHIS mit einer Einzelkolonie eines Ausstrichs von *C. glutamicum* beimpft und über Nacht bei 30 °C und 120 rpm im ISF-4-W Schüttler (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 5 ml dieser Übernachtskultur in 250 ml BHIS in einem 1 l Schikanekolben bei 30 °C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 20 min Zentrifugation bei 6370 g und 4 °C (Beckmann Avanti J-25, Rotor JA-10, 6000 rpm) geerntet. Der Überstand wurde wie auch in allen folgenden Schritten verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin in 12 ml eiskaltem TG-Puffer per Pipette, durch Vortexen oder durch Schwenken resuspendiert und für 10 min bei 4 °C und 4500 g (Eppendorf-Zentrifuge, Typ 5810R, Rotor A-4-44, 5000 rpm) zentrifugiert. Die Resuspension in 12 ml TG-Puffer und anschließende Zentrifugation wurde wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet zweimal in 12 ml 10%igem, eiskaltem Glycerin gewaschen, wobei die Zentrifugation wieder bei 4 °C und 4500 g erfolgte. Zuletzt wurde das Zellpellet in

2 ml eiskaltem, 10%igem Glyzerin aufgenommen und in 170 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Benötigte Lösungen:

TG-Puffer	1 mM	Tris-HCl
	10%	Glyzerin (v/v), pH 7,5, steril, eiskalt
10% Glyzerin	10%	Glyzerin (v/v), steril, eiskalt

4.10.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden die vorbereiteten Zellen auf Eis aufgetaut und 150 µl kompetente Zellen auf 50-100 ng Plasmid-DNA oder einen Ligationsansatz gegeben und durch Pipettieren gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis folgten ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C und anschließend eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Zur Ausprägung der Selektionsresistenz wurden 800 µl LB zugegeben und der Ansatz 30-90 min bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt. Ligationsansätze wurden danach durch einminütige Zentrifugation pelletiert (Tischzentrifuge, 15871 g), resuspendiert und auf LB-Platten mit den erforderlichen Selektionsmarkern plattiert. Bei der Transformation von Plasmiden wurden 50 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit den erforderlichen Selektionsmarkern ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.10.4 Transformation elektrokompetenter *C. glutamicum* Zellen

Zur Elektroporation von *C. glutamicum* wurden 50 µl Zellen mit 0,5-3 µg Plasmid-DNA gemischt und in eine bei -20 °C vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt. Der Elektroporationsansatz wurde vorsichtig mit 800 µl eiskaltem, 10%igem Glyzerin (v/v) überschichtet. Die Elektroporation erfolgte bei 12,5 kV/cm, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem Gene PulserTM Xcell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Direkt nach dem elektrischen Puls wurde die Zellsuspension in 4 ml auf 46 °C vorgewärmtes BHIS-Medium überführt und für 6 min bei 46 °C inkubiert. Nach diesem Hitzeschock wurden die Zellen mindestens 2 min auf Eis abgekühlt und dann 90 min bei 30 °C und 170 rpm im ISF-4-W Schüttler (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) regeneriert. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur und 1578 g (Zentrifuge der Eppendorf AG (Hamburg) Typ 5810R, Rotor A-4-81, 2800 rpm)

pelletiert, in 100-200 µl BHIS-Medium resuspendiert, auf BHIS-Platten mit den entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert und für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

4.11 Sequenzierung von DNA

Sequenzierung von DNA wurde durch die Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder LGC Genomics GmbH (ehemals AGOWA, Berlin) durchgeführt.

4.12 Konstruktion von Deletionsmutanten in *C. glutamicum* (Schäfer *et al.*, 1994), modifiziert

Die Konstruktion von „in frame“ Deletionsmutanten erfolgte mit Hilfe des Plasmids pK19*mobsacB* und einem durch Crossover-PCR hergestellten Insertionsfragment, das nur noch wenige Basen des zu deletierenden Gens enthält, und wurde für *C. glutamicum* in dieser Art 2001 beschrieben (Schäfer *et al.*, 1994, Link *et al.*, 1997, Niebisch & Bott, 2001). Dafür wurden per Crossover-PCR ungefähr 500 bp des „Upstreambereichs“ des zu deletierenden Gens inklusive der ersten 18 bp des Gens mit einem 21 bp langen Linker an ungefähr 500 bp des „Downstreambereichs“ des zu deletierenden Gens mit den letzten 39 bp des Gens inklusive des Stopcodons fusioniert. Dieses Konstrukt wurde mit Hilfe des Vektors pK19*mobsacB*, der in *C. glutamicum* nicht replizieren kann, in das Genom integriert. Integranten wurden mittels Selektion auf Kanamycinresistenz erhalten. Durch einen zweiten Rekombinationsschritt kann das Plasmid wieder aus dem Genom heraus rekombinieren und dabei entweder eine Deletionsmutante oder wieder den Wildtyp erzeugen. Hierfür wurden Integranten über Nacht in 5 ml BHIS-Medium bei 30 °C und 170 rpm im ISF-4-W Schüttler (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) inkubiert. Aus diesen Kulturen wurden je 2 ml pelletiert und in 5 ml CGXII-Medium ohne N-Quelle und ohne P-Quelle weitere 6 h bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Aus diesen Kulturen wurden jeweils 100 µl der Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-4} auf BHIS-Agarplatten mit 10% (w/v) Saccharose plattiert. Die Verdünnung wurde zusätzlich auf BHIS-Agarplatten mit 10% (w/v) Saccharose und 25 µg/ml Kanamycin plattiert, um zu überprüfen, ob das *sacB*-Gen, das für *C. glutamicum* in Anwesenheit von Saccharose toxisch ist, in den meisten Klonen noch intakt ist (Jäger *et al.*, 1992). Im Fall eines intakten *sacB*-Gens wurde überprüft, ob die erhaltenen Klone Kanamycin-

sensitiv sind. Kanamycin-sensitive Klone wurden per Kolonie-PCR mit Primern, die außerhalb des deletierten Bereichs binden, auf die Deletion überprüft.

5 Genomweite Transkriptionsanalysen mit Hilfe von DNA-Microarrays

5.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde das flüssigkeitsfreie bei -80 °C gelagerte Zellpellet (siehe 3.2.4) auf Eis aufgetaut und in 400 µl RLT-Puffer (Kit) mit 1 mM DTT resuspendiert. Die Suspension wurde in einer Speedmill P12 (Analytic Jena AG, Jena) mit circa 0,5 g Zirkonium / Silica Perlen, 0,1 mm Durchmesser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für 3 min aufgeschlossen. Anschließend folgte ein zweiminütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13226 g, um Zelltrümmer und Zirkonium / Silica Perlen abzutrennen. Circa 350 µl Überstand wurden mit 250 µl -20 °C kaltem absoluten Ethanol durch pipettieren gemischt und nach den Angaben für Hefezellen über die im Kit vorhandenen Säulchen inklusive des DNase-Verdaus auf den Säulchen aufgereinigt.

5.2 Analyse der isolierten RNA mit Hilfe von denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel

Zur Analyse der Qualität der isolierten RNA wurde 1 µg RNA (siehe 4.2) mit 5x RNA-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 65 °C inkubiert und bei 100 V für 3 h aufgetrennt. Die Färbung erfolgte wie unter 4.3 beschrieben.

Benötigte Lösungen:

10x FA-Puffer	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	Na ₂ EDTA, pH 7,0 (mit NaOH eingestellt)
1x FA-Puffer (frisch angesetzt)	25 ml	10x FA-Puffer
	5 ml	Formaldehyd (37%)
	220 ml	DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O	ddH ₂ O	mit 0,1% (v/v) DEPC, 1 h bei 37 °C oder über Tag bei RT gerührt, überschüssiges DEPC wird durch Autoklavieren oder über Nacht bei 60 °C zersetzt

1,2% FA-Agarosegel	0,6 g	Agarose
	5 ml	10x FA-Puffer ad 50 ml DEPC-H ₂ O, aufgekocht, auf 65 °C abgekühlt, 0,9 ml Formaldehyd (37%) zugegeben. Gel vor Nutzung mindestens 30 min in 1x FA-Puffer äquilibriert
5x RNA-Ladepuffer	60 µl	gesättigte Bromphenolblaulösung
	80 µl	0,5 M Na ₂ EDTA, pH 8,0
	720 µl	Formaldehydlösung (37%)
	2 ml	Glycerin (99%)
	4 ml	10x FA-Puffer
	3 ml	Formamid

5.3 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA

Für genomweite Transkriptionsvergleiche wurden jeweils 20-25 µg RNA der zu vergleichenden Stämme mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und dabei fluoreszenzmarkiert. Die verwendeten Enzyme und Puffer stammten von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt, ehemals Invitrogen), falls nicht anders gekennzeichnet. Die gewünschte Menge RNA wurde mit RNase-freiem H₂O auf 14 µl aufgefüllt, 1 µl Random Primers (0,5 µg/µl) zugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach zweiminütiger Kühlung auf Eis wurden 9,6 µl RT-Mix (6 µl 5x First-Strand Buffer, 3 µl 0,1 mM DTT, 0,6 µl dNTPs (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 10 mM dTTP)), 2 µl Superscript II und 3 µl 1 mM Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP (GE Healthcare, München) zugegeben, die Mischung 10 min bei 20 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend 110 min bei 42 °C die fluoreszenzmarkierte cDNA synthetisiert. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 10 µl 0,1 N NaOH 10 min bei 70 °C degradiert und der Ansatz durch Zugabe von 10 µl 0,1 N HCl wieder neutralisiert. Nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte dUTPs wurden durch dreimaliges Auffüllen auf 500 µl und anschließendes Einengen mit Hilfe einer Membran (Microcon, YM-30, Millipore, Schwalbach oder Nanosep, 30K Omega, Pall Life Sciences, Port Washington, U.S.A.) abgetrennt. Jedes Experiment wurde in drei biologischen Replikaten angefertigt, wobei die Fluoreszenzmarkierung in einem der Experimente umgekehrt als sonst erfolgte (colour swap).

5.4 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA auf DNA-Microarrays

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Microarrays stammten von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und beinhalteten 3057 ORFs von *C. glutamicum*, 1294 intergene Regionen, 60 tRNAs, 15 rRNAs und 140 sonstige Spots und Kontrollen (T. Polen, persönliche Kommunikation). Alle Spots waren je zweimal auf dem DNA-Microarray vorhanden. Vor der Hybridisierung wurden die DNA-Microarrays 1 h in 42 °C warmer Prähybridisierungslösung geschwenkt, 5 min in Wash 1 geschwenkt, 1 min in H₂O (bidest) gewaschen und in Falcons 5 min bei 520 g trocken zentrifugiert. Für die Hybridisierung wurde ein AO-Mixer (BioMicro Systems, Inc., Salt Lake City, U.S.A.) auf den DNA-Microarray aufgeklebt, die vereinigte fluoreszenzmarkierte cDNA der zu vergleichenden Stämme, die zuvor auf 5 µl eingengt (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg), mit OpArray Hyb Buffer (Eurofins MWG Operon Ebersberg) auf 51 µl aufgefüllt und 3 min bei 95 °C denaturiert wurde, in den Mixer pipettiert und dieser luftdicht und luftblasenfrei zugeklebt. Die Hybridisierung erfolgte 14-16 h bei 42 °C in einer Maui Hybridization System Mischkammer (BioMicro Systems, Inc., Salt Lake City, U.S.A.), in der die cDNA aktiv auf dem DNA-Microarray gemischt wird. Um Hintergrundfluoreszenz zu entfernen wurde der AO-Mixer am nächsten Tag in Wash 2 entfernt, der DNA-Microarray 10 min in Wash 2 geschwenkt, 10 min in Wash 3 geschwenkt, 5 min in Wash 4 geschwenkt und in Falcons 5 min bei 520 g trocken zentrifugiert.

Benötigte Lösungen:

Prähybridisierungslösung	1% Na-Citrat
	5% NaCl
	0,2% SDS
	0,05% BSA
Wash A	20% Na-Citrat
	10% NaCl
Wash B	5% SDS
Wash 1	1,25 ml Wash B ad 50 ml, 37 °C, filtrieren (0,2 µm)
Wash 2	5 ml Wash A
	2,5 ml Wash B ad 50 ml, 42 °C, filtrieren (0,2 µm)
Wash 3	5 ml Wash A ad 50 ml, 37 °C, filtrieren (0,2 µm)
Wash 4	1 ml Wash A ad 50 ml, 25-30 °C, filtrieren (0,2 µm)

5.5 Auslesen der DNA-Microarrays

Die DNA-Microarrays wurden mit einem GenePix 4000B Laser Scanner (Molecular Device LLC, Sunnyvale, U.S.A., ehemals Axon Instruments Inc., Union City, U.S.A.) bei 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5) mit einer Auflösung von 10 µm pro Bildpixel ausgelesen und mit Hilfe der Software GenePix Pro 6.0 im TIF-Format gespeichert. Das Fluoreszenzverhältnis von Cy5 zu Cy3 spiegelt das mRNA-Verhältnis zwischen den Genen der verglichenen Stämme wider (Shalon *et al.*, 1996).

5.6 Auswertung der DNA-Microarray-Daten

Zur Auswertung der Daten eines DNA-Microarrays wurde mit GenePix Pro 6.0 und einer „Gene Array List (GAL-File)“ die DNA-Spots auf dem Microarray den zugehörigen Genen oder Regionen des Genoms von *C. glutamicum* zugeordnet und per Sichtprüfung sichergestellt, dass der jeweilige Spot korrekt erkannt wurde. Die Daten dieser Spot-Analyse wurden als GPR-Datei gespeichert. Anschließend wurden die GPR-Daten mit den Bioconductor R Paketen marray und limma ausgewertet (Qualitätskontrolle) und die Verhältnis-Werte normalisiert (Lowess), um die relativen mRNA-Verhältnisse verschiedener Experimente miteinander vergleichen zu können (Dudoit & Yang, 2003, Smyth, 2005). Dies erfolgte mit der Software Chiphandling (Polen, nicht publiziert). Die relevanten Daten und normalisierten Verhältnisse wurden zusammen mit detaillierten Informationen zum Experiment nach dem MIAME-Standard in der „In-house“ DNA-Microarray-Datenbank gespeichert (Brazma *et al.*, 2001, Polen & Wendisch, 2004). Für die weitere Auswertung wurden nur Spots berücksichtigt, deren Intensität für mindestens eine Fluoreszenz fünffach stärker als die des Hintergrunds war und die ein mindestens zweifach verändertes mRNA-Verhältnis (≥ 2 oder $\leq 0,5$) aufwiesen. Als signifikant reguliert wurden Gene mit p -Wert $\leq 0,05$ betrachtet (Student, 1908).

6 Biochemische Methoden

6.1 Analyse von Proteinexpression und –sekretion in *C. glutamicum*

Benötigte Lösungen:

Lysepuffer	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	25 mM	MgCl ₂
	200 mM	NaCl
TCA	100%	TCA

Tris-HCl pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
5x Laemmli	250 mM	Tris-HCl pH 6,8
	10% (w/v)	SDS
	50% (v/v)	Glyzerin
	0,5% (w/v)	Bromphenolblau
	500 mM	DTT
Trenngel (10% / 12,5%)	10% / 12,5%	Acrylamid / N,N-Methylenbisacrylamid (37,5/1)
	375 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	0,1% (w/v)	SDS
	9,28% (v/v)	Glyzerin
	0,1% (w/v)	APS
	0,067% (v/v)	TEMED
Sammelgel (5%)	5%	Acrylamid / N,N-Methylenbisacrylamid (37,5/1)
	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0,067%	TEMED
Laufpuffer	25 mM	Tris Base
	192 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS

6.1.1 Aufschluss von *C. glutamicum* Zellen

Zellpellets von *C. glutamicum* wurden nach der Anzucht (siehe 3.2.6) aufgeschlossen oder bis zum Aufschluss bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde je nach der bei Ernte gemessenen OD₆₀₀ in 100-200 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 0,3 g Glasperlen (0,25-0,3 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) 30 min in einer Schwingmühle (100 min⁻¹, Typ MM2, Retsch GmbH, Haan) aufgeschlossen. Anschließend wurden Zelltrümmer und Glasperlen 10 min bei 4 °C und 18320 g (Sigma 4K10, 15300 rpm) pelletiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde für die SDS-Gelelektrophorese mit der entsprechenden Menge 5x Laemmli versetzt und 10 min bei 95 °C aufgekocht.

6.1.2 Aufarbeitung von Kulturüberständen von *C. glutamicum*

Kulturüberstände wurden nach der Anzucht (siehe 3.2.6) mit 1/9 Vol 100%iger TCA versetzt und somit Proteine über Nacht bei 4 °C gefällt. Diese wurden durch 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 18320 g sedimentiert, mit je 500 µl 100%igem -20 °C kaltem Aceton und 80%igem -20 °C kaltem Aceton gewaschen (Zentrifugation jeweils 4 °C, 18320 g). Anschließend wurde das Proteinpellet in einer

Vakuummzentrifuge für 10 min getrocknet (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg) und je nach der bei Ernte gemessenen OD₆₀₀ in 40-80 µl Tris pH 7,5 durch Schwenken bei 30 °C für 30 min gelöst. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde die Lösung mit der entsprechenden Menge 5x Laemmli versetzt und 10 min bei 95 °C aufgeköcht.

6.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970), modifiziert

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierzu wurden 10%ige oder 12,5%ige Trenngele mit 5%igen Sammelgelen gegossen. Die Auftrennung erfolgte bei 16 mA pro Gel in Laufpuffer bei Raumtemperatur.

6.1.4 Färbung von SDS-Gelen

Die Färbung der SDS-Gele erfolgte entweder 30 min in Coomassie-Lösung (40% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% (w/v) Coomassie R250, über Nacht ruhen lassen, durch Faltenfilter filtrieren) und folgender Entfärbung (10% (v/v) Essigsäure) bis zum gewünschten Grad oder über Nacht in kolloidaler Coomassie-Lösung (0,02 % (w/v) Coomassie G250, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, 10 % (v/v) Ethanol (96 %), 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (100 %), dunkelgrün, mit Farbstoffaggregaten) (Kang *et al.*, 2002), modifiziert. Für die kolloidale Färbung wurde das Gel vorher drei Mal 10 min in ddH₂O geschwenkt. Eine Entfärbung war mit dieser Methode nicht notwendig.

6.2 Western Blot (Towbin *et al.*, 1979), modifiziert

Die Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte nach Angaben des Herstellers in „Mini Trans-Blot® Cell“ Tank Blot Kammern (Bio-Rad, München) in Blotpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin) für 45 min bei 350 mA. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindestellen des Western Blots 1 h in 5% Magermilchpulver (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in TBST (20 mM Tris / HCl, 136,9 mM NaCl, 0,1% (v/v) Twenn-20, pH 7,5) bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in der angegebenen Konzentration (Tabelle 5) gegen das nachzuweisende Protein erfolgte bei 4 °C über Nacht. Daraufhin wurde der Western Blot drei Mal 10 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen, 1,5 h im

sekundären Antikörper 1:15000 in TBST inkubiert und erneut drei Mal 10 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit dem Amersham™ ECL™ Gel Western Blotting System (GE Healthcare, München) nach Angaben des Herstellers. Die Aufnahme der Chemolumineszenz erfolgte mit einer LAS-3000 Mini CCD-Kamera (GE Healthcare, München, ehemals Fujifilm) und die Auswertung mit der Software AIDA Image Analyzer (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) durchgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Antikörper gegen	Antikörper aus	polyklonal / monoklonal	eingesetzte Konzentration
Anti-GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	Maus	Mischung zweier monoklonaler Antikörper (Klon 7.1 und 13.1)	1:1000 einer 0,4 mg/ml- Lösung
Anti-GFP (B. Kleine)	Hase	Serum	1:50000
Anti-His ₆ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)	Maus	Monoklonal	1:1000
Anti-MalE (K.-L. Schimz)	Hase	Serum	1:1000
Anti Mouse IgG, konjugiert mit HRP (GE Healthcare, München)	Schaf		1:15000
Anti Rabbit IgG, konjugiert mit HRP (GE Healthcare, München)	Esel		1:15000

6.3 Herstellung von löslichem Rohextrakt mit *E. coli*

Die Herstellung von löslichem Rohextrakt aus *E. coli* zur Aufreinigung von Proteinen erfolgte durch Zellyse mit Hilfe von Ultraschall. Hierfür wurde ein Zellpellet aus 250 ml Kulturvolumen (siehe 3.2.5) in 2-3 ml TNI⁺⁵ (20 mM Tris / HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 5 mM Imidazol) mit Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) resuspendiert und in zwei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen jeweils 4 min mit einer Pulslänge („Duty Cycle“) von 30% und einer Beschallintensität („Output control“) von 3 mit dem Ultraschalldesintegrator Branson Sonifier W-250 (Branson Sonic Power Company, Danbury, U.S.A.) in einem gerührten Eisbad aufgeschlossen. Anschließend wurden in einem Tischzentrifugationsschritt bei 4 °C und 18320 g für 10 min (Sigma 4K15,

15300 rpm, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode) Zelltrümmer, nicht aufgeschlossene Zellen und, falls vorhanden, „Inclusion bodies“ abgetrennt und aus dem Überstand wurden im folgenden Ultrazentrifugationsschritt bei 4 °C und 229600 g für 1 h (50000 rpm, Optima™ L-80 XP, Rotor Ti 70.1, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) Membranproteine sedimentiert. Aus dem löslichen Rohextrakt (Überstand des Ultrazentrifugationsschrittes) wurde per Nickel-NTA-Affinitätschromatographie das gewünschte Protein aufgereinigt.

Für die unmittelbare Verwendung des löslichen Rohextrakts für Gelretardationsexperimente im Fall von CgtR2 erfolgte der Zellaufschluss direkt in 1x Bandshiftpuffer (50 mM Tris / HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₂EDTA, 10% (v/v) Glycerin) mit Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und Phosphataseinhibitoren (1 mM Natriummolybdat, 0,1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM diNatriumtartrat und 0,1 mM Natriumpyrophosphat) zur Hemmung von eventuell vorhandenen Phosphataseaktivitäten.

6.4 Aufreinigung von Proteinen mit Hexahistidintag mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose

Für die Aufreinigung von Proteinen mit Hexahistidintag wurde eine Säule mit 1 ml Bettvolumen nach Angaben des Herstellers mit Ni²⁺-NTA-Agarose gepackt (Qiagen, Hilden). Die Säule wurde mit 10 Volumen ddH₂O gewaschen, mit 10 Volumen TNI⁺⁵ (siehe 6.3) äquilibriert, der lösliche Rohextrakt mit dem zu reinigenden Protein geladen (siehe 6.3), der Durchfluss des löslichen Rohextrakts erneut geladen und anschließend mit 20 Volumen TNI⁺²⁰ (20 mM Tris / HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 20 mM Imidazol) und 6 Volumen TNI⁺⁵⁰ (20 mM Tris / HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 50 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 Volumen TNI⁺²⁰⁰ (20 mM Tris / HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 200 mM Imidazol) à 1 ml. Übrige gebundene Proteine wurden mit 10 Volumen TNI⁺⁴⁰⁰ (20 mM Tris / HCl, pH 7,9, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 400 mM Imidazol) entfernt. Vor der Lagerung in 20% (v/v) Ethanol wurde die Säule mit 15 Volumen ddH₂O gewaschen. Die Verteilung der Proteinmengen in den Elutionsfraktionen wurde mit Hilfe des Bradford-Schnelltests abgeschätzt. Hierzu wurden 2 μ l Eluat mit 20 μ l Bradford-Reagenz (0,01% Coomassie Brilliant Blue G250, 5% (v/v) Ethanol (96%), 10% (v/v) Phosphorsäure (85%), filtriert) gemischt und je mehr

Protein enthalten war desto intensiver blau färbte sich die Mischung. Die genaue Analyse der Aufreinigung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

6.5 Umpufferung von gereinigtem Protein per PD-10 Säule

Die Umpufferung von gereinigtem Protein erfolgte sofort nach der Aufreinigung mit den proteinreichsten Fraktionen nach Angaben des Herstellers in 1x Bandshiftpuffer.

6.6 Thrombin-Verdau

Der Thrombin-Verdau erfolgte mit dem Thrombin Cleavage Capture Kit (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt). Pro 1 µg CgtR2 wurden 0,2 U Thrombin über Nacht bei Raumtemperatur eingesetzt. Die Abtrennung des Thrombin erfolgte nach Angaben des Herstellers.

6.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde mit Hilfe der Absorption bei 280 nm per Nanodrop ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers bestimmt (Stoscheck, 1990). Der molare Extinktionskoeffizient wurde mittels ExPASy Server anhand der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins berechnet (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2003). Der molare Extinktionskoeffizient betrug für CgtR2 $14,565 \cdot 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (MG=28,09 kDa) und für CgtR7 $9,97 \cdot 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (MG=26,62 kDa). Die Proteinkonzentration von löslichem Rohextrakt wurde mit Bradfordreagenz bestimmt (Bradford, 1976). Hierzu wurden jeweils 100 µl entsprechend verdünnter Rohextrakt mit 900 µl Bradfordreagenz gemischt und nach 5 min bei 595 nm die Absorption gemessen. Ein Nullwert mit entsprechendem Puffer wurde abgezogen. Die Kalibriergerade wurde mit 20-100 µg/ml BSA erstellt.

6.8 Gelretardationsexperimente

Für Gelretardationsexperimente wurden die zu testenden Promotorbereiche per PCR amplifiziert (siehe 4.5), aufgereinigt, in ddH₂O eluiert und auf eine Konzentration von 35 ng/µl in 1x Bandshiftpuffer (siehe 6.3) eingestellt. Der zu untersuchende Antwortregulator (aufgereinigt oder in Rohextrakt) wurde 1 h in 50 mM Phosphodonor (Phosphoamidat (Phosphoamidat wurde von C. Mack zur Verfügung gestellt) für CgtR2, Acetylphosphat für CgtR7) in 1x Bandshiftpuffer bei 30 °C phosphoryliert. Anschließend wurden 35 oder 70 ng des zu testenden Promotorbereichs mit

unterschiedlichen molaren Überschüssen des Regulators in 10 µl Gesamtvolumen 30 min bei 20 °C inkubiert. Im Fall von CgtR7 geschah dies in Anwesenheit von 0,005% Triton-X-100. Die Auftrennung der Ansätze erfolgte nach Zugabe von je 2 µl 6x Ladepuffer (0,1% (w/v) Xylencyanol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerin in 1x TBE-Puffer) in 6%igen (CgtR2) beziehungsweise 10%igen (CgtR7) TBE-Polyacrylamid-Gelen 1 h (CgtR2) beziehungsweise 1,5 h bei 170 V und 4 °C.

6.9 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Promotorbereichen mit oder ohne gebundenen Regulator erfolgte in TBE-Polyacrylamid-Gelen unter nativen Bedingungen in TBE-Puffer bei 4 °C und 170 V für 1 h (CgtR2) beziehungsweise 1,5 h (CgtR7). Hierzu wurden die Gele schon zuvor ohne Proben bei 170 V inkubiert bis sich der resultierende Strom fast nicht mehr änderte (circa 30 min).

Benötigte Lösungen:

Natives	6% / 10%	Acrylamid / N,N-Methylenbisacrylamid (75/1)
Polyacrylamidgel (6% / 10%)	89 mM	Tris Base
	89 mM	Borsäure
	2 mM	Na ₂ EDTA
	0,1% (w/v)	APS
TBE-Puffer	0,01% (v/v)	TEMED
	89 mM	Tris Base
	89 mM	Borsäure
	2 mM	Na ₂ EDTA

7 Bioinformatische Methoden

7.1 Die DNA-Motivsuche mit MEME (Bailey & Elkan, 1994)

Zur Konsensus-Bindemotiv-Suche mit MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi>) können Sequenzen, die gebunden werden sowie Sequenzen, die nicht gebunden werden (Negativsequenzen), verwendet werden. Hierzu wurden die folgenden Parameter gewählt:

„Distribution of motif occurrences“	„Any number of repetitions“
„Number of different motifs“	3
„Minimum number of sites“	2
„Maximum number of sites“	10
„Minimum motif width“	6
„Maximum motif width“	50

V. Ergebnisse

1 Untersuchung des Transkriptoms von *C. glutamicum* bei Expression und Tat-abhängiger Sekretion heterologer Proteine

Für die sekretorische Proteinproduktion muss das zu sekretierende Protein ein N-terminales Signalpeptid besitzen. Unterschiedliche Signalpeptide führen in *C. glutamicum* wie auch in anderen Organismen zu einer unterschiedlich effektiven Sekretion von Modellproteinen (Kikuchi *et al.*, 2006, Meissner *et al.*, 2007, Watanabe *et al.*, 2009, Tullman-Ercek *et al.*, 2007). Für die Sec-abhängige Sekretion wurde sogar gezeigt, dass ein Signalpeptid, das mit einem bestimmten zu sekretierenden Protein eine sehr effektive Sekretion bewirkt, fusioniert mit einem anderen zu sekretierenden Protein zu einer weniger effektiven Sekretion führt (Brockmeier *et al.*, 2006). Daher ist es sinnvoll zur Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen von *C. glutamicum* auf Expression und Tat-abhängige Sekretion von heterologen Proteinen verschiedene Signalpeptide sowie verschiedene Modellproteine zu nutzen, da diese unterschiedlich effektiv sekretiert werden könnten und somit unterschiedliche transkriptionelle Reaktionen auslösen könnten. Als Modellproteine wurden im Rahmen dieser Arbeit das grün fluoreszierende Protein (Green Fluorescent Protein, GFP) aus *Aequorea victoria* fusioniert mit unterschiedlichen Tat-Signalpeptiden sowie MalE, das Maltose-Bindeprotein aus *E. coli*, fusioniert mit einem der Tat-Signalpeptide, ausgewählt.

Um darüber hinaus die transkriptionellen Reaktionen, die rein auf der Expression eines heterologen Modellproteins beruhen, von den transkriptionellen Reaktionen, die auf Expression sowie Sekretion der Tat-Signalpeptid-Modellprotein-Varianten beruhen, abgrenzen zu können, wurden anhand des Modellproteins GFP auch die transkriptionellen Reaktionen auf die Expression des signalpeptidlosen GFP untersucht. Dies ist in Abbildung 6 veranschaulicht: Bereits die Expression des heterologen GFP ohne Signalpeptid kann Reaktionen in *C. glutamicum* verursachen, die ausschließlich auf der Expression des GFP beruhen. Bei der Expression der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten sind ebenfalls Reaktionen möglich, die ausschließlich auf der Expression der jeweiligen Tat-Signalpeptid-GFP-Variante beruhen. Zusätzlich sind jedoch auch Reaktionen denkbar, die durch die anschließende Sekretion des

Proteins hervorgerufen werden. Darüber hinaus könnten je nach Tat-Signalpeptid-GFP-Variante unterschiedliche Reaktionen hervorgerufen werden.

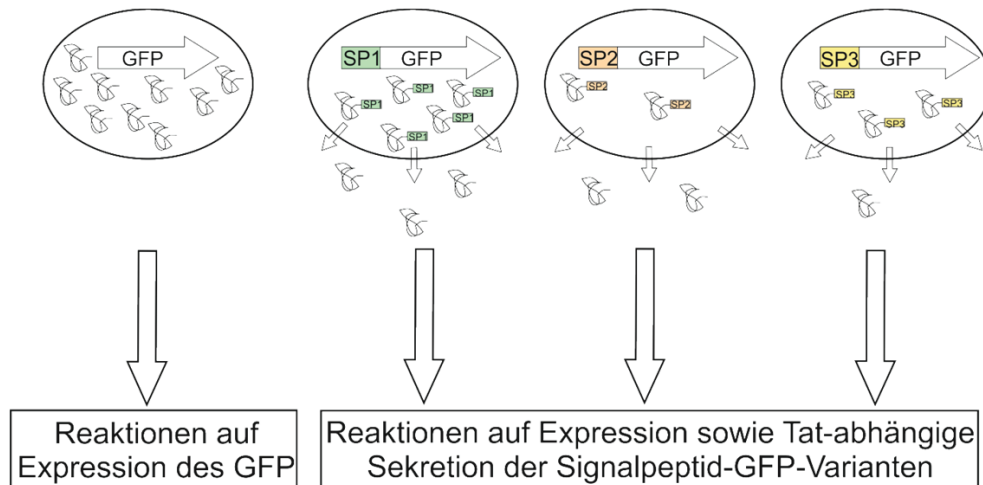


Abbildung 6: Mögliche Reaktionen auf die Expression des heterologen, signalpeptidlosen GFP in *C. glutamicum* sowie weitere mögliche Reaktionen auf Expression und Tat-abhängige Sekretion verschiedener Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten.

Bei genomweiten Transkriptomvergleichen mit Hilfe von DNA-Microarrays ist es sehr wichtig, dass die zu vergleichenden Kulturen in der gleichen Wachstumsphase sind und nach Möglichkeit auch die gleiche Wachstumsrate haben. Wenn die zu vergleichenden Kulturen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen, spiegelt sich dieses auch in einer unterschiedlichen Transkription von Genen des Zentralstoffwechsels wider. Hierdurch sind Gene verändert transkribiert, die mit der untersuchten Fragestellung nicht in Verbindung stehen (Magasanik, 2000). Zur Minimierung der unterschiedlichen Transkription derartiger Gene werden daher bei einem Transkriptomvergleich Kulturen miteinander verglichen, die eine größtmögliche Ähnlichkeit besitzen. So kann für die Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf Expression und Sekretion heterologer Proteine beispielsweise ein induzierbares System genutzt werden. Hierbei wird eine Ursprungskultur mit einem Expressionsvektor, auf dem sich das Gen für das zu exprimierende Protein hinter einem induzierbaren Promotor befindet, ohne Induktor vorkultiviert. In einem definierten Zustand, wie einer bestimmten optischen Dichte (OD) oder zu einem bestimmten Zeitpunkt, wird die Kultur geteilt. Während die eine Hälfte für eine definierte Zeit weiterhin ohne Induktor kultiviert wird, wird in der

anderen Hälfte für dieselbe definierte Zeit durch Zugabe des Induktors die Expression des Proteins induziert. Die uninduzierte und die induzierte Kultur werden anschließend auf Transkriptomebene miteinander verglichen. Auf diese Weise wird zumindest ein identischer Ausgangszustand der Kulturen gewährleistet. Eine alternative Möglichkeit ist, eine Kultur mit dem Expressionsvektor für das zu sekretierende Protein mit einer Kultur mit dem entsprechenden Leervektor zu vergleichen. Allerdings kann in diesem Fall nicht von einer gemeinsamen Ausgangskultur ausgegangen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus den genannten Gründen die erste Variante gewählt. Hierbei wurde die größtmögliche Ähnlichkeit zwischen den zu vergleichenden Kulturen durch folgende Vorgehensweise erlangt: Eine Kultur mit Expressionsvektor, auf dem das Gen für die jeweilige GFP-Variante hinter den IPTG induzierbaren *tac*-Promotor kloniert war, wurde in der exponentiellen Phase ohne IPTG bis zu einer OD₆₀₀ von 2 kultiviert und dann in zwei gleiche Kulturen geteilt. Während in einer Teilkultur durch Zugabe von IPTG die Expression (und gegebenenfalls Sekretion) des heterologen, plasmidkodierten Proteins induziert wurde, verblieb die zweite Teilkultur uninduziert. Die beiden Kulturen wurden für eine Stunde kultiviert.

1.1 GFP als Modellprotein

Zur Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen von *C. glutamicum* auf Expression sowie Tat-abhängige Sekretion von GFP als Modellprotein wurden die Signalpeptide von Cg0955 (Anhydro-N-Acetyl-Muramyl-Tripeptidamidase) aus *C. glutamicum*, von CopO (Multikupferoxidase, Cg3287) aus *C. glutamicum*, von TorA (Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase) aus *E. coli* und von PhoD (Phosphodiesterase) aus *B. subtilis* ausgewählt und mit GFP fusioniert. Bei den Signalpeptiden von Cg0955 und CopO (Cg3287) aus *C. glutamicum* handelt es sich um bioinformatisch vorhergesagte Tat-Signalpeptide aus einer Analyse des Genoms von *C. glutamicum* auf Tat-abhängig sekretierte Proteine (Müller, nicht veröffentlicht). Diese beiden Signalpeptide stellen somit putative Tat-Signalpeptide dar.

Zunächst wurde die Expression und Sekretion der unterschiedlichen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten miteinander verglichen. Abbildung 7A zeigt einen Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen und Überständen von *C. glutamicum* ATCC 13032 Kulturen mit den entsprechenden Expressionsvektoren für die Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten oder, als Kontrolle,

einer Kultur mit dem zugehörigen Leervektor nach vierstündiger Induktion. In den Proben der Kultur mit Leervektor (Spur 1, 2) sind im Western Blot wie zu erwarten keine Banden zu sehen. Die größte Menge an reifem GFP ist in der Zellfraktion der Kultur mit Expressionsvektor für das signalpeptidlose GFP, das nicht sekretiert wird, zu sehen (Spur 3).

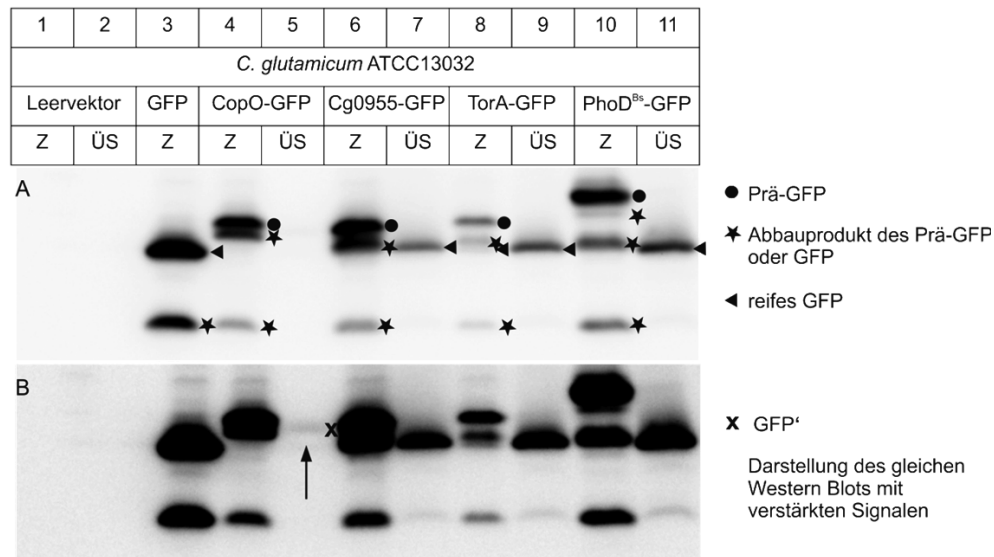


Abbildung 7: Expression und Sekretion von GFP, CopO-GFP, Cg0955-GFP, TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP. Dargestellt ist ein Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen (Z) und Überständen (ÜS) von *C. glutamicum* ATCC 13032 Kulturen mit den entsprechenden Expressionsvektoren für GFP, CopO-GFP, Cg0955-GFP, TorA-GFP, PhoD^{Bs}-GFP oder dem zugehörigen Leervektor nach 4 h Induktion. Von links nach rechts sind jeweils Zellfraktion und Überstand einer Kultur mit Leervektor (Spur 1, 2), einer Kultur mit Expressionsvektor für GFP ohne Signalpeptid (nur Zellfraktion, Spur 3), einer Kultur mit Expressionsvektor für CopO-GFP (Spur 4, 5), einer Kultur mit Expressionsvektor für Cg0955-GFP (Spur 6, 7), einer Kultur mit Expressionsvektor für TorA-GFP (Spur 8, 9) und einer Kultur mit Expressionsvektor für PhoD^{Bs}-GFP (Spur 10, 11) dargestellt. Die aufgetragene Proteinmenge der Zellfraktionen entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5, die aufgetragene Proteinmenge der Überstände entspricht 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1,5. Der Nachweis des GFP erfolgte mit einem Antikörper gegen GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). (A) Darstellung des Western Blots mit optimalen Signalen für die Mehrzahl der detektierten Proteinbanden; (B) Darstellung desselben Western Blots mit verstärkten Signalen zur Sichtbarmachung der schwächsten Proteinbande (Pfeil).

Die Zellfraktionen der CopO-GFP, Cg0955-GFP, TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kulturen (Spur 4, 6, 8, 10) zeigen alle deutlich sichtbar Prä-GFP und zusätzlich Abbauprodukte des Prä-GFP. Dies zeigt, dass alle GFP-Tat-Signalpeptid-Varianten synthetisiert werden. In den Überständen nimmt die Menge an reifem GFP von der CopO-GFP sekretierenden Kultur (Spur 5) über die Cg0955-GFP sekretierende Kultur (Spur 7) über die TorA-GFP sekretierende Kultur (Spur 9) bis

hin zur PhoD^{Bs}-GFP sekretierenden Kultur (Spur 11) stetig zu. Eine Besonderheit stellt das CopO-GFP dar, das nicht sehr effektiv in den Überstand gelangt (Spur 5, Abbildung 7B). Bei näherer Betrachtung der Aminosäuresequenz wurde festgestellt, dass die Signalsequenz eine Lipobox enthält (Müller, nicht veröffentlicht), das sekretierte Protein daher in der Membran verankert ist und nicht in den Überstand gelangt. Die dennoch im Überstand detektierte, geringe Menge an GFP^{*} ist möglicherweise durch Proteolyse freigesetzt worden. Dies bedeutet, dass über die Effizienz der Translokation von CopO-GFP keine Aussage getroffen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedlichen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten zu einer unterschiedlich starken Akkumulation von Prä-GFP in der Zellfraktion führen und unterschiedlich effektiv in den Überstand sekretiert werden. Die Gesamtmenge an detektiertem Protein scheint im Fall des signalpeptidlosen GFP (Spur 3) am höchsten zu sein, da neben der großen Menge an reifem GFP im Vergleich mit den anderen Kulturen auch die größte Menge an Abbauprodukt vorhanden ist. Von den Varianten Cg0955-GFP (Spur 6,7) und PhoD^{Bs}-GFP (Spur 10,11) ist annähernd gleich viel vorhanden, wohingegen etwas weniger CopO-GFP (Spur 4,5) und deutlich weniger TorA-GFP (Spur 8,9) vorhanden ist.

1.1.1 Cg0955-GFP und CopO-GFP werden in *C. glutamicum* Tat-abhängig sekretiert

Die Voraussetzung für die Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen in *C. glutamicum* auf die Tat-abhängige Sekretion der ausgewählten Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten ist, dass diese tatsächlich Tat-abhängig sekretiert werden. Für TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP wurde die Tat-abhängige Sekretion in *C. glutamicum* bereits beschrieben (Meissner *et al.*, 2007). Zur Überprüfung, ob auch die Fusionsproteine Cg0955-GFP und CopO-GFP in *C. glutamicum* Tat-abhängig sekretiert werden, wurden diese jeweils im Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 und in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC exprimiert. Im Fall einer Tat-abhängigen Sekretion dieser beiden Signalpeptid-GFP-Fusionsproteine ist GFP ausschließlich im Überstand der jeweiligen *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp-Kultur zu erwarten, wohingegen dieses im Überstand des Deletionsstamms *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC nicht zu erwarten ist. Abbildung 8 zeigt einen Western Blot mit GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen und Überständen der Tat-Signalpeptid-GFP exprimierenden Kulturen.

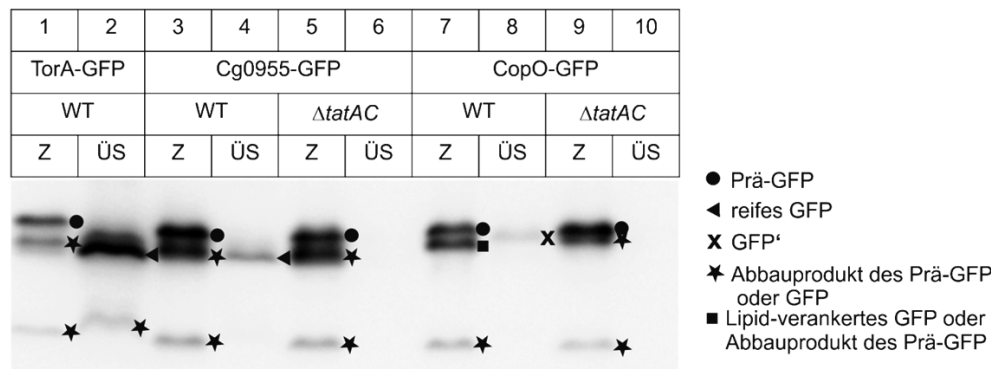


Abbildung 8: Tat-abhängige Sekretion von Cg0955-GFP und CopO-GFP. Dargestellt ist ein Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen (Z) und Überständen (ÜS) von TorA-GFP, Cg0955-GFP oder CopO-GFP exprimierenden *C. glutamicum* ATCC 13032 WT oder *C. glutamicum* ATCC 13032 $\Delta TatAC$ Kulturen. Die aufgetragene Proteinmenge entspricht jeweils 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 0,5 (Zellfraktion) oder 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 1,5 (Überstand). Der Nachweis des GFP erfolgte mit einem Antikörper gegen GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Wie zu erwarten ist in den Überständen der *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp-Kulturen (Spur 2, 4, 8) GFP zu sehen. Die Überstände der *C. glutamicum* $\Delta TatAC$ Kulturen (Spur 6, 10) hingegen weisen abweichend hierzu keine spezifischen GFP-Banden auf. Dies bestätigt eindeutig, dass Cg0955-GFP und CopO-GFP in *C. glutamicum* strikt Tat-abhängig sekretiert werden. Somit können diese beiden heterologen Fusionsproteine ebenso wie die als Tat-abhängig sekretiert beschriebenen Fusionsproteine TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP zur folgenden Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion heterologer Proteine herangezogen werden.

Eine Besonderheit stellt das als Lipoprotein identifizierte CopO-GFP dar. Im Überstand der entsprechenden Wildtyp-Kultur (Spur 8) ist sehr wenig GFP' zu sehen, das jedoch signifikant höher läuft als das reife GFP in den Überständen der TorA-GFP (Spur 2) und Cg0955-GFP (Spur 4) exprimierenden Kulturen. Es könnte sich hierbei um eine lipid-verankerte Form des GFP handeln, die durch Proteolyse freigesetzt wurde. Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei CopO-GFP um ein Lipoprotein handelt, ist, dass die Zellfraktion der CopO-GFP exprimierenden *C. glutamicum* $\Delta TatAC$ Kultur (Spur 9) ein Abbauprodukt des Prä-GFP zeigt, das höher läuft als das Produkt in der korrespondierenden Wildtyp-Kultur (Spur 7). Dieses unterschiedliche Laufverhalten deutet darauf hin, dass es sich in der Wildtyp-

Kultur um lipid-verankertes GFP handeln könnte und in der Deletionsmutante um ein Degradationsprodukt des Prä-GFP.

1.1.2 Überprüfung von Expression und gegebenenfalls Sekretion von GFP, CopO-GFP, Cg0955-GFP und TorA-GFP in *C. glutamicum* ATCC 13032 WT Kulturen für DNA-Microarrays auf Proteinebene

Für DNA-Microarrays wurden Proben der zu untersuchenden Kulturen mit Expressionsvektoren für GFP, CopO-GFP, Cg0955-GFP und TorA-GFP zunächst auf Proteinebene untersucht. Wie unter IV.3.2.4 beschrieben, wurden die Hauptkulturen für den Transkriptomvergleich aus einer exponentiellen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 2 in zwei Kulturen geteilt. Anschließend wurde die eine Hälfte mit 1 mM IPTG induziert kultiviert, während die andere Hälfte zum Vergleich uninduziert kultiviert wurde. Nach einer Stunde wurden beide Kulturen für den Transkriptomvergleich geerntet und daraus die RNA isoliert. Zur Kontrolle der Expression sowie der Sekretion der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten wurden bei der Ernte jeweils Proben der Zellfraktion und des Überstandes entnommen und mit Hilfe eines Western Blots analysiert.



Abbildung 9: Überprüfung der Expression von signalpeptidlosem GFP. Dargestellt ist ein Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus jeweils Zellfraktion (Z) und Überstand (ÜS) einer für eine Stunde induzierten (Spur 3, 4) sowie einer uninduzierten (Spur 1, 2) Kultur mit Expressionsplasmid für GFP ohne Signalpeptid (Spur 1-4). Die aufgetragene Proteinmenge entspricht jeweils 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 0,5 (Zellfraktion) oder 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 1,5 (Überstand). Der Nachweis des GFP erfolgte mit einem Antikörper gegen GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Abbildung 9 zeigt einen Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen und Überständen einer uninduzierten und einer induzierten GFP-exprimierenden Kultur. Die Zellfraktion der uninduzierten Kultur (Spur 1) zeigt im Western Blot ein schwaches GFP-Signal, wohingegen die Zellfraktion der induzierten Kultur (Spur 3) ein starkes GFP-Signal zeigt. In den Überständen beider Kulturen befindet sich kein GFP, was bei der signalpeptidlosen Variante des GFP auch zu erwarten war. Die Expression von GFP im uninduzierten Zustand kommt dadurch zustande, dass der Promotor auch in Abwesenheit des Induktors basal abgelesen wird.

Auf die gleiche Art und Weise wie für GFP wurden Kulturen mit plasmidkodiertem CopO-GFP, Cg0955-GFP und TorA-GFP angezogen und die entsprechenden Proteinproben der induzierten und uninduzierten Kulturen mit Hilfe eines Western Blots analysiert.

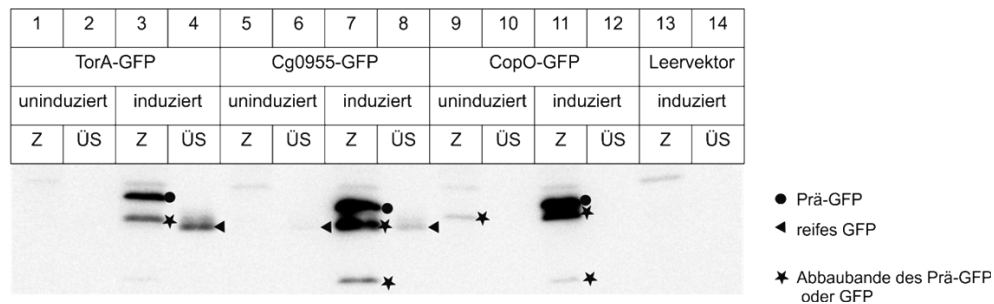


Abbildung 10: Überprüfung von Expression und Sekretion von TorA-GFP, Cg0955-GFP und CopO-GFP. Dargestellt ist ein Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen (Z) und Überständen (ÜS) von Kulturen, die für eine Stunde induziert (Spur 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 14) sowie von Kulturen, die eine Stunde uninduziert kultiviert wurden (Spur 1, 2, 5, 6, 9, 10). Die Kulturen enthalten Expressionsplasmide für TorA-GFP (Spur 1-4), Cg0955-GFP (Spur 5-8), CopO-GFP (Spur 9-12) oder den entsprechenden Leervektor (Spur 13, 14). Die aufgetragene Proteinmenge entspricht jeweils 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 0,5 (Zellfraktion) oder 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 1,5 (Überstand). Der Nachweis des GFP erfolgte mit einem Antikörper gegen GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Abbildung 10 zeigt einen Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen und Überständen von Kulturen mit Expressionsvektoren für TorA-GFP, Cg0955-GFP und CopO-GFP nach einstündiger Kultivierung mit beziehungsweise ohne Induktor. Wie auch nach vierstündiger Induktion (vergleiche Abbildung 7) akkumulieren in den Zellfraktionen der induzierten Kulturen, welche TorA-GFP (Spur 3), Cg0955-GFP (Spur 7) und CopO-GFP (Spur 11) exprimieren, Prä-GFP und Abbauprodukte des Prä-GFP. Die Menge des reifen

GFP in den Überständen der induzierten Kulturen ist von der Tendenz her ebenfalls analog zur Situation nach vierstündiger Induktion (siehe Abbildung 7). So befindet sich im Überstand der TorA-GFP exprimierenden Kultur (Spur 4) die größte Menge GFP. Im Überstand der Cg0955-GFP exprimierenden Kultur (Spur 8) befindet sich eine geringere Menge GFP, wohingegen im Überstand der CopO-GFP exprimierenden Kultur (Spur 12) nach einstündiger Induktion noch kein GFP detektierbar ist. In Zellfraktionen und Überständen der uninduzierten Kulturen (Spur 1, 2, 5, 6, 9, 10) ist nach einstündiger Kultivierung nahezu kein GFP detektierbar. Einzig in der Zellfraktion der CopO-GFP exprimierenden Kultur (Spur 9) ist sehr wenig Abbauprodukt des Prä-GFP vorhanden. Zudem befindet sich im Überstand der Cg0955-GFP exprimierenden Kultur (Spur 6) eine sehr geringe Menge an reifem GFP. Die Expression und Sekretion im uninduzierten Zustand kommt, wie schon beschrieben, dadurch zustande, dass der Promotor auch in Abwesenheit des Induktors basal abgelesen werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in allen Kulturen ein deutlicher Unterschied zwischen der uninduzierten und der induzierten Kultur besteht. Daher wurden diese Kulturen nun zur Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Sekretion der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten herangezogen. Die Untersuchung erfolgte mittels genomweiter DNA-Microarrays. Zu Beginn wurde untersucht, inwieweit die Expression des signalpeptidlosen GFP in *C. glutamicum* bereits transkriptionelle Reaktionen bewirkt. Dadurch sollte im Folgenden ermöglicht werden zu unterscheiden, ob beobachtete transkriptionelle Reaktionen auf die Expression und Sekretion der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten jeweils der Expression oder der sich daran anschließenden Sekretion zuzuschreiben sind.

1.1.3 Transkriptionelle Reaktionen in *C. glutamicum* auf die Expression von signalpeptidlosem GFP

Um ausschließlich signifikante Transkriptionsänderungen zu bewerten, werden bei globalen Transkriptionsanalysen lediglich die in drei Experimenten signifikant mehr als zweifach regulierten Gene betrachtet. Als signifikant reguliert werden diejenigen Gene angesehen, die nach dem Student'schen T-Test in mindestens 95% der Fälle auf eine bestimmte Weise reguliert sind und somit einen p -Wert von $\leq 0,05$ besitzen. Mehr als zweifach reguliert sind Gene, für die das mRNA-Verhältnis der verglichenen

Kulturen im Mittel aus drei Experimenten (in jedem Experiment erfolgt eine Doppelbestimmung) größer / gleich 2 oder kleiner / gleich 0,5 ist. Um die regulierten Gene funktionell zuordnen zu können, wurden sie in „Clusters of Orthologous Groups of proteins“ (COGs) einsortiert. Die COGs wiederum sind funktionellen Klassen wie zum Beispiel „Transkription“ oder „Kohlenstofftransport und -metabolismus“ zugeordnet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) (Tatusov *et al.*, 1997, Tatusov *et al.*, 2003). Diese Klassifizierung stellt eine Hilfestellung dar, um einen Überblick über die Funktion der korrespondierenden Proteine der regulierten Gene zu bekommen. Die korrespondierenden Proteine mancher Gene sind als hypothetische Proteine annotiert. Diese können mittels BLAST auf Homologe oder konservierte Domänen untersucht werden (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990).

Wie in Tabelle 6 dargestellt ist, sind im Transkriptomvergleich zwischen einer induzierten und einer uninduzierten Kultur mit Expressionsvektor für das signalpeptidlose GFP nach einer Stunde lediglich sieben Gene, die sieben Operons angehören, mehr als zweifach signifikant reguliert. Details zu den regulierten Genen sind der Tabelle zu entnehmen.

Bei den regulierten Genen handelt es sich um drei herunter- und vier hochregulierte Gene. Erstere scheinen hinsichtlich ihrer Funktion – soweit diese bekannt ist – im Kohlenstofftransport und -metabolismus (*cg2917*) und der experimentell gezeigten Beteiligung am Benzoatabbau (*cg2637*) (Haußmann *et al.*, 2009) nicht in Zusammenhang mit der Überexpression des GFP zu stehen. Unter den vier hochregulierten Genen kodiert ein Gen für ein Protein, das an der Replikation, Rekombination und Reparatur von DNA beteiligt ist. Ein weiteres Gen kodiert für den Zellteilungsrepressor DivS, dessen Funktion durch experimentelle Arbeiten belegt ist (Ogino *et al.*, 2008). Dieses und die beiden übrigen hochregulierten Gene werden durch den Transkriptionsregulator der SOS-Antwort, LexA, reprimiert (Jochmann *et al.*, 2009). Somit gehören drei von insgesamt vier hochregulierten Genen dem LexA-Regulon an, das im Zuge der SOS-Antwort induziert wird. Diese wird durch Schädigung der DNA, zum Beispiel durch UV-Strahlung oder Oxidantien wie Mitomycin C induziert (Erill *et al.*, 2007). Jedoch kann die SOS-Antwort ebenso durch Wasserstoffperoxid induziert werden (Goerlich *et al.*, 1989). Dies ist insofern interessant, da bei der Reifung des Chromophors des GFP in einem letzten Reaktionsschritt pro Molekül GFP ein Molekül Wasserstoffperoxid frei wird (Zhang *et al.*, 2006). Dies könnte die Induktion der SOS-Antwort bei Überexpression des GFP erklären.

Tabelle 6: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mindestens zweifach regulierte Gene des Transkriptomvergleichs einer induzierten mit einer uninduzierten Kultur mit Expressionsvektor für das signalpeptidlose GFP nach einstündiger Kultivierung.

Annotation/COG	Gen	mRNA-Verhältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Kohlenstofftransport und –metabolismus								
Cg2917, Hypothetisches Protein	cg2917	0,31	0,020	cytoplasm.	cg2917-cg2916	PF01261 / COG1082	Zuckerphosphatisomerasen oder -epimerasen	-
Anorganischer Ionentransport und –metabolismus								
BenA, Benzoat-1,2-Dioxygenase, α -Untereinheit	cg2637	0,46	0,021	cytoplasm.	cg2737-cg2640			
Replikation, Rekombination und Reparatur								
TagA2, putative 3-Methyladenin-DNA-Glycosylase	cg0182	2,05	0,005	cytoplasm.	cg0182-cg0186			
Nicht in COGs								
Cg0255, Hypothetisches Protein	cg0255	0,37	0,046	cytoplasm.	-	-		-
Cg0875, Hypothetisches Protein	cg0875	2,73	0,028	cytoplasm.	-	PF01844	HNH-Endonukleasen	<i>Corynebacterium</i>
DivS, Zellteilungsrepressor	cg2113	2,14	0,003	cytoplasm.	cg2113-cg2112			
Cg2449, Hypothetisches Protein	cg2449	2,75	0,014	cytoplasm.	-	-		<i>Actinomyces</i>

Fett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für GFP zum uninduzierten Stamm *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für GFP

^bLokalisation des Proteins nach LocateP Database (Zhou *et al.*, 2008)

^cvorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling *et al.*, 2012)

PF Pfam Protein Familie (Punta *et al.*, 2012)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die cytosolische Expression von signalpeptidlosem GFP eine Transkriptionsveränderung von nur sieben Genen bewirkt. Einige dieser Gene sind eine Reaktion auf Wasserstoffperoxid, das bei der Reifung des GFP entsteht. Eine häufig beobachtete Reaktion auf die Überexpression von Proteinen ist die Induktion von Chaperonen und Proteasen (Goff & Goldberg, 1985, Parsell & Sauer, 1989). Allerdings wurde eine solche Reaktion auf die Expression des GFP nicht beobachtet, obwohl das GFP in so großer Menge exprimiert wurde, dass es im Gesamtzellextrakt des Coomassie-gefärbten Proteingels deutlich sichtbar war (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurden die transkriptionellen Reaktionen auf Expression und Sekretion der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten, zunächst von CopO-GFP, untersucht.

1.1.4 Transkriptionelle Reaktionen in *C. glutamicum* auf die Expression und Sekretion von CopO-GFP

Der Transkriptomvergleich einer für eine Stunde induzierten Kultur mit Expressionsvektor für CopO-GFP mit der nicht induzierten Kontrollkultur zeigte keine signifikant mehr als zweifach regulierten Gene. Die Expression und Sekretion des CopO-GFP bewirkt also keine signifikanten Reaktionen auf transkriptioneller Ebene. Auch die Gene, die bei der Expression des signalpeptidlosen GFP reguliert waren, sind bei Expression und Sekretion des CopO-GFP nicht reguliert. Dies kann damit zusammenhängen, dass insgesamt eine geringere Menge an CopO-GFP als an signalpeptidlosem GFP exprimiert wird (siehe Abbildung 7). Zudem wird CopO-GFP über die Cytoplasmamembran auf die extrazelluläre Seite transloziert. Hierfür muss das GFP zwar gefaltet sein, jedoch kann die Oxidation des Chromophors, bei der die Freisetzung von Wasserstoffperoxid erfolgt, auch nach erfolgter Translokation im extracytosolischen Raum erfolgen. Da die Oxidation des Chromophors des GFP mit einer Halbwertszeit von zwei bis vier Stunden bekanntermaßen sehr langsam erfolgt, ist es denkbar, dass ein Teil des entstehenden Wasserstoffperoxids erst im extracytosolischen Raum entsteht (Heim *et al.*, 1994, Crameri *et al.*, 1996). Somit entsteht Wasserstoffperoxid, anders als bei signalpeptidlosem GFP, sowohl im Cytosol als auch im extracytosolischen Raum.

Im Folgenden wurde untersucht, welche transkriptionellen Reaktionen die Expression und Sekretion des effektiver sekretierten Cg0955-GFP in *C. glutamicum* auslöst.

1.1.5 Transkriptionelle Reaktionen in *C. glutamicum* auf die Expression und Sekretion von Cg0955-GFP

Der genomweite Transkriptionsvergleich einer Cg0955-GFP exprimierenden *C. glutamicum* Kultur, die eine Stunde induziert war, mit der uninduzierten Kontrollkultur zeigte insgesamt vier signifikant mehr als zweifach regulierte Gene, die zwei Operons angehören, wie in Tabelle 7 gezeigt ist. Einzelheiten zu den Genen sind der Tabelle zu entnehmen.

Auffallend bei den hier herunterregulierten Genen ist, dass sie alle im Rahmen der Kupferhomöostase als reguliert gefunden wurden (Schuplezow, 2009, Schelder *et al.*, 2011). Hierbei dienen die durch das Zweikomponentensystem CopRS (*cg3285*, *cg3284*) regulierten Gene des Operons *cg3286-cg3289*, von denen *cg3289* (mRNA-Verhältnis 0,49; *p*-Wert 0,069) für eine Thioldisulfidisomerase oder ein Thioredoxin kodiert, der Detoxifizierung von Kupfer im Fall eines Kupferüberschusses (Schelder *et al.*, 2011). Das ebenfalls signifikant herunterregulierte Gen *cg1884* liegt mit den für Lipoproteine kodierenden Genen *cg1883* und *cg1881* in einem Operon, das durch den Repressor der SOS-Antwort, LexA, reprimiert wird (Jochmann *et al.*, 2009). Es kodiert für ein hypothetisches Protein mit einer CopC-Domäne. Aufgrund dieser Domäne weist es Ähnlichkeit zu den plasmidkodierten Kupferresistenzproteinen CopC aus *Pseudomonas syringae*, PcoC aus *E. coli* (Rensing & Grass, 2003, Djoko *et al.*, 2007) und YcnJ aus *B. subtilis* auf, das an der Kupferakquirierung beteiligt ist (Chillappagari *et al.*, 2009). Dies deutet gemeinsam mit der Tatsache, dass *cg1884* in *C. glutamicum* bei Kupfermangel und nicht bei Kupferüberschuss hochreguliert wird, auf eine Funktion des Proteins bei der Kupferbereitstellung hin (Schuplezow, 2009). Da in diesem Experiment jedoch sowohl Gene, die bei Kupferüberschuss hochreguliert werden, als auch ein Gen, das bei Kupfermangel hochreguliert wird, herunterreguliert sind, obwohl die verglichenen Kulturen im gleichen Medium (mit und ohne den Induktor IPTG) kultiviert wurden, lässt sich schließen, dass die Regulation der an der Kupferhomöostase beteiligten Gene nicht aufgrund von Kupfermangel oder -überschuss erfolgt.

Tabelle 7: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach regulierte Gene des Vergleichs einer induzierten mit einer nicht induzierten Cg0955-GFP-exprimierenden Kultur nach einstuündiger Kultivierung.

Annotation/COG	Gen	mRNA- Verhält- nis ^a	p -Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus								
CopO, Multikupferoxidase	cg3287	0,42	0,008	extrazellulär lipid- verankert	cg3286- cg3289			
Nicht in COGs								
Cg3286, Putatives sekretiertes Protein	cg3286	0,41	0,006	extrazellulär lipid- verankert	cg3286- cg3289	-		Bacteria
Cg3288, Hypothetisches Protein	cg3288	0,46	0,022	cytoplasm.	cg3286- cg3289	-		-
Allgemeine Funktionsvorhersage								
Cg1884, Hypothetisches Protein	cg1884	0,49	0,006	extrazellulär C- term. verankert	cg1884- cg1887	COG2372 / PF04234 (CpC- Domäne)	Kupferresistenz / -akquirierung	Bacteria

Fett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für Cg0955-GFP zum uninduzierten Stamm *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für Cg0955-GFP

^bLokalisation des Proteins nach LocatEP Database (Zhou et al., 2008)

^cVorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling et al., 2012)

PF Pfam Protein Familie (Punta et al., 2012)

Interessanterweise kodiert in beiden reprimierten Operons jeweils ein Gen für ein Tat-Substrat (CopO) beziehungsweise ein putatives Tat-Substrat (Cg1881). Möglicherweise steht die Repression dieser Operons in Zusammenhang mit der Tat-abhängigen Sekretion von Cg0955-GFP. Die SOS-Antwort, die im Fall der Expression des signalpeptidlosen GFP induziert war, ist bei der Expression von Cg0955-GFP, wie schon bei der Expression des CopO-GFP, nicht induziert. Analog zur Situation mit CopO-GFP entsteht Wasserstoffperoxid, anders als bei signalpeptidlosem GFP, sowohl im Cytosol als auch im extracytosolischen Raum.

Zusammenfassend führt die Expression und Sekretion des Cg0955-GFP zu vier regulierten Genen auf transkriptioneller Ebene in *C. glutamicum*. Im Folgenden wurden die Reaktionen auf Expression und Sekretion des noch effektiver sekretierten TorA-GFP untersucht.

1.1.6 Transkriptionelle Reaktionen in *C. glutamicum* auf die Expression und Sekretion von TorA-GFP

Der Vergleich einer für eine Stunde induzierten Kultur mit plasmidkodiertem TorA-GFP mit der nicht induzierten Kontrollkultur zeigte keine signifikant mehr als zweifach regulierten Gene. Die bei Expression sowie Sekretion des weniger effektiv sekretierten Cg0955-GFP in *C. glutamicum* beobachteten Reaktionen auf transkriptioneller Ebene scheinen somit nicht auf die Menge des sekretierten GFP zurückzuführen zu sein, da die Menge an sekretiertem GFP im Fall von TorA-GFP höher ist. Expression und Sekretion von TorA-GFP bewirken also trotz der recht effektiven Sekretion wie schon Expression und Sekretion von CopO-GFP keine transkriptionellen Reaktionen in *C. glutamicum*.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression und Sekretion der am effektivsten sekretierten Tat-Signalpeptid-GFP-Variante PhoD^{Bs}-GFP in *C. glutamicum* Reaktionen auf transkriptioneller Ebene bewirken.

1.1.7 Überprüfung von Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP auf Proteinebene in *C. glutamicum* ATCC 13032 WT Kulturen für DNA-Microarrays

Da bei der Expression und Sekretion der bisher untersuchten Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten sehr wenige Gene reguliert waren, wurden weitere vergleichende Transkriptionsanalysen von Kulturen mit PhoD^{Bs}-GFP, dem effektivsten

Fusionsprotein für die Tat-abhängige Sekretion des GFP in *C. glutamicum*, durchgeführt. Außerdem stellte sich die Frage, ob der betrachtete Zeitpunkt eine Stunde nach Induktion der richtige Zeitpunkt für die Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen ist. Möglicherweise muss erst genügend Vorläufer akkumulieren bis Reaktionen auf transkriptioneller Ebene auftreten. Um dies zu überprüfen, wurde daher mit PhoD^{Bs}-GFP ein Transkriptomvergleich sowohl nach einstündiger als auch nach vierstündiger Induktion durchgeführt. In Abbildung 11 ist ein Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen und Überständen von uninduzierten und induzierten PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kulturen nach ein- sowie nach vierstündiger Kultivierung gezeigt.

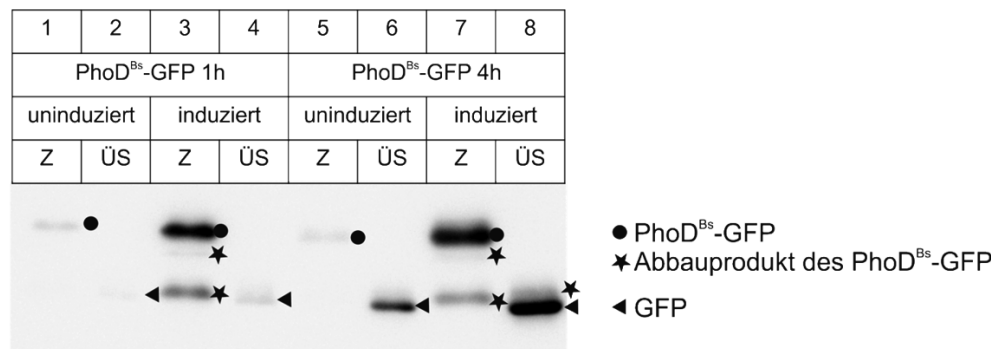


Abbildung 11: Überprüfung von Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP in *C. glutamicum*. Dargestellt ist ein Western Blot mit den GFP-spezifischen Banden der Proteinproben aus jeweils Zellfraktionen (Z) und Überständen (ÜS) von Kulturen mit Expressionsvektor für PhoD^{Bs}-GFP, die eine Stunde oder vier Stunden induziert (Spur 3, 4, 7, 8) sowie von Kulturen, die eine Stunde oder vier Stunden uninduziert kultiviert wurden (Spur 1, 2, 5, 6). Die aufgetragene Proteinmenge entspricht jeweils 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 0,5 (Zellfraktion) oder 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 1,5 (Überstand). Der Nachweis des GFP erfolgte mit einem Antikörper gegen GFP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Im uninduzierten Zustand tritt keine Akkumulation des Vorläufers auf, da sowohl nach einstündiger als auch nach vierstündiger Kultivierung in den Zellfraktionen (Spur 1, 5) nur wenig Vorläufer PhoD^{Bs}-GFP sichtbar ist. Nach Induktion akkumuliert der Vorläufer dagegen in der Zellfraktion. Dies führt schon nach einstündiger Kultivierung zu einer großen Menge an Vorläufer und zwei Abbauprodukten des Vorläufers (Spur 3), wobei nach vierstündiger Kultivierung eine etwas größere Menge an Vorläufer und ähnliche Mengen der Abbauprodukte sichtbar sind (Spur 7).

Hinsichtlich der Sekretion zeigt sich im Überstand im uninduzierten Zustand bereits nach einstündiger Kultivierung eine minimale Menge an reifem GFP (Spur 2), die nach vierstündiger Kultivierung deutlich zunimmt (Spur 6). Nach einstündiger

Kultivierung im induzierten Zustand ist im Überstand eine geringfügig größere Menge an GFP vorhanden (Spur 4) als im uninduzierten Zustand. Dieser Unterschied nimmt jedoch nach vierstündiger Kultivierung um ein Vielfaches zu (Spur 8).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach vierstündiger Induktion sowohl mehr Vorläufer in der Zellfraktion akkumuliert hat als auch mehr GFP sekretiert ist. Darüber hinaus besteht ein deutlicher Unterschied zwischen induziertem und uninduziertem Zustand. Allerdings wird schon im uninduzierten Zustand eine bedeutende Menge an GFP sekretiert. Dies wirft die Frage auf, ob transkriptionelle Reaktionen auf die Sekretion eventuell schon im uninduzierten Zustand auftreten. In diesem Fall wären sie bei einem Vergleich einer induzierten mit einer uninduzierten Kultur gleichermaßen vorhanden und würden daher möglicherweise nicht detektiert werden. Deshalb wurde neben dem Transkriptomvergleich der induzierten PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kultur mit der uninduzierten Kultur ebenfalls ein Vergleich zwischen einer induzierten Kultur mit Expressionsvektor und einer Kontrollkultur mit dem entsprechenden Leervektor durchgeführt.

1.1.8 Transkriptionelle Reaktionen in *C. glutamicum* auf die Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP

Wie schon im Fall der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten CopO-GFP, Cg0955-GFP und TorA-GFP wurde zunächst ein Transkriptomvergleich einer induzierten PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kultur mit der uninduzierten Kontrollkultur nach einstündiger Kultivierung durchgeführt. Wie in Tabelle 8 gezeigt ist, sind in diesem Vergleich elf Gene signifikant mehr als zweifach unterschiedlich transkribiert. Diese gehören neun Operons an und sind alle hochreguliert. Details zu den regulierten Genen sind der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 8: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach regulierten Gene des Vergleichs einer induzierten mit einer uninduzierten Phod^{Bs}-GFP exprimierenden Kultur nach einstündiger Kultivierung.

Annotation / COG	Gen	mRNA- Verhältnis ^a	p -Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Posttranslationale Modifikationen, Protein Turnover, Chaperone								
GroES, Chaperon 10 kDa UE	cg0690	3,88	0,002	cytoplasm.	cg0690-cg0691			
GroEL1, Chaperon 60 kDa UE N-term. Fragment	cg0691	3,48	0,001	cytoplasm.	cg0690-cg0691			
GroEL1, Chaperon 60 kDa UE C-term. Fragment	cg0693	3,23	0,001	cytoplasm.	-			
GroEL2, Chaperon	cg3011	3,30	0,001	cytoplasm.	-			
CipB, ATP-abhängiges Chaperon	cg3079	2,07	0,025	cytoplasm.	cg3079-cg3078			
DnaJ, Chaperon	cg3098	1,99 ^d	0,015	cytoplasm.	cg3100-cg3097			
GrpE, Chaperon	cg3099	2,00	0,006	cytoplasm.	cg3100-cg3097			
Dnak, Chaperon	cg3100	1,96 ^d	0,005	cytoplasm.	cg3100-cg3097			
Transkription								
HspR, Transkriptionsregulator der MerR-Familie	cg3097	2,12	0,012	cytoplasm.	cg3100-cg3097			
Energieerzeugung und -konvertierung								
Cg2538, Alkanalmonooxygenase, α -Kette	cg2538	2,74	0,003	cytoplasm.	-			
Cg3405, NADPH-abhängige Quinonreduktase oder Zn-abhängige Oxidoreduktase	cg3405	2,18	0,000	cytoplasm.	-			
Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus								
Cg2838, Dithioldisulfidisomerase	cg2838	3,19	0,006	cytoplasm.	-			
Nicht in COGs								
Cg2039, Hypothetisches Protein	cg2039	2,13	0,002	cytoplasm.	-			

Fett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.;

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für Phod^{Bs}-GFP zum uninduzierten Stamm *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für Phod^{Bs}-GFP

^bLokalisation des Proteins nach LocatEP Database (<http://www.cmbi.ru.nl/locatp-db/cgi-bin/locatpdb.py>)

^cVorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling et al., 2012) oder durch experimentelle Bestätigung

^dDas mRNA-Verhältnis ist kleiner als zweifach

Die meisten Gene, die als Reaktion auf die Expression sowie Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP reguliert sind, kodieren für Chaperone. So sind *groES* (cg0690), *groEL1* (cg0691), *groEL1* (cg0693), *groEL2* (cg3011), *clpB* (cg3079), *dnaK* (cg3100), *grpE* (cg3099) und *dnaJ* (cg3098) hochreguliert. *C. glutamicum* besitzt zwei Kopien von *groEL*, *groEL1* und *groEL2*, wobei *groEL2* nicht wie üblich in einem Operon mit *groES* transkribiert wird und wahrscheinlich auch nicht auf dessen Anwesenheit angewiesen ist (Goyal *et al.*, 2006). *groEL1* besteht im hier genutzten Stamm aus zwei Fragmenten, da es ein Transposon im Gen aufweist. Dies führt dazu, dass GroEL1 in 2D-Proteingelen nicht zu detektieren ist und somit wahrscheinlich nicht funktionell vorhanden ist (Barreiro *et al.*, 2005). Die Hochregulation der Gene für die intrazellulären Chaperone ist eine Reaktion, die bei Überexpression von Proteinen beschrieben ist (Parsell & Sauer, 1989). Obwohl bei der Expression des signalpeptidlosen GFP eine größere Menge an GFP oder dessen Abbauprodukt in der Zellfraktion vorhanden war (siehe Abbildung 7), waren die für diese Chaperone kodierenden Gene als Reaktion auf die Expression des GFP nicht in diesem Maß hochreguliert. Das könnte daran liegen, dass PhoD^{Bs}-GFP selbst nach korrekter Faltung das hydrophobe, frei zugängliche Signalpeptid aufweist, wodurch Chaperone induziert werden können. Die cytosolischen Chaperone binden hydrophobe Bereiche, die bei korrekter Faltung nicht zugänglich wären (Rudiger *et al.*, 1997, Houry *et al.*, 1999).

Die übrigen regulierten Gene kodieren für Proteine, die intrazellulär lokalisiert sind, und kommen daher nicht als Reaktion auf Sekretionsstress in Frage, da hierfür die Hochregulation von Genen für sekretierte, konservierte Proteine zu erwarten ist.

Zusammengefasst erfolgen somit auch bei Expression und Sekretion der am effektivsten sekretierten Tat-Signalpeptid-GFP-Variante PhoD^{Bs}-GFP keine Reaktionen auf die Translokation. Allerdings erfolgte bereits im uninduzierten Zustand Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP, wie im Western Blot in Abbildung 11 dargestellt ist. Um zu überprüfen, ob transkriptionelle Reaktionen in *C. glutamicum* bereits aufgrund der uninduzierten Expression und Sekretion erfolgen und somit beim Vergleich einer induzierten mit einer uninduzierten Kultur nur noch wenige signifikant mehr als zweifach unterschiedlich transkribierte Gene detektiert werden, wurde zusätzlich ein Transkriptomvergleich zwischen einer Kultur mit PhoD^{Bs}-GFP auf einem Expressionsvektor und einer gleich behandelten Kultur mit dem zugehörigen Leervektor nach einstündiger Kultivierung mit Induktor durchgeführt. Erwartet wurde,

dass dieser Transkriptomvergleich zusätzliche mehr als zweifach verändert transkribierte Gene zeigt, die im Transkriptomvergleich der induzierten Kultur mit der uninduzierten Kultur durch die basale Expression des PhoD^{Bs}-GFP schon eine veränderte Transkription in der uninduzierten Kultur aufwiesen und daher nicht als zweifach verändert transkribiert detektiert wurden.

Wie in Tabelle 9 dargestellt ist, sind beim Vergleich einer PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kultur mit der Kultur mit entsprechendem Leervektor nach einstündiger Kultivierung 15 Gene mehr als zweifach signifikant verändert transkribiert, die elf Operons angehören. Einzelheiten sind der Tabelle zu entnehmen.

Wie erwartet zeigen die Gene, die bereits im Transkriptomvergleich zwischen der induzierten und der uninduzierten PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kultur (siehe Tabelle 9) mehr als zweifach verändert transkribiert waren, bis auf eine Ausnahme auch im Vergleich der Kultur mit Expressionsvektor und der Kultur mit Leervektor nach einstündiger Kultivierung mit Induktor eine veränderte Transkription. Über die Hälfte der regulierten Gene kodiert als Reaktion auf die Überexpression des PhoD^{Bs}-GFP für intrazelluläre Chaperone, wie auch beim Vergleich der induzierten Kultur mit der uninduzierten Kultur.

Außerdem sind vier Gene zusätzlich unter den signifikant mehr als zweifach verändert transkribierten Genen. Eines dieser Gene (*cg3078*) ist das zweite Gen eines Operons (*cg3079-cg3078*) (Nakunst *et al.*, 2007), dessen erstes Gen (*clpB*, *cg3079*) bereits im Transkriptomvergleich zwischen der induzierten und der uninduzierten Kultur mehr als zweifach reguliert war. Daher handelt es sich in diesem Fall nicht um eine eigenständige Regulation. Ein weiteres der zusätzlich mehr als zweifach regulierten Gene kodiert für das sekretierte Protein Cg0793 (*cg0793*). Aufgrund der Tatsache, dass es sekretiert wird, könnte es eine Funktion bei der Sekretion des PhoD^{Bs}-GFP nach der Translokation über die Cytoplasmamembran, beispielsweise bei der Zellwand- oder Mycolatschichtpassage des sekretierten GFP, spielen. Allerdings ist es als einziges Gen dieses Transkriptomvergleichs herunterreguliert. Bei einem Protein, das an einem solchen Prozess mitwirkt und aufgrund der erhöhten Sekretion in größerer Menge benötigt wird, wäre eine Hochregulation des zugehörigen Gens zu erwarten, wie beispielsweise bei den Chaperonen beobachtet.

Tabelle 9: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach regulierte Gene des Vergleichs einer induzierten PhoD^{Bs}-GFP-exprimierenden Kultur mit einer entsprechenden Kultur mit dem zugehörigen Leervektor nach einstündiger Kultivierung.

Annotation / COG	Gen	mRNA-Verhältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für
Posttranslationale Modifikationen, Protein Turnover, Chaperone							
GroES, Chaperon 10 kDa UE	cg0690	5,58	0,000	cytoplasm.	cg0690-cg0691		
GroEL1', Chaperon 60 kDa UE N-term. Fragment	cg0691	5,21	0,007	cytoplasm.	cg0690-cg0691		
GroEL1, Chaperon 60 kDa UE C-term. Fragment	cg0693	5,47	0,005	cytoplasm.	-		
GroEL2, Chaperon	cg3011	4,61	0,001	cytoplasm.	-		
CipB, Putative ATP-abhängige Protease	cg3079	2,35	0,000	cytoplasm.	cg3079-cg3078		
DnaJ, Chaperon	cg3098	2,05	0,034	cytoplasm.	cg3100-cg3097		
GrpE, Chaperon	cg3099	2,14	0,032	cytoplasm.	cg3100-cg3097		
DnaK, Chaperon	cg3100	3,25	0,167	cytoplasm.	cg3100-cg3097		
Transkription							
HspR, Transkriptions-regulator der MerR-Familie	cg3097	2,21	0,000	cytoplasm.	cg3100-cg3097		
Translation							
RplL, 50S ribosomales Protein L10	cg0572	1,18 ^d	0,033	cytoplasm.	cg0572-cg0573		
RplL, 50S ribosomales Protein L7 / L12	cg0573	2,30	0,004	cytoplasm.	cg0572-cg0573		
Energieerzeugung und -konvertierung							
Cg2538, Alkanalmonooxygenase, α -Kette	cg2538	2,78	0,025	cytoplasm.	-		
Cg3405, NADPH-abhängige Quinonreduktase oder Zn-abhängige Oxidoreduktase	cg3405	2,64	0,005	cytoplasm.	-		
Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus							
Cg2838, Dithioldisulfidisomerase	cg2838	3,32	0,005	cytoplasm.	-		

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p- Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konser- vierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakte- ristisch für	konserviert in
Nicht in COGs								
WhiB3, Transkriptions-faktor	cg0695	2,56	0,022	cytoplasm.	-			
Cg3078, Hypothetisches Protein	cg3078	2,23	0,015	cytoplasm.	cg3079-cg3078	DUF4265	Funktion unbekannt	Bacteria
Funktion unbekannt								
Cg0793, Sekretiertes Protein	cg0793	0,45	0,001	sekretiert	-	SCP- Domäne / COG2340	Funktion unbekannt	Bacteria

^aFett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für PhoD⁸⁵-GFP zum induzierten Stamm *C. glutamicum* mit entsprechendem Leervektor

^bLokalisation des Proteins nach LocatEP Database (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>)

^cvorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling *et al.*, 2012) oder durch experimentelle Bestätigung

^dDas mRNA-Verhältnis ist kleiner als zweifach

^eDas mRNA-Verhältnis ist nicht signifikant

DUF „Domain of unknown function“

Zusammenfassend wurden beim Transkriptomvergleich der induzierten PhoD^{Bs}-GFP exprimierenden Kultur mit der induzierten Kultur mit Leervektor 15 regulierte Gene, die elf Operons angehören, gefunden, während nur elf regulierte Gene, die neun Operons angehören, beim Transkriptomvergleich der induzierten mit der uninduzierten Kultur gefunden wurden. Dies deutet darauf hin, dass die basale Expression des PhoD^{Bs}-GFP vom uninduzierten Promotor und die sich anschließende Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP die Detektion der meisten transkriptionellen Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP nicht beeinflussen.

Um zu untersuchen, ob die Regulation von relevanten Genen nicht erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt, wenn eine große Menge an Vorläufer und reifem GFP akkumuliert hat (Abbildung 11), wurde nun wie erläutert ein Transkriptomvergleich nach vierstündiger Induktion durchgeführt. Dieser wurde zwischen einer *C. glutamicum* Kultur mit Expressionsvektor für PhoD^{Bs}-GFP und einer gleich behandelten Kultur mit Leervektor nach vierstündiger Kultivierung in Anwesenheit des Induktors durchgeführt. Wie in Tabelle 10 dargestellt ist, führte dies zu neun signifikant mehr als zweifach verändert transkribierten Genen. Details zu den regulierten Genen sind der Tabelle zu entnehmen.

Von den neun mehr als zweifach regulierten Genen waren drei schon nach einstündiger Kultivierung mehr als zweifach reguliert. Darunter befindet sich nur ein Gen für ein Chaperon (GroEL2). Die übrigen Gene für Chaperone, die nach einstündiger Induktion ein mehr als zweifach verändertes mRNA-Verhältnis zeigten, wiesen ein mRNA-Verhältnis von 1,53 bis 1,92 auf. Diese nach vierstündiger Inkubation weniger starke Induktion der Gene für Chaperone als nach einstündiger Inkubation ist typisch für die transiente Induktion von Hitzeschockproteinen. Diese werden direkt nach einem Hitzeschock auf transkriptioneller Ebene hochreguliert, erreichen in *E. coli* nach 5-10 min ein Maximum und fallen dann auf ein „steady state“-Level ab (Lemaux *et al.*, 1978, Bukau, 1993). Bei Induktion der Hitzeschockantwort durch 4% Ethanol wird das Maximum jedoch erst nach 30-60 min erreicht (Neidhardt *et al.*, 1984), das heißt unterschiedliche Induktoren führen zu einem unterschiedlichen Induktionsprofil der Hitzeschockantwort. Außerdem ist die maximale Induktion der Transkription in *C. glutamicum* 40 min nach dem Hitzeschock beschrieben (Barreiro *et al.*, 2004). Daher ist es möglich, dass in *C. glutamicum* die Hitzeschockantwort nach einstündiger Proteinexpression annähernd maximal induziert ist.

Tabelle 10: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach regulierte Gene des Vergleichs einer induzierten Phod^{BS}-GFP-exprimierenden Kultur mit einer entsprechenden Kultur mit dem zugehörigen Leervektor nach vierstündiger Kultivierung.

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p- Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteri- stisch für	konserviert in	Bemerkungen
Posttranslationale Modifikationen, Protein Turnover, Chaperone									
GroEL2, Chaperon	<i>cg3011</i>	2,11	0,010	cytoplasm.	-				
Energieerzeugung und -konvertierung									
Cg2538, Alkanalmonooxygenase, α -Kette	<i>cg2538</i>	2,62	0,003	cytoplasm.	-				
Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus									
Cg2838, Dithioldisulfidisomerase	<i>cg2838</i>	3,09	0,001	cytoplasm.	-				
Coenzymtransport und -metabolismus									
LipA, Lipatsynthase	<i>cg2423</i>	2,27	0,021	cytoplasm.	<i>cg2422-cg2424</i>	Lipoat-Synthase, Lipoat wird z.B. im Pyruvat-DH-Komplex benötigt			
Nicht in COGs									
Cg2052, Putatives Sekretiertes Protein	<i>cg2052</i>	2,11	0,001	N-term. mem-brangeankert	-				
Cg0033, Putatives Sekretiertes Protein	<i>cg0033</i>	0,43	0,007	sekretiert	-				insgesamt 33 AS, sekretiert 4 AS
Nukleotidtransport und -metabolismus									
Cg0034, 5'-Nukleotidase (putatives Pseudogen)	<i>cg0034</i>	0,58 ^d	0,005	cytoplasm.	<i>cg0034-cg0035</i>				<i>cg0033-cg0035</i> könnten Pseudogene darstellen, da die korrespondierenden AS-sequenzen große Homologie zu Anfang, Mitte bzw. Ende einer 5'-Nukleotidase, kodiert durch <i>cg0397</i> , aufweisen
Cg0035, 5'-Nukleotidase (putatives Pseudogen)	<i>cg0035</i>	0,48	0,001	cytoplasm.	<i>cg0034-cg0035</i>				
Kohlenstofftransport und -metabolismus									
NanH, Sekretierte Sialidase	<i>cg1756</i>	0,49	0,003	sekretiert	-				Sialidasen werden als Virulenzfaktor diskutiert
keine cg-Nummer									
RNase P	<i>cg502</i>	0,43	0,027	-	-				Ribozym, enzymatisch aktive RNA

Fett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für Phod^{BS}-GFP zum Stamm *C. glutamicum* mit entsprechendem Leervektor

^bLokalisation des Proteins nach LocatEP Database (<http://www.cmbi.ru.nl/locatEP-db/cgi-bin/locatEPdb.py>)

^cVorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling et al., 2012) oder durch experimentelle Bestätigung

^dDas mRNA-Verhältnis ist kleiner als zweifach

Die Tatsache, dass nach vierstündiger Induktion mehr Vorläufer in der Zelle akkumuliert hat als nach einstündiger Induktion (siehe Abbildung 11), deutet darauf hin, dass mehr Vorläufer gebildet als transloziert wird. Das lässt vermuten, dass entweder der Targeting-Prozess des PhoD^{Bs}-GFP zur Translokase oder die Tat-Translokation an sich ausgelastet sein könnten. Alternativ ist denkbar, dass ein Teil des Vorläufers durch cytosolische Chaperone von der Interaktion mit der Membran und der Translokase abgehalten wird. Falls in *C. glutamicum* die Gene für Proteine, die bei der Prozessierung oder der Zellwand- und Mycolatschichtpassage eine Rolle spielen, als Reaktion auf vermehrte Sekretion reguliert werden können, könnten diese nach vierstündiger Induktion von PhoD^{Bs}-GFP hochreguliert sein. Hierbei könnte es sich um sekretierte, konservierte Proteine handeln. Das einzige hochregulierte Gen, das für ein Protein mit Signalpeptid kodiert ist *cg2052*. Allerdings weist dieses Gen sowohl bei Expression des signalpeptidlosen GFP als auch bei Expression von PhoD^{Bs}-GFP nach einstündiger Induktion ein mRNA-Verhältnis von ca. 1,6 auf. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass *cg2052* als Reaktion auf die Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP reguliert ist. Die übrigen nach vierstündiger Induktion verändert transkribierten Gene, die teilweise herunterreguliert sind und ansonsten für cytoplasmatisch lokalisierte Proteine kodieren, stehen vermutlich ebenfalls nicht in Zusammenhang mit der Sekretion des PhoD^{Bs}-GFP.

Zusammenfassend ist auch nach vierstündiger Induktion die Anzahl regulierter Gene bei Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP sehr gering. Nur die Regulation eines einzigen Gens für ein Chaperon ist auf die Expression des PhoD^{Bs}-GFP zurückzuführen. Ansonsten lassen sich die regulierten Gene nicht mit der Sekretion des PhoD^{Bs}-GFP in Verbindung bringen. Trotz der Akkumulation des Vorläufers PhoD^{Bs}-GFP in der Zellfraktion zeigt *C. glutamicum* auch nach vierstündiger Kultivierung keine Sekretionsstressantwort auf die Expression und Sekretion der am effektivsten sekretierten Tat-Signalpeptid-GFP-Variante PhoD^{Bs}-GFP. Möglicherweise ist die Menge an sekretiertem GFP auch im Fall der am effektivsten sekretierten Variante PhoD^{Bs}-GFP zu gering, um Reaktionen auf transkriptioneller Ebene zu bewirken, oder *C. glutamicum* hat keine Möglichkeit auf transkriptioneller Ebene auf die Tat-abhängige Sekretion des Modellproteins GFP zu reagieren. Daher stellte sich die Frage, ob einzig das untersuchte Modellprotein GFP keinen Sekretionsstress verursacht oder ob die Tat-Sekretion als solche keinen Sekretionsstress auf transkriptioneller Ebene in *C. glutamicum* verursacht. Um dies

zu ergründen, wurde im Folgenden untersucht, inwieweit ein anderes heterologes Substrat-Protein, fusioniert an eines der Tat-Signalpeptide, zu transkriptionellen Reaktionen in *C. glutamicum* führt. Hierzu wurde das Maltose-Bindeprotein (MalE) aus *E. coli* verwendet und mit dem Signalpeptid von TorA fusioniert.

1.2 MalE als Modellprotein

Das Maltose-Bindeprotein MalE wird in *E. coli* Sec-abhängig transloziert. Allerdings konnte sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* gezeigt werden, dass MalE Tat-abhängig transloziert werden kann, sobald es mit einem Tat-Signalpeptid, wie dem Signalpeptid von TorA, fusioniert ist (Blaudeck *et al.*, 2003, Meißner, 2005). Daher wurde für die Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion von MalE das Fusionsprotein TorA-MalE gewählt. Die Kulturen wurden wie unter IV.3.2.4 beschrieben kultiviert und die Expression und Sekretion von TorA-MalE zunächst auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft (Abbildung 12).

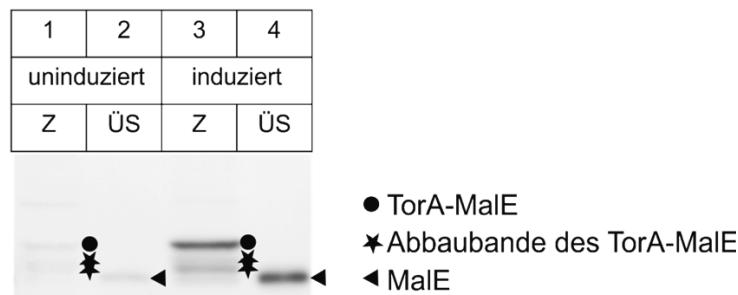


Abbildung 12: Expression und Sekretion von TorA-MalE in *C. glutamicum*. Dargestellt ist ein Western Blot mit den MalE-spezifischen Banden der Proteinproben aus Zellfraktionen (Z) und Überständen (ÜS) von einer Kultur mit Expressionsvektor für TorA-MalE, die für eine Stunde induziert (Spur 5-8) sowie von einer Kultur, die für eine Stunde uninduziert kultiviert wurde (Spur 1-4). Die aufgetragene Proteinmenge entspricht jeweils 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 0,5 (Zellfraktion) oder 1 ml Kultur einer OD₆₀₀ von 1,5 (Überstand). Der Nachweis des MalEs erfolgte mit einem Serum gegen MalE (K.-L. Schimz)

Bei Kultivierung von *C. glutamicum* mit Expressionsvektor für TorA-MalE ist in uninduziertem Zustand nach einer Stunde (Spur 1) wenig Vorläufer TorA-MalE sowie zwei Abbauprodukte davon nachweisbar. Im zugehörigen Überstand (Spur 2) ist ebenso wenig reifes MalE vorhanden. Dies ist auf die basale Expression in Abwesenheit eines Induktors zurückzuführen. In der induzierten Kultur sind nach einstündiger Kultivierung in der Zellfraktion (Spur 3) deutlich mehr Vorläufer des TorA-MalE im Vergleich zum uninduzierten Zustand sowie ebenfalls zwei

Abbauprodukte zu finden. Im Kulturüberstand (Spur 4) ist reifes MalE nachweisbar. Wie schon mit GFP führt das TorA-Signalpeptid auch mit MalE fusioniert zu effektiver Sekretion in *C. glutamicum*.

Der Transkriptomvergleich einer für eine Stunde induzierten Kultur mit TorA-MalE mit der Kontrollkultur mit entsprechendem Leervektor zeigte keine signifikant mehr als zweifach regulierten Gene. Somit zeigt *C. glutamicum* weder auf die Tat-abhängige Sekretion von GFP noch auf die Tat-abhängige Sekretion von MalE transkriptionelle Reaktionen.

Dies lässt drei mögliche Schlussfolgerungen zu: Erstens besteht die Möglichkeit, dass *C. glutamicum* auf vermehrte Expression und Tat-abhängige Sekretion nicht auf transkriptioneller sondern auf translationaler oder posttranslationaler Ebene reagiert. Zweitens ist es möglich, dass die erreichte Expressions- und Sekretionsmenge mit den untersuchten Modellproteinen unter der in *C. glutamicum* möglichen Expressions- und Tat-abhängigen Sekretionsmenge liegt und daher keine Reaktionen auf transkriptioneller Ebene auf diese erfolgen. Drittens könnten in *C. glutamicum* keinerlei Regulationsmechanismen als Reaktion auf die vermehrte Tat-abhängige Proteinsekretion vorhanden sein, da natürlicherweise nur wenige Proteine Tat-abhängig transloziert werden.

Die geringe Anzahl regulierter Gene als Reaktion auf Expression und Tat-abhängige Sekretion von Modellproteinen ist insofern bemerkenswert, als dass bekannt ist, dass eine Überexpression des nativen Tat-Substrats Sufl in *E. coli* zu einer Vielzahl von Reaktionen auf transkriptioneller Ebene führt (Ize *et al.*, 2004). Diese sind teilweise identisch mit den in einer *E. coli* *tatC* Deletionsmutante beobachteten transkriptionellen Reaktionen auf eine fehlende funktionelle Tat-Translokase. Analog zu dieser Untersuchung in *E. coli* wurde im Folgenden mit Hilfe der Mutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC untersucht, ob *C. glutamicum* auf die fehlende Tat-Translokase transkriptionelle Reaktionen zeigt.

1.3 *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC als Simulation einer ausgelasteten Tat-Translokase

Für *E. coli* ist bekannt, dass die Überexpression eines Tat-Substrates zur Reduktion der Translokation anderer Tat-Substrate führen kann (Yahr & Wickner, 2001, DeLisa *et al.*, 2004, Ize *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist gezeigt, dass die Überexpression

des Tat-Substrates Sufl auf transkriptioneller Ebene unter anderem die gleichen Reaktionen hervorruft wie eine Deletion von *tatC*, das für die essentielle Komponente TatC der Tat-Translokase kodiert (Ize *et al.*, 2004). Somit scheint die Überexpression eines Tat-Substrats in *E. coli* zu einem Zustand zu führen, in welchem die Tat-Translokase derart gesättigt ist, dass sich der Stamm aufgrund des fehlenden Exports wichtiger anderer Tat-Substrate auf transkriptioneller Ebene analog zu einem Tat-Deletionsstamm verhält (Ize *et al.*, 2004).

Tat-Deletionsmutanten in *E. coli* zeigen phänotypisch einen pleiotropen Zellhüllendefekt, da die Tat-abhängig translozierten Zellwandamidasen AmiA und AmiC nicht mehr ins Periplasma gelangen. Dieser Zellhüllendefekt kann jedoch durch Überexpression der dritten Zellwandamidase in *E. coli*, AmiB, die Sec-abhängig transloziert wird, aufgehoben werden (Ize *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf die fehlende Tat-Translokase, wurden die Reaktionen, die aufgrund der beeinträchtigten Zellhülle wegen der fehlenden Tat-abhängigen Amidasen auftreten, durch Untersuchung von Mutanten, deren Zellhülle durch vermehrte Expression der Amidase AmiB wieder intakt ist, ausgeblendet. Auf diese Weise wurden weitere spezifische transkriptionelle Reaktionen auf die fehlende Tat-abhängige Translokation – unabhängig von den ebenfalls spezifischen Reaktionen auf die fehlenden Tat-abhängig translozierten Amidasen – identifiziert (Ize *et al.*, 2004).

Analog zum pleiotropen Zellhüllendefekt in *E. coli* zeigt die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC einen deutlichen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp (Meißner, 2005). Dies ist zur Untersuchung in DNA-Microarrays ungünstig, da Wachstumsunterschiede zwischen zwei zu vergleichenden Stämmen immer zu transkriptionellen Reaktionen führen, die aufgrund verschiedener Wachstumsphasen zustande kommen. Der Wachstumsdefekt der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC könnte im Fehlen eines oder mehrerer wichtiger Tat-Substrate begründet sein. Ein wichtiges bekanntes Tat-Substrat ist das Rieske-Protein des *bc₁*-Komplexes der Atmungskette, dessen hydrophober Bereich des Signalpeptids gleichzeitig als Membrananker fungiert (Molik *et al.*, 2001, Berks, 1996, Hinsley *et al.*, 2001, Bachmann *et al.*, 2006). Das Rieskeprotein in *Actinobacteria* verfügt über drei Transmembranhelices, wobei die dritte Transmembranhelix aufgrund eines internen Tat-Konsensusmotivs vor dieser dritten Helix Tat-abhängig in die Membran inseriert wird (Keller *et al.*, 2012). Tatsächlich bewirkt die Deletion

des Gens *qcrA* (*cg2404*), das für das Rieskeprotein des bc_1 -Komplexes kodiert, in *C. glutamicum* einen Wachstumsdefekt. Wie Abbildung 13 zeigt, ist dieser Wachstumsdefekt dem der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC ähnlich, aber nicht ganz so stark ausgeprägt.

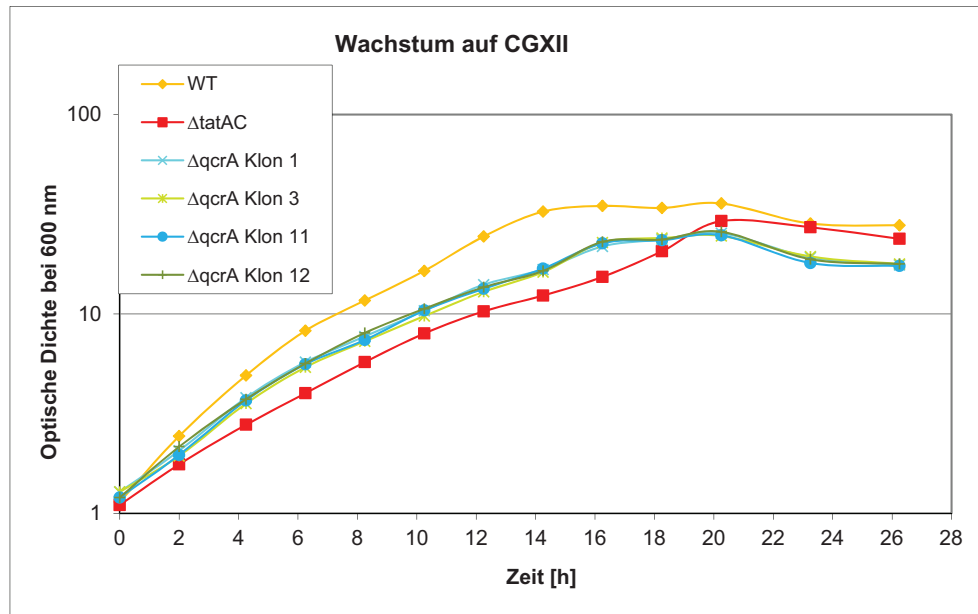


Abbildung 13: Wachstumskurven von *C. glutamicum* ATCC 13032 WT, *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC und vier unterschiedlichen Klonen des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ qcrA in CGXII-Medium.

Die unvollständige Membraninsertion des funktionellen bc_1 -Komplex in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC scheint also ein Grund für den Wachstumsdefekt dieser Deletionsmutante zu sein. Da der Wachstumsdefekt der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC aber noch ausgeprägter ist, tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere Tat-Substrate durch das Fehlen an ihrem vorgesehenen Wirkort zu diesem Wachstumsdefekt bei.

Um im Transkriptomvergleich Reaktionen auf das Fehlen des funktionellen bc_1 -Komplexes auszublenzen, wurde die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC mit der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ qcrA verglichen. Das Ergebnis des Transkriptomvergleichs der beiden Stämme ist in Tabelle 11 gezeigt. Es sind 35 Gene signifikant mehr als zweifach hochreguliert und 17 Gene mehr als zweifach herunterreguliert. Darunter befinden sich die Gene *qcrA* (*cg2404*), *tatC* (*cg1684*) und *tatA* (*cg1685*), die aufgrund der jeweiligen Deletion drastisch

veränderte mRNA-Verhältnisse aufweisen und daher nicht als reguliert zu werten sind.

Die am stärksten hochregulierten Gene (6,9-75-fach) sind *dps* (*cg3327*), *cg3326*, *cg1292*, *cg1293*, *katA* (*cg0310*), *cg2796*, *cg2797*, *oxyR* (*cg2109*) und *ftn* (*cg2782*). Dps, die Katalase, OxyR und Ferritin sind Proteine, die auf oxidativen Stress hindeuten (Cabiscol *et al.*, 2000). Tatsächlich kommt eine aktuelle Untersuchung zu dem Ergebnis, dass OxyR bei oxidativem Stress seine Zielgene dereprimiert (Milse, nicht veröffentlicht). Zu diesen zählen die Gene für die Katalase (*cg0310*), Dps (*cg3327*), die Flavin-enthaltende Monooxygenase (*cg1292*) inklusive der dahinter liegenden Gene *cg1293* und *cg1294*, die Ferrochelatase HemH (*cg1734*), die Cytochrom-*bd*-Oxidase (*cg1301-cg1298*) und OxyR (*cg2109*). Reaktive Sauerstoffspezies, die oxidativen Stress verursachen, entstehen fortwährend in Anwesenheit von Sauerstoff bei Redoxreaktionen und werden normalerweise durch Superoxiddismutasen, Peroxidasen und Katalasen abgebaut (Imlay, 2003). In der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC müssen folglich entweder mehr reaktive Sauerstoffspezies entstehen oder die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies werden durch einen fehlenden Abbaumechanismus langsamer abgebaut als in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *qcrA*.

Weiterhin fällt auf, dass die größte Gruppe an regulierten Genen für Proteine des anorganischen Ionentransport und -metabolismus kodieren. Die meisten Gene dieser Gruppe werden durch den globalen Eisenhomöostaseregulator DtxR reguliert (*ftn* (*cg2782*), *cg3084*, *dps* (*cg3327*), *cg0405*, *cg0771-cg0767* und *hmuO* (*cg2445*)), ebenso wie das Gen *cg0470*, das keiner COGs-Gruppe zugeordnet ist. Dies deutet auf einen Unterschied in der Eisenhomöostase zwischen den beiden verglichenen Stämmen hin. Eine mögliche Ursache könnte der Wachstumsunterschied zwischen den Stämmen sein. Dieser könnte auch für weitere Genregulationen verantwortlich sein. Ebenso führt die Regulation von Transkriptionsfaktoren mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Regulation weiterer Gene. Keines der regulierten Gene kodiert für ein putatives Tat-Substrat, das heißt, dass in *C. glutamicum* als Reaktion auf das Fehlen eines Tat-Substrats an seinem Wirkort nicht die transkriptionelle Hochregulation des korrespondierenden Gens erfolgt.

Tabelle 11: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach regulierte Gene des Vergleichs *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC mit *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ qcrA.

Annotation / COG	Gen	mRNA-Verhältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Kohlenstofftransport und –metabolismus								
PrpB1, putative Methylisocitratlyase	<i>cg0797</i>	2,16	0,011	cytoplasm.	<i>cg0796-cg0798</i>			
RbsB, Sekretiertes Zuckerbindende Protein	<i>cg1413</i>	5,91	0,007	lipid-geankert	<i>cg1410-cg1413</i>			
ProP, Prolin / Ectoin Transporter	<i>cg3395</i>	2,77	0,007	Membran	-			
Cg3226, Putative L-Laktatpermease	<i>cg3226</i>	0,07	0,030	Membran	<i>cg3227-cg3227</i>			
Coenzymtransport und –metabolismus								
HemH, Ferrochelatase Vorläufer	<i>cg1734</i>	4,41	0,009	cytoplasm.	-			
Energieerzeugung und –konvertierung								
CydB, Untereinheit der Cytochrom <i>bd</i> Oxidase	<i>cg1300</i>	3,77	0,013	Membran	<i>cg1301-cg1298</i>			
CydA, Untereinheit der Cytochrom <i>bd</i> Oxidase	<i>cg1301</i>	3,99	0,019	Membran	<i>cg1301-cg1298</i>			
QcrA1, Rieske Protein	<i>cg2404</i>	(268,91)	0,003	Membran	<i>cg2406-cg2403</i>			
Anorganischer Ionentransport und –metabolismus								
KatA, Katalase	<i>cg0310</i>	19,17	0,000	cytoplasm.	-			teilweise extrazellulär lokalisiert (Caspers, 2006)
Cg1292, Flavin-enthaltende Monooxygenase 3	<i>cg1292</i>	28,64	0,002	N-term. Membrangeankert	-			
Ftn, Ferritin-ähnliches Protein	<i>cg2782</i>	6,94	0,007	cytoplasm.	-			
Cg3084, Putatives Flavoprotein, an K ⁺ Transport beteiligt	<i>cg3084</i>	2,73	0,040	cytoplasm.	<i>cg3084-cg3085</i>			
Dps, Hunger-induziertes DNA Schutzprotein	<i>cg3327</i>	75,76	0,001	cytoplasm.	-			
Cg0405, Sekretiertes siderophorbindendes Lipoprotein	<i>cg0405</i>	0,37	0,030	N-term. membrangeankert	-			
Cg0767, Cytoplasmatisches mit Siderophoren interagierendes Protein	<i>cg0767</i>	0,49	0,046	cytoplasm.	<i>cg0771-cg0767</i>			
Cg0770, Siderophor ABC Transporter, Permeasekomponente	<i>cg0770</i>	0,30	0,006	Membran	<i>cg0771-cg0767</i>			

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p- Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakte- ristisch für	konserviert in
Cg0771, Sekretiertes siderophorbindendes Lipoprotein	cg0771	0,34	0,007	lipid-geankert	cg0771-cg0767			
HmuO, putative Hämoxygenase	cg2445	0,22	0,010	cytoplasm.	-			
Intrazellulärer Transport und Sekretion								
TatC, Twin Arginin Translokase Protein C	cg1684	(0,00)	0,001	Membran	cg1685-cg1683			
TatA, Twin Arginin Translokase Protein A	cg1685	(0,00)	0,001	N-term. mem- brangeankert	cg1685-cg1683			
Posttranslationale Modifikationen, Protein Turnover, Chaperone								
Cydc, ABC-Transporter, Fusionierte ATPase- und Permease-komponente	cg1298	3,65	0,001	Membran	cg1301-cg1298			
Cydc, ABC-Transporter, Fusionierte ATPase- und Permease-komponente	cg1299	4,10	0,006	Membran	cg1301-cg1298			
Replikation, Rekombination und Reparatur								
MutM2, putative Formamidopyrimidin-DNA- Glycosylase	cg3328	2,52	0,006	cytoplasm.	-			
Sekundärmetabolitbiosynthese, -transport und -katabolismus								
CatA1, Catechol-1,2-Dioxygenase	cg2636	2,62	0,035	cytoplasm.	-			
Transkription								
OxyR, Wasserstoffperoxid wahrnehmender Regulator	cg2109	9,96	0,000	cytoplasm.	-			
Cg2320, Putativer Transkriptions-regulator	cg2320	2,25	0,028	cytoplasm.	-			
Cg3082, Transkriptionsregulator der ArsR Familie	cg3082	3,39	0,015	cytoplasm.	cg3082-cg3083			
Cg1686, Putativer Transkriptions-regulator	cg1686	0,35	0,008	cytoplasm.	cg1688-cg1686			
Translation								
Cg1417, Acetyltransferase	cg1417	2,02	0,025	cytoplasm.	-			
Zellwand- / Membranbiogenese								
MurB, UDP-N-Acetylenolpyruvoyl- glucosaminoreduktase	cg0423	0,00	0,004	cytoplasm.	cg0422-cg0424			
Cg0424, Putative Glycosyltransferase	cg0424	0,05	0,038	cytoplasm.	cg0422-cg0424			

Bemerkungen

Annotation / COG	Gen	mRNA-Verhältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Cg1735, Sekretierte zellwandassoziierte Hydrolase	cg1735	0,49	0,048	N-term. membrangebunden	-			
Allgemeine Funktionsvorhersage								
Cg1294, Putative Esterase der alpha / beta-Hydrolasesuperfamilie	cg1294	3,49	0,003	cytoplasm.	-			
Cg1695, Putatives Antitoxin-Protein eines Toxin-/Antitoxin-Plasmiderhaltungssystems	cg1695	3,74	0,009	cytoplasm.	-			
Cg2796, Protein der MngE / PrpD-Familie (Propionatkatabolismus)	cg2796	10,32	0,015	cytoplasmatisch	-			
OxiC, Myoinositoldehydrogenase	cg3389	2,81	0,023	cytoplasm.	cg3089-cg3092			
Funktion unbekannt								
Cg0009, Nicht charakterisiertes Membranprotein	cg0009	2,21	0,008	Membran	-	DUF161 / COG2364	Funktion unbekannt	Bacteria
Cg2797, Hypothetisches Protein	cg2797	9,28	0,019	cytoplasm.	-	COG1809	(2R)-Phospho-3-sulfo-lactat-synthase (CoM-Biosynthese in Archaea)	zellulären Organismen (Bacteria, Archaea, Eukaryota)
Nicht in COGs								
Cg1293, Putatives sekretiertes Protein	cg1293	14,18	0,004	Membran	-	-		-
Cg1312, Hypothetisches Protein	cg1312	2,05	0,004	Membran	-	-		Actinomyceetales
Trp24a(ISCg24a), Transposasefragment	cg1515	5,26	0,015	cytoplasm.	-			
Cg1516, Hypothetisches Protein	cg1516	2,45	0,041	cytoplasm.	cg1517-cg1516	-		-
Cg1517, Putatives sekretiertes Protein	cg1517	2,27	0,030	extrazellulär	cg1517-cg1516	-		-
Cg1746, Hypothetisches Protein	cg1746	4,70	0,015	cytoplasm.	-	PF08797 (HIRAN-Domäne)	(Iyer et al., 2006)	Actinomyceetales
Cg3124, Hypothetisches Protein	cg3124	2,42	0,042	cytoplasm.	-	-		Bacteria

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p- Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakte- ristisch für	konserviert in
Bemerkungen								
Cg3213, Putatives sekretiertes Protein	cg3213	2,08	0,037	lipidgeankert	-	DUF3500 / PF12006	Funktion unbekannt	Bacteria
Cg3326, Hypothetisches Protein	cg3326	58,74	0,002	cytoplasm.	-	-	-	-
Cg0282, Hypothetisches Protein	cg0282	0,36	0,012	cytoplasm.	-	PF05532 / COG3237	Csbd-ähnlich, Csbd ist ein allg. Stress- protein	Bacteria
Cg0470, Sekretiertes Hämtransport-assoziiertes Protein	cg0470	0,38	0,009	C-term. mem- brangeankert	cg0470-cg0471	PF04213 / HtaA- Domäne	an Eisen- akquirierung und -transport beteiligt	Actino- mycetales
Cg1478, Hypothetisches Protein	cg1478	0,45	0,010	cytoplasm.	-	-	-	-
Cg2096, Hypothetisches Protein	cg2096	0,44	0,021	Membran	-	-	-	Bacteria
keine cg-Nummer								
Ser_tRNA		0,30	0,029					

^aFett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^bmRNA-Verhältnis des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TalAC zum Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ gcrA

^cLokalisation des Proteins nach LocalizeP Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>)

^dvorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling et al., 2012) oder durch experimentelle Bestätigung

PF „Pfam Protein Familie“ (Punta et al., 2012)

(Das veränderte mRNA-Verhältnis von *gcrA* (cg2404) ist aufgrund der Deletion des Gens im Referenzstamm nicht bewertbar, das veränderte mRNA-Verhältnis von *tatA* (cg1685) und *tatC* (cg1684) ist aufgrund der Deletion des Gens im untersuchten Stamm nicht bewertbar)

Zusammenfassend ist anhand der insgesamt 52 regulierten Genen zu sehen, dass *C. glutamicum*, trotz Ausblendung der Reaktionen auf den nicht funktionalen *bc₁-aa₃*-Superkomplex, auf das Fehlen des Tat-Exportweges, das die Auslastung der Tat-Translokation simulieren soll, deutliche Reaktionen zeigt. Unter der Annahme, dass die Überexpression eines Tat-Substrates analog zur Situation in *E. coli* zur Auslastung der Tat-Translokase führen kann, bleibt als Fazit der Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten und TorA-MalE in *C. glutamicum* also festzuhalten, dass die Tat-Translokase durch die Sekretion der exprimierten Modellproteine nicht vollständig ausgelastet ist. Somit bleibt die Frage, ob in *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene keine Regulationsmechanismen als Reaktion auf die vermehrte Tat-abhängige Sekretion vorhanden sind oder ob die mit den Modellproteinen GFP und MalE erreichte Sekretion nicht ausreicht, um solche Regulationsmechanismen zu induzieren, unbeantwortet.

1.4 Fazit der Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf die Tat-abhängige Translokation von Proteinen in *C. glutamicum*

Die Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten CopO-GFP, Cg0955-GFP, TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP und das Fusionsprotein TorA-MalE wurden in *C. glutamicum* exprimiert und Tat-abhängig transloziert. Für die Varianten CopO-GFP und Cg0955-GFP konnte die Tat-abhängige Translokation experimentell bestätigt werden. Trotz der teilweise recht effektiven Sekretion zeigte *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene kaum Reaktionen auf die Tat-abhängige Sekretion. Die Expression von PhoD^{Bs}-GFP induzierte die Gene für Chaperone, mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der größeren Menge an Vorläufer im Vergleich zu den übrigen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten. Die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC Δ TatAC, die zur Simulation der vollständigen Auslastung der Translokase analog zu einer Studie in *E. coli* genutzt wurde, zeigte hingegen oxidativen Stress und die Regulation von Genen, die durch den Regulator der Eisenhomöostase DtxR kontrolliert werden. Somit führt die Expression keines der Tat-abhängig sekretierten Fusionsproteine zu einer vollständigen Auslastung der Tat-Translokase. Dies weist darauf hin, dass die Tat-Translokase in *C. glutamicum* auch bei Sekretion des am effektivsten sekretierten Fusionsproteins PhoD^{Bs}-GFP nicht vollständig ausgelastet ist. Zur optimalen Nutzung

von *C. glutamicum* zur Expression und Tat-abhängigen Sekretion von Proteinen könnte also die Effizienz von Expression und Sekretion verbessert werden.

2 Untersuchung ausgewählter Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion heterologer Proteine

Parallel zu Transkriptomvergleichen zur Untersuchung der Expression und Tat-abhängigen Sekretion von Proteinen in *C. glutamicum* wurden ähnliche Untersuchungen mit Sec-abhängig sekretierten Proteinen durchgeführt (Scheele, 2012, Kleine, nicht veröffentlicht). Unter den als Reaktion auf Sec-abhängige Sekretion hochregulierten Genen befinden sich das Gen für ein Homolog der extracytoplasmatischen Protease HtrA und Gene für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne, die auch in Proteinen der „Phage Shock“ Antwort vorhanden sind, wie in Tabelle 12 dargestellt ist.

Tabelle 12: Regulation von *htrA* und Genen, die für Proteine mit Domänen, die auch in Proteinen der „Phage Shock“ Antwort vorhanden sind, kodieren, als Reaktion auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion verschiedener heterologer Proteine in *C. glutamicum*

Annotation	Gen	mRNA-Verhältnis	p-Wert	Expression von
HtrA, Trypsin ähnliche Serinprotease mit PDZ-Domäne (DegP / HtrA-Homolog)	<i>cg0998</i>	4,40	0,001	NprE-Cutinase
		4,36	0,001	AmyH
		4,22	0,000	AmyE
Cg1325, Putativer Stressabhängiger Transkriptionsregulator (PspC-Domäne)	<i>cg1325</i>	2,35	0,005	AmyH
		3,69	0,009	AmyE
Cg0706, Konserviertes hypothetisches Membranprotein (PspC-Domäne)	<i>cg0706</i>	3,22	0,007	AmyH
		2,31	0,027	AmyE
Cg3264, Hypothetisches Protein (PspA-Domäne)	<i>cg3264</i>	2,68	0,003	AmyE

Sowohl *htrA*, das Gen für eine extracytoplasmatische Protease, als auch *cg0706*, das Gen für ein Membranprotein mit PspC-Domäne, liegen im Genom von *C. glutamicum* neben einem Zweikomponentensystem. Zweikomponentensysteme sind schon mehrfach in Zusammenhang mit Zellhüllenstress beschrieben worden. So gibt es in *E. coli* die Zweikomponentensysteme CpxAR und BaeSR, die gemeinsam mit dem ECF-Sigmafaktor σ^E auf Störungen der Integrität der Zellhülle reagieren (Ruiz &

Silhavy, 2005, Raffa & Raivio, 2002). In *B. subtilis* reagieren CssRS (Hyryläinen *et al.*, 2001) und LiaSR (Mascher *et al.*, 2004) sowie in *Streptomyces coelicolor* das Zweikomponentensystem CseBC, das unter anderem die Hochregulation des ECF-Sigmafaktors σ^E bewirkt (Hutchings *et al.*, 2006), auf solche Störungen.

2.1 *htrA* (cg0998) liegt in *C. glutamicum* in der gleichen Anordnung wie in *M. tuberculosis* hinter einem Zweikomponentensystem

HtrA ist eine extracytoplasmatische Serinprotease, die ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine im Periplasma oder der Zellhülle abbaut. Homologe dieser Protease sind das gut untersuchte periplasmatische DegP aus *E. coli* oder HtrA und HtrB aus *B. subtilis* (Pallen & Wren, 1997, Noone *et al.*, 2001). Das Gen für HtrA (cg0998) befindet sich im Genom von *C. glutamicum* direkt hinter den Genen *cgtRS2* (cg0996-cg0997) für ein Zweikomponentensystem. *CgtRS2* und *htrA* sind homolog zu *mprAB* und *pepD* aus *M. tuberculosis*. MprAB ist ein Zweikomponentensystem, das in *M. tuberculosis* unter anderem zur Virulenz beiträgt, auf Zellwand- und membranaktive Agenzien wie SDS reagiert und direkt die ECF-Sigmafaktoren σ^E und σ^B reguliert (Bretl *et al.*, 2011). Außerdem wurde in *M. tuberculosis* gezeigt, dass der Antwortregulator MprA die Transkription des nachfolgenden Gens *pepD* und auch die des Zweikomponentensystems *mprAB* selbst aktivieren kann (He & Zahrt, 2005). Die gleiche Anordnung der homologen Gene in den Genomen von *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* ist in Abbildung 14 dargestellt.

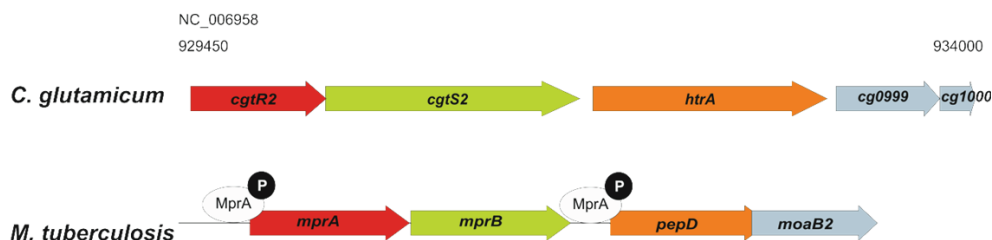


Abbildung 14: Genomische Anordnung von *cgtR2*, *cgtS2* und *htrA* (cg0998) in *C. glutamicum* (NCBI Reference Sequence: NC_006958.1) im Vergleich zur Anordnung der Homologen *mprA*, *mprB* und *pepD* im Genom von *M. tuberculosis* (White *et al.*, 2010).

Aufgrund der Verwandtschaft der beiden Organismen und der konservierten Anordnung im Genom liegt die Annahme nahe, dass *htrA* in *C. glutamicum* durch CgtRS2 reguliert wird. In diesem Fall sollte *htrA* in einer Deletionsmutante *C. glutamicum* Δ *cgtRS2* bei Expression und Sec-abhängiger Sekretion eines geeigneten Modellproteins nicht mehr gleichermaßen reguliert werden wie im Wildtyp

C. glutamicum ATCC 13032. Entgegen dieser These zeigten zwei verschiedene Deletionsmutanten $\Delta cgtRS2$ jedoch unverändert eine Regulation von *htrA* als Antwort auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion eines Modellproteins. Außerdem zeigten beide Deletionsmutanten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten (Kleine, nicht veröffentlicht). Ursache für dieses unterschiedliche Wachstum könnte die Bildung von Sekundärsuppressoren sein. Sekundärsuppressionen könnten beispielsweise zu einer konstitutiven Transkription essentieller Gene des Zweikomponentensystems CgtRS2 oder zur Hochregulation von Genen führen, die ein nicht mehr reguliertes, essentielles Gen funktionell ersetzen können, und so zu besserem Wachstum führen. Allerdings kommt das Gen *htrA* selbst nicht als essentielles Gen in Frage, da es bei Deletion von *cgtRS2* noch immer reguliert wurde und außerdem komplett deletiert werden konnte (Kleine, nicht veröffentlicht). Die Regulation von *htrA* in Abwesenheit des benachbarten Zweikomponentensystems CgtRS2 kann ein Hinweis darauf sein, dass es entweder noch weitere Regulatoren oder Sigmafaktoren gibt, die an der Regulation von *htrA* beteiligt sind und diese übernehmen können oder *htrA* nicht von CgtRS2 reguliert wird. Um zu untersuchen, ob *htrA* von CgtRS2 reguliert werden kann, wurde eine mögliche Interaktion zwischen CgtR2 und dem Upstreambereich von *htrA* (*cg0998*) *in vitro* durch Gelretardationsexperimente überprüft. Bei dieser *in vitro* Methode hat die Tendenz von *C. glutamicum* bei Deletion des Genorts *cgtRS2* Sekundärsuppressoren zu bilden keinen Einfluss auf das Ergebnis. Allerdings werden zur Etablierung der Gelretardationsexperimente Positiv- und Negativkontrollen benötigt, also DNA-Fragmente, die sicher durch den Regulator gebunden werden oder sicher nicht gebunden werden. Eine Möglichkeit Gene zu identifizieren, die durch ein Zweikomponentensystem reguliert werden, besteht darin, genomweite Transkriptomvergleiche zwischen einer Deletionsmutante, in der die Gene für das entsprechende Zweikomponentensystem deletiert sind, und dem Wildtyp per DNA-Microarrays anzufertigen. Aufgrund der Vermutung, dass die Deletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta cgtRS2$ Sekundärsuppressoren bilden könnte, wurde ein alternativer Ansatz gewählt: Durch Überexpression des plasmidkodierten Antwortregulators CgtR2 wurde der Zustand eines induzierten CgtRS2-Systems simuliert. Durch den Vergleich dieses Stamms, in dem CgtR2 überexprimiert wird, mit einem Wildtypstamm wurde mit Hilfe von DNA-Microarrays nach Genen gesucht, die durch den Antwortregulator CgtR2 reguliert werden. Ob diese putativen Zielgene des

Antwortregulators CgtR2, die mit Hilfe der DNA-Microarrays identifiziert wurden, direkte Zielgene des Regulators sind, kann durch Überprüfung der Interaktion zwischen dem Regulator und dem entsprechenden Promotorbereich des putativen Zielgens mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten überprüft werden.

2.1.1 DNA-Microarrays zur Definition des Regulons von CgtRS2

Um das Regulon eines Zweikomponentensystems zu definieren, dessen Stimulus unbekannt ist, können DNA-Microarrays durchgeführt werden, in denen ein Stamm, in dem die Gene des zu untersuchenden Zweikomponentensystems deletiert wurden und der dazugehörige Antwortregulator überexprimiert wurde, mit einem Wildtyp mit entsprechendem Leervektor verglichen werden. Diese Überexpression eines Antwortregulators in Abwesenheit der zugehörigen Sensorkinase ist in Abbildung 15 dargestellt.

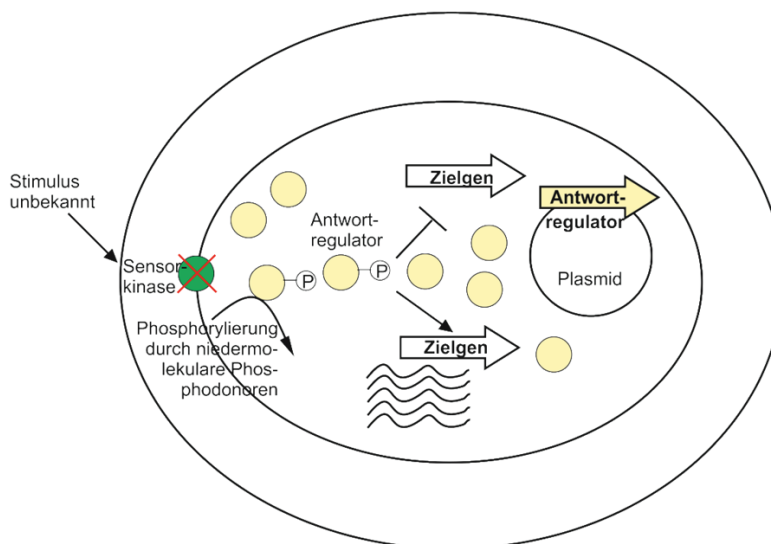


Abbildung 15: Artifizielle Induktion der Zielgene eines Zweikomponentensystems durch Überexpression des Antwortregulators und dessen unspezifische Phosphorylierung. Durch unspezifische Phosphorylierung mittels niedermolekularer Phosphodonoren kann der überexprimierte Antwortregulator in Abwesenheit der zugehörigen Sensorkinase phosphoryliert werden, ohne dass der Stimulus, auf den das Zweikomponentensystem natürlicherweise reagiert, bekannt ist. Dadurch wird eine artifizielle Induktion des Zweikomponentensystems erreicht, die in der Regulation der entsprechenden Zielgene des Systems resultiert.

Hier wird davon ausgegangen, dass ein Teil des Regulators, der durch die Überexpression in großer Menge vorliegt, unspezifisch durch niedermolekulare Phosphodonoren wie zum Beispiel Acetylphosphat phosphoryliert wird und somit die

Zielgene des Zweikomponentensystems regulieren kann. Da die zugehörige Sensorkinase in Abwesenheit ihres Stimulus jedoch als Phosphatase fungieren kann (Gao & Stock, 2009), ist es sinnvoll, die Überexpression des Antwortregulators in einer Deletionsmutante, in der die Sensorkinase oder das komplette Zweikomponentensystem deletiert ist, durchzuführen. Dies verhindert, dass der unspezifisch durch Phosphodonoren phosphorylierte Antwortregulator wieder dephosphoryliert wird.

Da im Fall des Zweikomponentensystems CgtRS2 schon vorhandene Deletionsmutanten in *cgtRS2* im Verdacht stehen Sekundärsuppressoren gebildet zu haben, wurde die Deletion von *cgtRS2* erneut in Anwesenheit eines plasmidkodierten Antwortregulators CgtR2 durchgeführt, um so die Notwendigkeit des Stammes aufgrund des fehlenden möglicherweise essentiellen CgtRS2 Systems Sekundärsuppressoren zu bilden zu minimieren.

2.1.1.1 DNA-Microarrays der Deletionsmutante $\Delta cgtRS2$ mit überexprimiertem CgtR2 im Vergleich zum Wildtyp

Zur Definition des Regulons von CgtRS2 wurde ein Transkriptomvergleich zwischen der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 $\Delta cgtRS2$, die in Anwesenheit eines plasmidkodierten Antwortregulators CgtR2 hergestellt wurde, und *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp mit dem entsprechenden Leervektor als Vergleichsstamm in BHIS-Medium angefertigt. Allerdings zeigte in diesem Vergleich kein Gen ein mehr als zweifach signifikant verändertes Transkriptionsniveau.

Aus *E. coli* ist bekannt, dass die intrazelluläre Acetylphosphatkonzentration den Phosphorylierungszustand und somit die Aktivität von Antwortregulatoren beeinflussen kann. Die intrazelluläre Acetylphosphatkonzentration ist jedoch je nach verstoffwechselter C-Quelle unterschiedlich und bei Pyruvat als C-Quelle vergleichsweise hoch (McCleary & Stock, 1994). Daher wurde der Versuch in CGXII-Medium mit 100mM Pyruvat als einziger C-Quelle wiederholt. Bei diesem Vergleich zeigten 72 Gene ein mehr als zweifach signifikant erhöhtes mRNA-Verhältnis und 227 Gene ein signifikant mehr als zweifach verringertes mRNA-Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp. Dies sind wesentlich mehr regulierte Gene als für ein Zweikomponentensystem zu erwarten sind. Die bisher untersuchten Zweikomponentensysteme in *C. glutamicum* besitzen lediglich 2 bis 22 Zielgene oder -operons (Bott & Brocker, 2012). Ein Teil der regulierten Gene könnte daher als

sekundäre Reaktion auf die Regulation direkter Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 erfolgen und somit indirekt reguliert sein. Falls das Zweikomponentensystem aber doch essentiell sein sollte, wie die möglichen Sekundärsuppressoren der Deletionsmutanten nahe legen, könnten auch Regulationen aufgrund der Deletion von CgtR2 auftreten. Solche Sekundärsuppressionen würden zur konstitutiven Transkription essentieller Zielgene oder zur Hochregulation von zu essentiellen Zielgenen funktionell redundanten Genen führen.

Um also mögliche indirekte Genregulationen aufgrund der Deletion von *cgtRS2* zu verhindern, wurde die Überexpression des Antwortregulators CgtR2 erneut in *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp durchgeführt, dessen Transkriptom per DNA-Microarray mit dem eines Stammes mit entsprechendem Leervektor verglichen wurde. Hierbei ist es möglich, dass nur ein Teil der Zielgene reguliert ist, da die Sensor kinase CgtS2 im genetischen Hintergrund des Wildtyps vorhanden ist und als Phosphatase fungieren könnte. Aber es sollten keine Gene aufgrund von Sekundärsuppressionen reguliert sein, die es in diesem Fall wahrscheinlich nicht gibt.

2.1.1.2 Microarrays des Wildtyps mit überexprimiertem CgtR2 im Vergleich zum Wildtyp mit entsprechendem Leervektor

Der Vergleich einer für eine Stunde induzierten *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp-Kultur mit einem Expressionsvektor für CgtR2 mit der entsprechenden Kultur mit Leervektor führte zur signifikanten mehr als zweifach veränderten Transkription von zehn Genen. Unter diesen waren sechs Gene vermehrt und vier Gene verringert transkribiert, wie in Tabelle 13 dargestellt ist. Einzelheiten zu den verändert transkribierten Genen sind der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 13: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach regulierte Gene aus den DNA-Microarrays des Vergleichs zwischen *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp mit Expressionsvektor für CgtR2 und *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp mit entsprechendem Leervektor.

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p -Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konser- viert in
Transkription								
CgtR2, Antwortregulator eines Zweikomponentensystems	cg0996	(10,34)	0,001	cytoplasm.	cg0996-cg0999			
Anorganischer Ionentransport und –metabolismus								
Dps, Hunger-induziertes DNA Schutzprotein	cg3327	2,42	0,000	cytoplasm.			wirkt oxidativem Stress entgegen, kann Eisen speichern / oxidieren (Calhoun & Kwon, 2011)	
Cg0623, Putativer Cobalt ECF Transporter, Transmembrankomponente	cg0623	2,25	0,004	Membran	cg0623-cg0621	(Rodionov et al., 2009)		<i>Actino- bacteria</i>
Replikation, Rekombination und Reparatur								
Cg1018, Putative ATP- abhängige DNA-Helicase	cg1018	2,27	0,000	cytoplasm.				<i>Actino- bacteria</i>
Nicht in COGs								
Cg0624, Sekretierte Oxidoreduktase	cg0624	2,23	0,006	C-terminal geankert	cg0625-cg0624	-		-
Cg0625, Sekretiertes Protein	cg0625	2,17	0,000	Membran	cg0625-cg0624	PF 13249	Prenyltransferase-ähnlich	-
PorB, Anionenspezifisches Porein der Mycolatmembran	cg1109	0,50	0,000	extrazellulär	cg1109-cg1108	(Costa-Riu et al., 2003)		
Cg2896, Putative sekretierte Endoglucanase	cg2896	0,46	0,001	Membran		Glycolhydro- lase der	u.a. Laminarinasen (Laminarin ist ein Speicherstoff von Braun-	-

Bemerkungen

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit *dps* ein Gen reguliert ist, das bei oxidativem Stress und der Eisenhomöostase eine Rolle spielt. Ansonsten sind viele Gene für sekretierte Proteine unter den regulierten Genen und ein Gen, dessen Produkt an der Zellwandbiogenese beteiligt sein könnte. Das Gen für die extracytoplasmatische Protease HtrA, das hinter den Genen für das Zweikomponentensystem CgtRS2 liegt, weist ein signifikantes mRNA-Verhältnis von 0,65 auf, was einer 1,54-fachen Herunterregulation entspricht. Dies könnte bedeuten, dass das Zweikomponentensystem CgtRS2 *htrA* reprimiert, was im Widerspruch zur Regulation des homologen Gens in *M. tuberculosis* stünde. Bei den durch Überexpression des Antwortregulators CgtR2 verändert transkribierten Genen handelt es sich jedoch zunächst um putative Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2. Im Folgenden wurde daher durch Gelretardationsexperimente überprüft, ob eine direkte Interaktion zwischen CgtR2 und den in Frage kommenden Promotorbereichen vorliegt. Eine direkte Interaktion bestätigt die putativen Zielgene als tatsächliche Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2.

2.1.2 Gelretardationsexperimente zur Untersuchung der Interaktion zwischen CgtR2 und den Promotorbereichen der mittels DNA-Microarray identifizierten putativen Zielgene

Durch Gelretardationsexperimente kann die Bindung eines Transkriptionsregulators an einen DNA-Bereich visualisiert werden, da die gebundene DNA bei elektrophoretischer Auftrennung langsamer läuft als ungebundene DNA. Zur Untersuchung der direkten Interaktion zwischen CgtR2 und Promotorbereichen von putativen Zielgenen wurden die entsprechenden Promotorbereiche mittels PCR amplifiziert. CgtR2 wurde mit N-terminalem Hexahistidintag und Thrombinschnittstelle in *E. coli* überexprimiert und anschließend über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (nicht gezeigt). Die Promotorbereiche der Gene *dps* (*cg3327*) und *cg2896*, die in den DNA-Microarrays am stärksten hoch- beziehungsweise herunterreguliert waren (siehe Tabelle 13), wurden als Positivkontrollen ausgewählt, da sie sehr wahrscheinlich gebunden werden. Als Negativkontrollen, die in den Gelretardationsexperimenten nicht gebunden werden sollte, wurden die Promotorbereiche von *cg0781*, *cg2331* und *cg2380* gewählt, da die zugehörigen Gene in den DNA-Microarrays nicht reguliert waren (mRNA-Verhältnisse 1,02, 0,99 und 0,93).

Antwortregulatoren von Zweikomponentensystemen werden *in vivo* unter physiologischen Bedingungen mit Hilfe ihrer zugehörigen Histidinkinase durch Phosphorylierung aktiviert. *In vitro* können Antwortregulatoren durch niedermolekulare Phosphodonoren phosphoryliert werden (Lukat *et al.*, 1992). Hierzu wird der Antwortregulator vor der Inkubation mit dem zu testenden Promotorbereich in Puffer inkubiert, der den gewählten Phosphodonor in einer Endkonzentration von 50 mM enthält. Eingangs muss getestet werden, durch welchen Phosphodonor der untersuchte Antwortregulator bevorzugt phosphoryliert wird. Gelretardationsexperimente mit N_{His6}-CgtR2 zeigten, dass die DNA-Binde-Aktivität dieses Antwortregulators für den Promotorbereich von *cg2896* durch Phosphorylierung mit Carbamoylphosphat oder Phosphoamidat deutlich gesteigert wird. Mit Acetylphosphat schien hingegen fast keine Phosphorylierung zu erfolgen, da kein Einfluss auf die Bindung des Promotorbereichs von *cg2896* festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

Trotz ausgiebiger Optimierungsversuche (Veränderung des Bandshiftpuffers durch Zusatz von Triton-X-100, von unterschiedlichen Mengen an Na₂EDTA, von BSA oder von Heparin, Abspaltung des His-Tags von CgtR2) war es nicht möglich, eine ausreichend spezifische Bindung des gereinigten CgtR2 in den Gelretardationsexperimenten zu erzeugen. Die Zugabe von BSA, also unspezifischem Protein, hatte einen geringen, positiven Effekt auf die Bindung von CgtR2 an die Promotorbereiche. Ein solcher Effekt der Aktivitätssteigerung von affinitätsgereinigten DNA-Bindeproteinen durch Zugabe von unspezifischen Proteinen ist in der Literatur beschrieben (Zhang *et al.*, 1992). Ebenso schien die Abspaltung des His-Tags, das bekanntlich einen Einfluss auf die Aktivität von Enzymen haben kann (Arnau *et al.*, 2006), einen geringen, positiven Einfluss zu haben.

Dies deutet darauf hin, dass der His-Tag die Konformation oder Aktivität von CgtR2 stört. Ebenso legt die verbesserte Bindspezifität bei Zugabe von BSA nahe, dass CgtR2 in einer proteinreichen Umgebung stabiler ist als in aufgereinigter Form in Puffer. Die Aufreinigung des Antwortregulators CgtR2 über die Ni-NTA-Säule, bei der andere Proteine abgetrennt werden, könnte also ebenfalls die korrekte Konformation des Regulators stören. Um die Aufreinigung sowie den störenden His-Tag zu vermeiden, wurde im Folgenden das Gen für CgtR2 ohne His-Tag in *E. coli* überexprimiert und Gelretardationsexperimente mit Rohextrakt aus diesem Stamm

durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Rohextrakt eines *E. coli* Stammes mit Leervektor ohne CgtR2 getestet um auszuschließen, dass der Rohextrakt aus *E. coli* schon Proteine enthält, die an den getesteten Promotorbereich binden könnten. Die Zunahme der Menge von CgtR2 ohne His-Tag in *E. coli* BL21 (DE3) im Laufe der Expression ist in Abbildung 16 dargestellt.

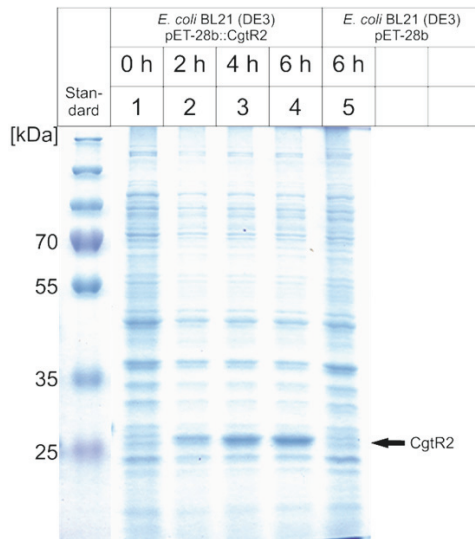


Abbildung 16: Expression von CgtR2 in *E. coli* BL21 (DE 3). In Spur 1-4 ist Gesamtzelllysate von *E. coli* BL21 (DE 3) mit dem Plasmid pET-28b::CgtR2 0 h (Spur 1), 2 h (Spur 2), 4 h (Spur 3) und 6 h (Spur 4) nach Induktion aufgetragen. In Spur 5 ist Gesamtzelllysate von *E. coli* BL21 (DE 3) mit Leervektor pET-28b 6 h nach Zugabe von 1 mM IPTG aufgetragen. Die aufgetragene Menge entspricht jeweils 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,05.

Für die Herstellung des löslichen Rohextrakts, der für die Gelretardationsexperimente eingesetzt wurde, wurden die Zellen in Bandshiftpuffer mit Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor wie unter IV.6.3 beschrieben aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch einen Tischzentrifugationsschritt, Membranfragmente in einem folgenden Ultrazentrifugationsschritt abgetrennt. Dieser Schritt ist nötig, da Antwortregulatoren sowohl von ihrer zugehörigen Histidinkinase als auch von anderen Histidinkinasen phosphoryliert wie auch dephosphoryliert werden können und diese membranständig sind. Abbildung 17 zeigt ein SDS-Gel der Proteinproben der einzelnen Zentrifugationsschritte.

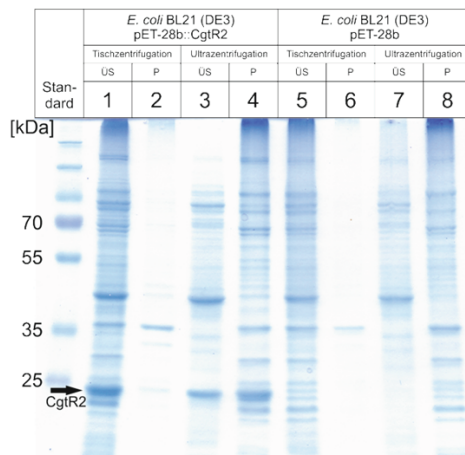


Abbildung 17: SDS-Gel der Proteinproben aus den Zentrifugationsschritten des Zellaufschlusses von *E. coli* BL21 (DE3) pET-28b::CgtR2 und *E. coli* BL21 (DE3) pET-28b. Aufgetragen sind je 2 µl des Überstandes (ÜS) oder des im ursprünglichen Volumen resuspendierten Pellets (P) des Tischzentrifugationsschrittes (Spur 1, 2, 5, 6) und des Ultrazentrifugationsschrittes (Spur 3, 4, 7, 8) der Aufschlüsse von *E. coli* BL21 (DE3) pET-28b::CgtR2 (Spur 1-4) und *E. coli* BL21 (DE3) pET-28b (Spur 5-8).

Wie die Proteinbande unterhalb der 25 kDa-Markerbande im Überstand (ÜS) des Tischzentrifugationsschrittes (Spur 1) zeigt, liegt CgtR2 löslich vor. Im Pellet (P) des Tischzentrifugationsschrittes (Spur 2), in dem „Inclusion bodies“ – sofern sie vorhanden sind – und Zelltrümmer zu erwarten wären, sind hingegen fast keine Proteinbanden zu sehen. Im Überstand der Ultrazentrifugation (Spur 3) ist wiederum eine große Menge an löslichem CgtR2, wobei im Pellet des Ultrazentrifugationsschrittes (Spur 4) fast ebenso viel CgtR2 vorhanden ist. Das deutet darauf hin, dass ein Teil des exprimierten CgtR2 membranassoziiert vorliegt. Die analogen Proben von *E. coli* BL21 (DE3) mit Leervektor (pET-28b) (Spur 5-8) zeigen das gleiche Bandenmuster abgesehen von der Bande des Regulators CgtR2. Für die Gelretardationsexperimente wurde der Überstand der Ultrazentrifugation mit löslichem CgtR2 eingesetzt.

Wie in Abbildung 18 gezeigt ist, ist die Phosphorylierung von CgtR2 im Rohextrakt möglich. Experiment A zeigt die Verlangsamung des Promotorbereichs von *cg2896* durch Rohextrakt mit CgtR2, das mit Phosphoamidat phosphoryliert wurde. In Experiment A*, in dem ein Aliquot desselben Rohextrakts mit Kaliumphosphatpuffer anstelle des Phosphoamidats inkubiert wurde, wird der Promotorbereich von *cg2896* hingegen nicht verlangsamt. Der Rohextrakt der Kontrollkultur mit Leervektor wurde zuvor ebenfalls mit Phosphoamidat inkubiert, um eventuell vorhandene durch

Phosphorylierung aktivierte DNA-Bindeaktivitäten zu sehen. Der zur Kontrolle eingesetzte *E. coli* Rohextrakt ohne CgtR2 zeigt jedoch für keinen der getesteten Promotorbereiche eine DNA-Bindeaktivität. Eine Bindung eines Promotorbereichs ist also immer CgtR2 zuzuschreiben.

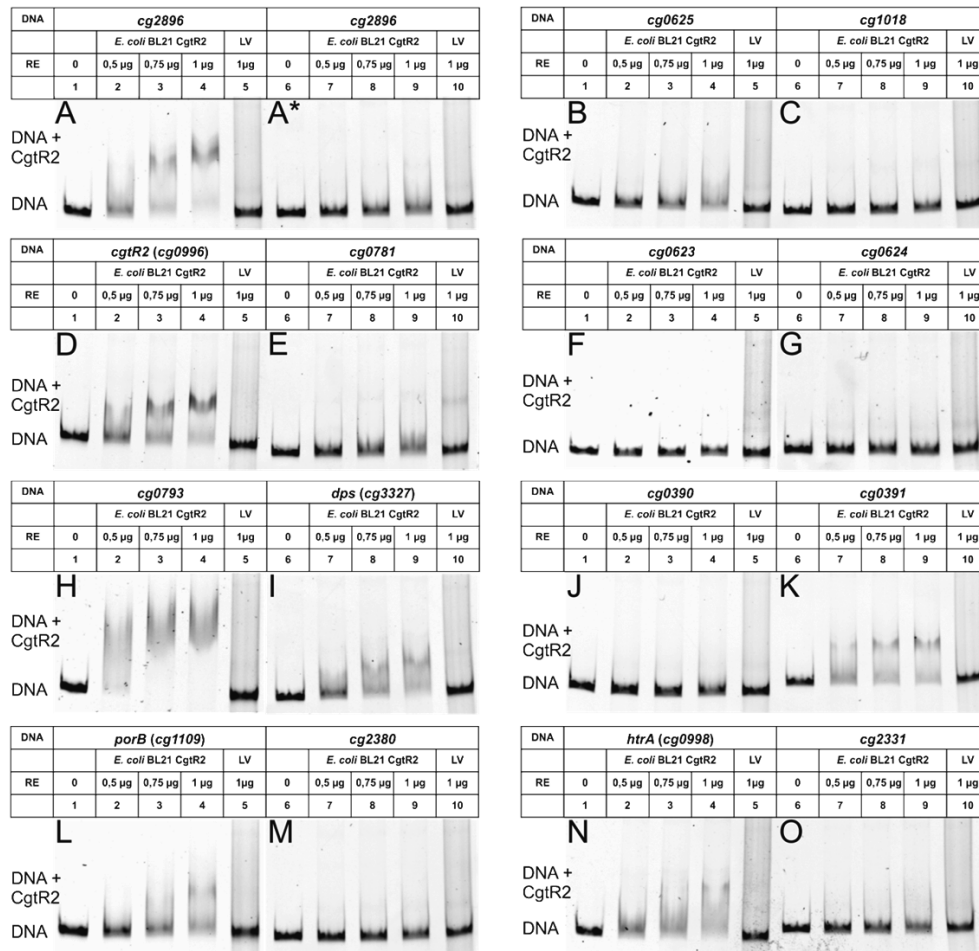


Abbildung 18: Gelretardationsexperimente mit Rohextrakt (RE) einer CgtR2 exprimierenden *E. coli* Kultur und verschiedenen Promotorbereichen (DNA). Im Experiment A* wurde der Phosphorylierungsschritt von CgtR2 im RE als Negativkontrolle in Kaliumphosphatpuffer durchgeführt, in allen anderen Experimenten wurde der Phosphorylierungsschritt in Phosphoamidat durchgeführt. Aufgetragen sind pro Spur je 70 ng des jeweiligen Promotorbereichs, in Spur 1 und 6 je ohne RE, in Spur 2 und 7 mit je 0,5 µg RE mit CgtR2, in Spur 3 und 8 mit je 0,75 µg RE mit CgtR2, in Spur 4 und 9 mit je 1 µg RE mit CgtR2 und in Spur 5 und 10 mit je 1 µg RE ohne CgtR2 aus *E. coli* BL21 (DE3) mit Leervektor (LV).

Als gebunden wird ein Promotorbereich dann betrachtet, wenn der Hauptanteil der DNA langsamer, also höher, läuft als ohne zugegebenen Regulator. Somit zeigt der Rohextrakt mit CgtR2 eine Bindung der Promotorbereiche von *cg2896* (A), *cgtR2*

(*cg0996*, D), *cg0793* (H), *dps* (*cg3327*, I), *cg0391* (K), *porB* (*cg1109*, L) und *htrA* (*cg0998*, N). Für die als Negativkontrollen getesteten Promotorbereiche von *cg0781* (E), *cg2380* (M) und *cg2331* (O) wurde keine Verlangsamung der Fragmente im Gel und somit keine Bindung durch CgtR2 beobachtet. Für den Promotorbereich von *cg0625* (B) kann nicht entschieden werden, ob eine spezifische Bindung durch CgtR2 erfolgt, da keine langsamer laufende Bande, auch nicht bei Inkubation mit 1 µg Rohextrakt mit CgtR2 (Spur 4), zu sehen ist. Das weist darauf hin, dass keine Bindung erfolgt. Allerdings befindet sich der Promotorbereich nicht mehr vollständig auf der Höhe, auf der er ohne zugegebenen CgtR2 läuft (Spur 1), was wiederum auf eine Interaktion zwischen CgtR2 und dem Promotorbereich von *cg0625* schließen lässt. Die Interaktion könnte in diesem Fall schwächer sein als die Interaktion von CgtR2 mit den definitiv verlangsamten Promotorbereichen (A, D, H, I, K, L, N), da sie bei 1 µg RE (B, Spur 4) zu einem ähnlichen Laufverhalten führt wie 0,5 µg RE mit den Promotorbereichen von *cg2896*, *cgtR2* und *dps* (A, D, I, jeweils Spur 2 oder 7). Für die in den DNA-Microarrayexperimenten regulierten Gene *cg1018* (C), *cg0623* (F) und *cg0624* (G) konnte keine Bindung zwischen CgtR2 und den entsprechenden Promotorbereichen gezeigt werden. Dies zeigt, dass die in den DNA-Microarrays beobachtete Regulation eine sekundäre Reaktion, wie beispielsweise die Reaktion aufgrund der Regulation eines direkten Zielgens oder die Reaktion auf die Überexpression von CgtR2, darstellt. Da das Gen *cg0391* als zweites Gen des Operons *cg0390-cg0391* annotiert war, lag der Schluss nahe, dass die Regulation mit Hilfe des Promotorbereichs von *cg0390* erfolgt. Daher wurde dieser ebenfalls auf Bindung durch CgtR2 getestet (J). Allerdings konnte auch hier keine Bindung gezeigt werden. Die *in vitro* durch Gelretardationsexperimente gezeigte Bindung von CgtR2 an die Promotorbereiche von *cg2896* (A), *cgtRS2* (*cg0996*, D), *cg0793* (H), *dps* (*cg3327*, I), *cg0391* (K) und *porB* (*cg1109*, L) bestätigt die in den DNA-Microarray gesehene Regulation als direkte Regulation. All diese Gene sind Zielgene und somit Teil des Regulons des Zweikomponentensystems CgtRS2.

Die Bindung von CgtR2 an den Promotorbereich von *htrA* (*cg0998*, N) konnte ebenfalls gezeigt werden. Dies bestätigt die naheliegende Regulation aufgrund der Anordnung der Gene im Genom von *C. glutamicum*, in dem *htrA* in einem Operon *cgtR2(cg0996)-cgtS2(cg0997)-htrA(cg0998)-cg0999* vorliegt. Zudem wurde diese Regulation aufgrund der Ähnlichkeit zum Operon in *M. tuberculosis* erwartet, in dem die Regulation des *htrA*-Homologs durch das davorliegende

Zweikomponentensystem bereits gezeigt wurde (He & Zahrt, 2005). Allerdings bleibt zu bedenken, dass *htrA* in den Deletionsmutanten von *cgRS2*, die aber mit hoher Wahrscheinlichkeit Sekundärmutationen aufweisen, noch immer reguliert wurde. Darüber hinaus ist die Regulation in *M. tuberculosis* aktivierender Natur, während *htrA* in den DNA-Microarrays bei Überexpression von CgtR2 signifikant mehr als 1,5-fach herunterreguliert ist (mRNA-Verhältnis 0,65). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation von *htrA* in *C. glutamicum* anders als in *M. tuberculosis* von Statten geht.

2.1.3 Fazit zur Regulation von *htrA* als Reaktion auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion eines heterologen Proteins in *C. glutamicum*

Das Gen *htrA*, das für eine extracytoplasmatische Protease mit PDZ-Domäne kodiert, wurde in *C. glutamicum* als Reaktion auf die Expression und Sec-abhängigen Sekretion eines heterologen Proteins hochreguliert (Scheele, 2012, Kleine, nicht veröffentlicht). Die Induktion solcher extracytoplasmatischen Proteasen mit PDZ-Domäne als Reaktion auf ungefaltete Proteine in der Zellhülle, die bei vermehrter Sec-abhängiger Sekretion dort akkumulieren können, ist aus *E. coli* und *B. subtilis* bekannt (Strauch *et al.*, 1989, Snyder *et al.*, 1995, Hyryläinen *et al.*, 2005). Aufgrund der Anordnung im Genom von *C. glutamicum*, in dem *htrA* hinter den Genen für das Zweikomponentensystem CgtRS2 liegt, und aufgrund homologer Genen in *M. tuberculosis*, in dem das Zweikomponentensystem die Transkription der Protease aktiviert (He & Zahrt, 2005), wurde das Zweikomponentensystem CgtRS2 untersucht. Mit Hilfe von DNA-Microarray wurden putative Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 identifiziert. Die tatsächliche Zugehörigkeit dieser Gene und von *htrA* zum Regulon von CgtRS2 wurde außerdem mit Gelretardationsexperimenten überprüft. Hierdurch konnten in der vorliegenden Arbeit die Gene *cgRS2* (*cg0996-cg0997*), *dps* (*cg3327*), *porB* (*cg1109*), *rmlB2* (*cg0391*), *cg2896*, *cg0793* und *htrA* (*cg0998*) als direkte Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 identifiziert werden. Allerdings deutet die 1,5-fache Repression von *htrA* in den DNA-Microarrays auf eine Repression durch das Zweikomponentensystem CgtRS2 hin. In diesem Fall müsste die Induktion von *htrA* als Reaktion auf die Sec-abhängige Sekretion von Proteinen durch einen weiteren Transkriptionsregulator oder Sigmafaktor erfolgen.

2.2 Transkriptionelle Regulation von Genen, die für Proteine mit PspC- („Phage Shock“ Protein C) oder PspA-Domäne kodieren, als Reaktion auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion eines heterologen Proteins in *C. glutamicum*

Ebenso wie *htrA* waren unter den Genen, welche bei Expression und Sec-abhängiger Sekretion heterologer Proteine reguliert waren, auch Gene, die für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne kodieren. Die „Phage Shock“ Antwort, die zum Beispiel in *E. coli* und *B. subtilis* gut untersucht ist, dient der Sicherstellung der Integrität der Cytoplasmamembran und ist bisher in *C. glutamicum* nicht beschrieben. Aus *E. coli* und *B. subtilis* ist bekannt, dass Proteine mit PspC-Domäne an der Reizwahrnehmung beteiligt sind, während Proteine mit PspA-Domäne eine Effektorfunktion zur Stabilisation der Membran übernehmen. Zur Induktion der „Phage Shock“ Antwort wurden inzwischen unterschiedlichste Stimuli gefunden, darunter auch die Sec-abhängige Sekretion einer Amylase in *B. subtilis* (Hyryläinen *et al.*, 2005, Joly *et al.*, 2010). Wie in Tabelle 12 dargestellt, werden in *C. glutamicum* bei Expression und Sec-abhängiger Sekretion von Amylasen die Gene *cg1325* und *cg0706*, die für Proteine mit PspC-Domäne kodieren, und das Gen *cg3264*, das für ein Protein mit PspA-Domäne kodiert, hochreguliert. Neben dem Gen *cg0706* liegen im Genom von *C. glutamicum* die Gene für das Zweikomponentensystem *cgtSR7* in entgegengesetzter Orientierung. Dies entspricht fast der Anordnung der Gene in *B. subtilis* (Abbildung 19), in dem die „Phage Shock“ Antwort durch ein Zweikomponentensystem reguliert wird, dessen Gene als Operon hinter dem zugehörigen Repressor liegen (Jordan *et al.*, 2006). Somit ist denkbar, dass auch in *C. glutamicum* eine „Phage Schock“ Antwort existiert, die in diesem Organismus durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 reguliert ist. Das Besondere in *C. glutamicum* ist, dass die Sensorkinase CgtS7 ebenfalls über eine PspC-Domäne verfügt und somit selbst als Sensor für die „Phage Shock“ Antwort dienen könnte. Ein Zweikomponentensystem, das direkt als Sensor für die „Phage Shock“ Antwort fungiert, ist bisher nicht bekannt.

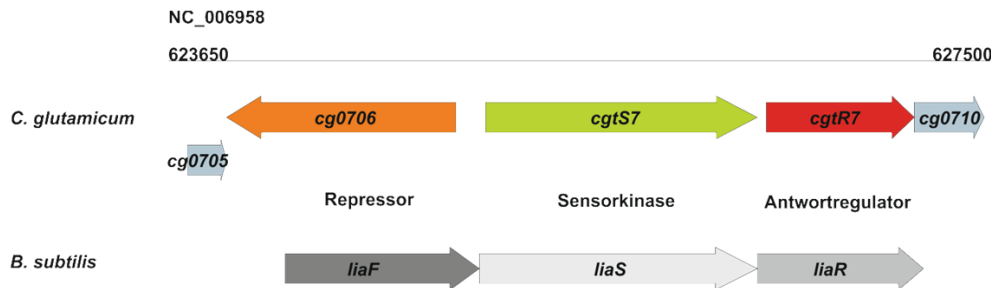


Abbildung 19: Genomische Anordnung von *cg0706*, *cgtS7* und *cgtR7* in *C. glutamicum* (NCBI Reference Sequence: NC_006958.1) und zum Vergleich die Anordnung der Gene zur Regulation der „Phage Shock“ Antwort in *B. subtilis*. Nach Jordan *et al.*, 2006 modifiziert.

2.2.1 Proteine mit „Phage Shock“-Domäne in *C. glutamicum*

Um einen Überblick darüber zu bekommen wie viele Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne in *C. glutamicum* insgesamt existieren, wurde mit SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) nach Proteinen mit PspC-Domäne und PspA-Domäne in *C. glutamicum* gesucht. Wie in Tabelle 14 gezeigt ist, besitzt *C. glutamicum* vier Proteine mit PspC-Domäne, die an der Reizwahrnehmung einer „Phage Shock“ Antwort beteiligt sein könnten, und zwei Proteine mit PspA-Domäne, die eine Effektorfunktion haben könnten.

Tabelle 14: Von SMART vorhergesagte Proteine mit PspC- und PspA-Domäne in *C. glutamicum*.

Annotation	Domäne	Gen	Domänenarchitektur nach SMART
Cg1119, Putativer stressabhängiger Transkriptionsregulator	PspC	<i>cg1119</i>	
Cg1325, Putativer stressabhängiger Transkriptionsregulator	PspC	<i>cg1325</i>	
Cg0706, Konserviertes hypothetisches Membranprotein	PspC	<i>cg0706</i>	
CgtS7, Zweikomponenten-sensorkinase	PspC	<i>cg0707</i>	
Cg3264, Hypothetisches Protein	PspA	<i>cg3264</i>	
Cg2151, Homolog zu „Phage Shock“ Protein A	PspA	<i>Cg2151</i>	

Das Gen für das konservierte hypothetische Membranprotein Cg0706, das wie das Gen für den Inhibitor LiaF des „Phage Shock“ Systems in *B. subtilis* neben den Genen für ein Zweikomponentensystem liegt, besitzt nach der SMART-Analyse außer der PspC-Domäne zwei Transmembrandomänen (blau dargestellt) und eine DUF2154-Domäne (Domain of Unknown Function), die als Antwortdomäne auf zellwandaktive Antibiotika beschrieben ist. Diese kommt im Repressor LiaF des Lia-Systems aus *B. subtilis* ebenfalls vor (SMART) (Mascher *et al.*, 2004, Jordan *et al.*, 2006). Die Sensorkinase des Zweikomponentensystems CgtSR7 besitzt ebenfalls eine PspC-Domäne, vier Transmembrandomänen und eine HATPase_c-Domäne, also eine einer Histidinkinase ähnliche ATPase-Domäne. Außer den bei Sec-Sekretion regulierten Genen für Proteine mit PspC- und PspA-Domäne (Cg1325, Cg0706 und Cg3264) gibt es in *C. glutamicum* demnach zwei weitere nicht regulierte Gene für Proteine mit PspC-Domäne (CgtS7, Cg1119) und ein weiteres nicht reguliertes Gen für ein Protein mit PspA-Domäne (Cg2151).

2.2.2 Definition des Regulons von CgtSR7

Um zu untersuchen, ob das Zweikomponentensystem CgtSR7 die während Sec-Sekretion regulierten Gene, die für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne kodieren, tatsächlich reguliert, wurden DNA-Microarrays angefertigt. Verglichen wurde die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 $\Delta cgtSR7$, die einen Expressionsvektor für CgtR7 enthielt, mit dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 mit entsprechendem Leervektor. Die Überexpression von CgtR7 in der Deletionsmutante des zugehörigen Zweikomponentensystems diente dazu, eine spezifische Dephosphorylierung des Antwortregulators CgtR7 durch seine Sensorkinase CgtS7 in Abwesenheit eines Stimulus auszuschließen. Die Sensorkinase eines Zweikomponentensystems phosphoryliert den zugehörigen Antwortregulator, sobald sie durch den vorgesehenen Stimulus aktiviert wurde (Gao & Stock, 2009), mit wenigen Ausnahmen wie den Sensorkinasen des Quorum Sensing LuxN, LuxQ und CqsS (Henke & Bassler, 2004). In Abwesenheit des Stimulus zeigen viele Sensorkinasen eine Phosphataseaktivität.

Wie in Tabelle 15 dargestellt ist, sind in diesem Transkriptomvergleich 29 Gene signifikant mehr als zweifach reguliert. Diese sind in 19 Operons organisiert und zeigen alle bis auf ein Gen ein erhöhtes mRNA-Verhältnis. Unter den regulierten Genen sind auch das zusätzlich plasmidkodierte Gen für den Antwortregulator CgtR7

und das deletierte Gen für die Sensorkinase CgtS7. Die veränderten mRNA-Verhältnisse dieser beiden Gene können aufgrund der zusätzlichen Kopien beziehungsweise der Deletion nicht bewertet werden. Die erhöhte Transkription von *cg0710* weist jedoch auf eine positive Autoregulation des Zweikomponentensystems hin, da dieses Gen im vorhergesagten Operon *cgtR7-cgtS7-cg0710* liegt (Pauling *et al.*, 2012). Unter den regulierten Genen befinden sich auch die bei Sec-Sekretion regulierten Gene *cg1325*, *cg0706* und *cg3264*, die für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne kodieren. Die Gene *cg1325* und *cg0706* sind hierbei die am höchsten regulierten Gene. Das Gen *cg0706* könnte aufgrund der ähnlichen genomischen Anordnung zum Zweikomponentensystem *cgtSR7* wie *liaF* zum Zweikomponentensystem *liaSR* in *B. subtilis* und der in beiden Proteinen vorhandenen DUF2140-Domäne für einen Repressor des Zweikomponentensystems CgtSR7 kodieren. Weitere Details zu den verändert transkribierten Genen sind der Tabelle zu entnehmen.

Am auffälligsten ist die Regulation vieler Gene für Chaperone, namentlich DnaK, GrpE, DnaJ, ClpB und Cg2330, das gewisse Homologie zu Hsp15 aus *E. coli* aufweist, welches am Recycling der 50S-Untereinheit des Ribosoms beteiligt ist (Korber *et al.*, 2000). Diese könnten aufgrund der Überexpression des plasmidkodierten CgtR7, da bekannt ist dass die Überexpression von Proteinen die Expression von Chaperonen induzieren kann (Goff & Goldberg, 1985), oder aufgrund der Zugehörigkeit zum Regulon des Zweikomponentensystems CgtSR7 reguliert sein.

Außerdem sind die Gene für zwei ABC-Transporter, nämlich das Operon *cg3322-cg3321-cg3320* und das Operon *cg2812-cg2811*, hochreguliert. Cg3320 hat wie der Makrolid-Exporter MacB (Kobayashi *et al.*, 2001) oder das „Lipoprotein release system“ (Lol) aus *E. coli* vier Transmembrandomänen pro Untereinheit. Die Permeasekomponente Cg2811 ähnelt mit seinen zehn Transmembranhelices zwei in *S. coelicolor* beschriebenen ABC-Transportern, die zur Resistenz gegen Bacitracin beitragen (Hesketh *et al.*, 2011). Dieses zellwandaktive Antibiotikum induziert das Lia-System in *B. subtilis*, daher würde die Resistenzfunktion eines ABC-Transporters eine weitere Ähnlichkeit in der Funktion der beiden Zweikomponentensysteme darstellen.

Tabelle 15: Signifikant (p -Wert $\leq 0,05$) mehr als zweifach verändert transkribierte Gene des Vergleichs von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ cgfSR7 mit Expressionsvektor für CgtR7 mit *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp mit Leervektor.

Annotation / COG	Gen	mRNA-Verhältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Transkription								
Cg1325, Putativer stressabhängiger Transkriptionsregulator	cg1325	55,60	0,002	N-terminal verankert		PspC-Domäne	Reizwahrnehmung	<i>Bacteria</i>
Cg0706, Konserviertes hypothetisches Membranprotein	cg0706	42,15	0,002	Membran		PspC / DUF2154	Reizwahrnehmung / Antwort auf zellwandaktive Antibiotika	<i>Corynebacteria</i>
CgtR7, Antwortregulator eines Zweikomponentensystems	cg0709	(31,46)	0,000	cytoplasm.	cg0707-cg0710			
Cg3264, Hypothetisches Protein mit PspA-Domäne	cg3264	4,72	0,000	cytoplasm.		PspA	Effektor der „Phage Shock“ Antwort	<i>Bacteria</i>
HspR, Transkriptionsregulator der MerR-Familie	cg3097	2,44	0,001	cytoplasm.	cg3100-cg3097	Repressor von <i>dnaK</i> , <i>grpE</i> , <i>dnaJ</i>		<i>Actinobacteria</i>
Translation								
Cg2330, Ribosomen-assoziiertes Hitzeschockprotein	cg2330	7,36	0,002	cytoplasm.	cg2332-cg2330	COG1188	an 50S Ribosomen-Recycling beteiligt	<i>Bacteria</i>
Signaltransduktionsmechanismen								
CgtS7, Sensorkinase eines Zweikomponentensystems	cg0707	(0,32)	0,022	Membran	cg0707-cg0710			<i>Bacteria</i>
Replikation, Rekombination und Reparatur								
Ssb, Einzelstrang-DNA-Bindeprotein	cg3307	2,06	0,035	cytoplasm.				<i>Bacteria</i>
Posttranslationale Modifikationen, Protein Turnover, Chaperone								
CipB, Hitzeschockprotein	cg3079	18,05	0,002	cytoplasm.	cg3079-cg3978			<i>Bacteria</i>

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konserviert in
Bemerkungen								
DnaJ, Chaperon mit DnaK, Hitzeschockprotein	<i>cg3098</i>	2,30	0,007	cytoplasm.	<i>cg3100-cg3097</i>			<i>Bacteria</i>
GrpE, Chaperon GrpE, Hitzeschockprotein	<i>cg3099</i>	2,30	0,002	cytoplasm.	<i>cg3100-cg3097</i>			<i>Bacteria</i>
DnaK, Chaperon mit DnaJ, Hitzeschockprotein	<i>cg3100</i>	5,58	0,086 ^d	cytoplasm.	<i>cg3100-cg3097</i>			<i>Bacteria</i>
Nicht in COGs								
Cg3078, Hypothetisches Protein	<i>cg3078</i>	16,51	0,001	cytoplasm.	<i>cg3079-cg3078</i>	PF14085 / DUF4265	Funktion unbekannt	-
Cg3077, Hypothetisches Protein	<i>cg3077</i>	8,57	0,001	Membran		-		-
Cg0781, Membranprotein	<i>cg0781</i>	7,69	0,001	Membran		PF06271 / RDD- Familie	hoch konserviertes Arg und zwei Asp, Funktion unbekannt	<i>Coryne- bacteria</i>
Cg3142, Hypothetisches Protein	<i>cg3142</i>	7,36	0,002	Membran		DUF1707	Funktion unbekannt	<i>Coryne- bacterium</i>
Cg2331, Hypothetisches Protein	<i>cg2331</i>	7,20	0,000	Membran	<i>cg2332-cg2330</i>	-	das laut Vorhersage ebenfalls im Operon liegend <i>cg2332</i> zeigt kein verändertes mRNA- Verhältnis (1,06)	<i>Coryne- bacterium</i>
Cg2444, Hypothetisches Protein	<i>cg2444</i>	5,70	0,002	cytoplasm.		-		-
Cg0710, Membranprotein	<i>cg0710</i>	3,77	0,003	Membran	<i>cg0707-cg0709</i>	-		-
Cg0705, Hypothetisches Protein	<i>cg0705</i>	3,75	0,002	cytoplasm.		-		-
Cg0452, Hypothetisches Protein	<i>cg0452</i>	2,47	0,001	cytoplasm.	<i>cg0451-cg0453</i>	-		-
Allgemeine Funktionsvorhersage								
Cg3143, Putatives sekretiertes Protein	<i>cg3143</i>	3,75	0,001	N-terminal verankert		COG2085	Dinukleotid-bindende Enzyme	<i>Bacteria</i>
Cg2796, Protein der MmgE / PrpD-Familie	<i>cg2796</i>	0,49	0,029	cytoplasm.		COG2079	involviert in Propio- nukatabolismus	<i>Bacteria</i>

Annotation / COG	Gen	mRNA- Ver- hältnis ^a	p-Wert	Lokalisation ^b	Operon ^c	konservierte Domänen (BLAST)	Domäne ist charakteristisch für	konser- viert in
Funktion unbekannt								
Cg2684, Membranprotein der DedA-Familie	cg2684	7,68	0,002	Membran		COG0586		<i>Bacteria</i>
Cg0451, Hypothetisches Protein	cg0451	4,08	0,000	Membran	<i>cg0451-cg0453</i>	COG2733		<i>Bacteria</i>
Verteidigungsmechanismen								
Cg3320, ABC-Transporter, an der Lipoprotein- freisetzung beteiligt, Permeasekomponente	cg3320	25,88	0,000	Membran				<i>Bacteria</i>
Cg3322, Putatives sekretiertes Membranfusionsprotein	cg3322	22,21	0,000	N-terminal verankert				<i>Bacteria</i>
Cg3321, ABC-Transporter, an der Lipoprotein- freisetzung beteiligt, ATPase-Komponente	cg3321	19,70	0,000	cytoplasm.				<i>Bacteria</i>
Cg2812, ABC-Transporter, an der Lipoprotein- freisetzung beteiligt, ATPase-Komponente	cg2812	6,63	0,000	cytoplasm.				<i>Bacteria</i>
Zellwand- / Membranbiogenese								
Cg2811, ABC-Transporter, an der Lipoprotein- freisetzung beteiligt, Permeasekomponente	cg2811	6,30	0,003	Membran				<i>Bacteria</i> <i>Bacteria</i>

Fett gedruckte Gene sind jeweils das erste Gen einer Transkriptionseinheit.

COGs – "Clusters of Orthologous Groups of Proteins"

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes C. *glutamicum* ATCC 13032 Δ*ggsR7* mit Expressionsvektor für CgIR7 zum Stamm C. *glutamicum* ATCC 13032 WT mit entsprechendem Leervektor

^bLokalisation des Proteins nach LocatEP Database (<http://www.cmbi.ru.nl/locatEP-db/cgi-bin/locatEPdb.py>)

^cVorhergesagtes Operon nach CoryneRegNet (Pauling et al., 2012) oder durch experimentelle Bestätigung

PF „Pfam Protein Familie“ (Punta et al., 2012)

^dDas mRNA-Verhältnis ist nicht signifikant

(Das veränderte mRNA-Verhältnis von *cgIR7* (*cg0709*) ist aufgrund der Überexpression des plasmidkodierten CgIR7 und das veränderte mRNA-Verhältnis von *cgIS7* (*cg0707*) ist aufgrund der Deletion des Gens im untersuchten Stamm nicht bewertbar)

Zusammenfassend befinden sich unter den möglicherweise durch CgtSR7 regulierten Genen Gene für Proteine mit PspC-Domäne (*cg0706*, *cgtS7* (*cg0707*) und *cg1325*) und ein Gen für ein Protein mit PspA-Domäne (*cg3264*). Es könnte sich also tatsächlich um das Pendant des „Phage Shock“-Systems aus *E. coli* oder des Lia-Systems aus *B. subtilis* handeln. Zudem kodieren von den insgesamt 29 regulierten Genen 13 für putative Membranproteine (*cg1325*, *cg0706*, *cgtS7* (*cg0707*), *cg3077*, *cg0781*, *cg3142*, *cg2331*, *cg2444*, *cg0710*, *cg2684*, *cg0451*, *cg3320*, *cg3322*, *cg2811*). Das entspricht einem Anteil von 45% und ist somit ein deutlich höherer Anteil als der Anteil an putativen Membranproteinen im gesamten Genom von *C. glutamicum* mit 22% (Kalinowski *et al.*, 2003). Dies deutet auf eine Funktion des Zweikomponentensystems CgtSR7 bei der Instandhaltung der Integrität der Zellmembran oder der Zellhülle hin.

Allerdings muss überprüft werden, ob es sich bei den hier identifizierten putativen Zielgenen des Zweikomponentensystems CgtSR7 um tatsächliche Zielgene handelt. Dies wurde im Folgenden mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten untersucht.

2.2.3 Gelretardationsexperimente zur Untersuchung der Interaktion zwischen CgtR7 und den Promotorbereichen der mittels DNA-Microarray identifizierten putativen Zielgene

Um zu überprüfen, ob die putativen per DNA-Microarrays identifizierten Zielgene direkt durch CgtR7 reguliert werden, wurden Gelretardationsexperimente mit gereinigtem N_{His}-CgtR7 und den jeweiligen Promotorbereichen durchgeführt. Hierfür wurde der Antwortregulator CgtR7 mit N-terminalem His-Tag in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und über Ni-NTA-Agarose affinitätsgereinigt. Die dafür notwendige Expression von N_{His}-CgtR7 erfolgte durch Induktion mit 1 mM IPTG für vier Stunden in *E. coli* BL21 (DE3) bei 20 °C wie unter IV.3.2.5 beschrieben. Wie in Abbildung 20 (A) gezeigt ist, nimmt die Menge des produzierten N_{His}-CgtR7, das auf Höhe der 25 kDa Bande läuft, vom Zeitpunkt der Induktion (0 h, Spur 3) bis vier Stunden danach (Spur 4-7) kontinuierlich zu. Das Gesamtzelllysate der Kultur mit Leervektor (Spur 1) zeigt zum Vergleich das Proteinbandenmuster der Proteine aus *E. coli* nach vierstündiger Kultivierung mit 1 mM IPTG.

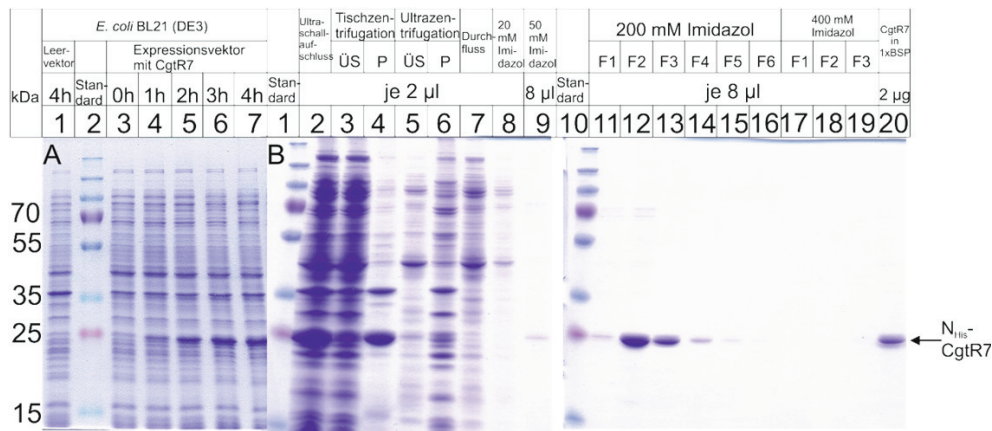


Abbildung 20: SDS-Gel zur Überprüfung der Expression von N_{His}-CgtR7 in *E. coli* BL21 (DE3) (A), des anschließenden Zellaufschlusses und der Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose (B). (A) Dargestellt sind Gesamtzelllysate der Kultur mit Leervektor nach 4 h Induktion (Spur 1) oder der Kultur mit Expressionsvektor für N_{His}-CgtR7 nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h Induktion (Spur 3-7). Die aufgetragene Proteinmenge entspricht jeweils 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,05. Als Standard sind 5 µl Pageruler Plus Prestained Protein Ladder aufgetragen (Fermentas, Spur 2). (B) Dargestellt sind je 2 µl des per Ultraschall aufgeschlossenen Gesamtzelllysats, von Überstand (ÜS) und Pellet (P) der Tischzentrifugation, ÜS und P der Ultraschall-zentrifugation, des Durchflusses und des ersten Waschschr. mit 20 mM Imidazol (Spur 2-8). Vom zweiten Waschschr. mit 50 mM Imidazol (Spur 9), den sechs Elutionsfraktionen (F1-F6) mit 200 mM Imidazol (Spur 11-16) und dem abschließenden Waschschr. mit 400 mM Imidazol (Spur 17-19) sind je 8 µl aufgetragen. Spur 20 zeigt 2 µg des gereinigten umgepufferten CgtR7 in 1x Bandshiftpuffer (1x BSP). Standards sind in Spur 1 und 10 wie unter (A) beschrieben aufgetragen.

Mit dem SDS-Gel in Abbildung 20 (B) wurden die einzelnen Schritte des Zellaufschlusses und der Aufreinigung von N_{His}-CgtR7 überprüft. Details zu den einzelnen Schritten sind unter IV.6.3, IV.6.4 und IV.6.5 beschrieben. Obwohl im hier dargestellten Fall der größere Teil des exprimierten N_{His}-CgtR7 als „Inclusion bodies“ im Pellet der Tischzentrifugation (Spur 4) zu finden ist, war der lösliche Anteil ausreichend für die Aufreinigung per Ni-NTA-Agarose-Säule. Für diese wurden nur die cytosolischen löslichen Proteine (Spur 5) eingesetzt. Gebundenes N_{His}-CgtR7 wurde mittels sechs Fraktionen à 1 ml mit 200 mM Imidazol eluiert (Spur 11-16). Zur Umpufferung mit Hilfe einer PD-10 Säule wurde Protein aus den Fraktionen F2-F4 (Spur 12-14) eingesetzt. Zusammenfassend wird deutlich, dass zwar der größte Teil des N_{His}-CgtR7 während der Expression in „Inclusion bodies“ aggregiert, jedoch eine ausreichende Menge an N_{His}-CgtR7 für eine erfolgreiche Aufreinigung in löslicher Form vorliegt.

Wie auch andere Antwortregulatoren von Zweikomponentensystemen (Gao & Stock, 2009), besitzt N_{His}-CgtR7 eine höhere Affinität zur DNA, wenn es vor Inkubation mit

dem zu untersuchenden Promotorbereich *in vitro* phosphoryliert wurde. In ersten Experimenten wurde festgestellt, dass Acetylphosphat unter den drei getesteten Substanzen Acetylphosphat, Carbamoylphosphat und Phosphoamidat am besten zur *in vitro* Phosphorylierung von N_{His}-CgtR7 geeignet ist. Abbildung 21 zeigt die Gelretardationsexperimente mit CgtR7 und den Promotorbereichen aller Operons, die in den DNA-Microarrays bei Überexpression von CgtR7 ein mehr als zweifach verändertes mRNA-Verhältnis aufwiesen. Dargestellt ist jeweils die Interaktion zwischen einem Promotorbereich (DNA) und N_{His}-CgtR7 im molaren Überschuss (MÜ) von 0 (Spur 1, 6), 25 (Spur 2, 7), 50 (Spur 3, 8), 75 (Spur 4, 9) und 100 (Spur 5, 10). Wie in A und A* gezeigt ist, bindet N_{His}-CgtR7 den Promotorbereich von *cg1325* bei vorheriger Phosphorylierung mit Acetylphosphat schon in einem 50-fachen molaren Überschuss (Spur 3). Wenn im Phosphorylierungsschritt aber Phosphatpuffer anstelle des Phosphodonors eingesetzt wird, bindet N_{His}-CgtR7 diesen Promotorbereich selbst bei 100-fachem molarem Überschuss nicht (Spur 10). Dies bedeutet, dass die Affinität von N_{His}-CgtR7 zu den Promotorbereichen seiner Zielgene durch Phosphorylierung des Regulators gesteigert wird.

Für die Promotorbereiche von *cg3077* (E), *cg2331* (J), *cg2332* (L), *cg3143* (M), *cg0705* (P), *cg2796* (Q), *ssb* (*cg3307*, S) und die Promotorbereiche der Negativkontrollen *cg0391* (T) und *cg1018* (U) konnte im Gelretardationsexperiment keine Bindung durch CgtR7 nachgewiesen werden. Diese Gene oder Operons werden demnach nicht durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 reguliert. Ihre veränderte Transkription könnte aufgrund der Überexpression eines Proteins oder aufgrund der Induktion eines der Zielgene des Regulons von CgtSR7 erfolgen. Der Promotorbereich von *cg2332* wurde getestet, obwohl dieses Gen kein verändertes mRNA-Verhältnis im DNA-Microarray aufwies, weil es als erstes Gen in einem Operon vor *cg2331* und *cg2330* vorhergesagt ist (Pauling *et al.*, 2012).

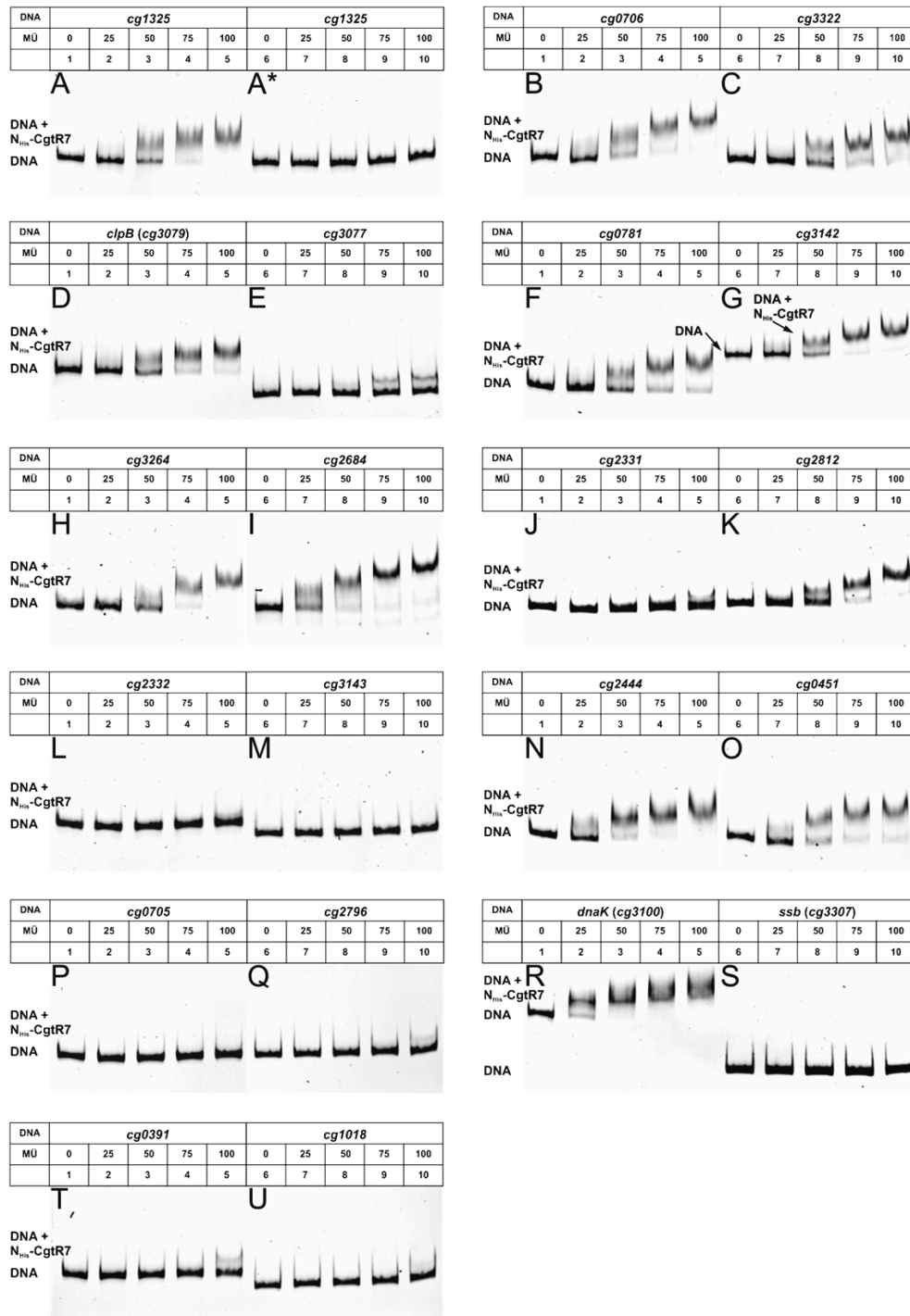


Abbildung 21: Gelretardationsexperimente mit CgtR7 und verschiedenen Promotorbereichen. Im Experiment A* wurde der Phosphorylierungsschritt von N_{His}-CgtR7 als Negativkontrolle mit Kaliumphosphatpuffer anstelle des Phosphodonors durchgeführt, in allen anderen Experimenten

wurde der Phosphorylierungsschritt mit Acetylphosphat durchgeführt. Aufgetragen sind in jeder Spur 70 ng des jeweiligen Promotorbereichs (DNA) nach 30-minütiger Inkubation mit CgtR7 in molaren Überschüssen (MÜ) von 0 (Spur 1, 5), 25 (Spur 2, 6), 50 (Spur 3, 7), 75 (Spur 4, 9) und 100 (Spur 5, 10).

Dagegen wurde für die Promotorbereiche von *cg1325* (A), *cg0706* (B), *cg3322* (C), *clpB* (*cg3079*, D), *cg0781* (F), *cg3142* (G), *cg3264* (H), *cg2684* (I), *cg2812* (K), *cg2444* (N), *cg0451* (O) und *dnaK* (*cg3100*, R) eine Bindung durch N_{His}-CgtR7 gezeigt. Unter diesen sind die Promotorbereiche der regulierten Gene zu finden, die für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne kodieren (*cg1325*, *cg0706*, *cg3264*). Aufgrund der Anordnung im Genom von *C. glutamicum* ist der Promotorbereich von *cg0706* (möglicher Repressor des Zweikomponentensystems) gleichzeitig der Promotorbereich von *cg0707* (*cgtS7*, Sensorkinase des Zweikomponentensystems mit PspC-Domäne). Daher kann für diese beiden Promotorbereiche die Bindung durch CgtR7 nicht getrennt überprüft werden.

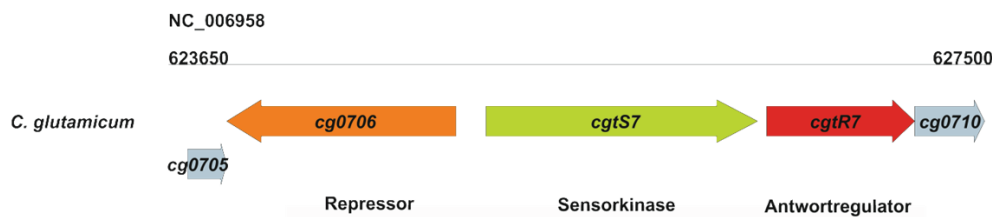


Abbildung 22: Genomische Anordnung von *cg0706*, *cgtS7* (*cg0707*), *cgtR7* (*cg0709*) und *cg0710* in *C. glutamicum*.

Allerdings befindet sich das Gen *cg0710* bei Deletion der Gene *cgtSR7* direkt hinter dem Promotorbereich von *cgtS7*. Die in den DNA-Microarrays beobachtete Hochregulation von *cg0710* macht daher eine Autoregulation (Aktivierung) der Gene des Zweikomponentensystems *cgtSR7* durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassend konnten durch die Gelretardationsexperimente zwölf Promotorbereiche, die durch N_{His}-CgtR7 gebunden werden, und neun Promotorbereiche, die durch N_{His}-CgtR7 nicht gebunden werden, identifiziert werden

2.2.4 Konsensus-Bindemotiv des Antwortregulators CgtR7

Mit den DNA-Sequenzen dieser Promotorbereiche wurde mit Hilfe der MEME-Software nach einem Konsensus-Bindemotiv für CgtR7 gesucht (Bailey & Elkan, 1994). Hierbei wurden die gebundenen DNA-Sequenzen zur Suche eingesetzt und die nicht gebundenen DNA-Sequenzen als „Negativbeispiele“ genutzt. Mit den unter

IV.7.1 beschriebenen Parametern wurde das in Abbildung 23 dargestellte 21 bp lange Konsensus-Bindemotiv gefunden. Die jeweiligen putativen Bindestellen der zur Suche eingesetzten Promotorbereiche sind in Tabelle 16 zu sehen.

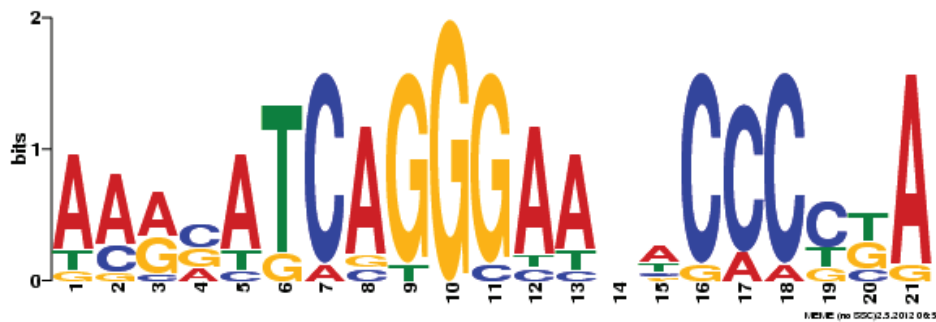


Abbildung 23: Mögliches Konsensus-Bindemotiv von CgtR7. Zur Suche wurden die in den Gelretardationsexperimenten gebundenen und nicht gebundenen Promotorbereiche eingesetzt. Das Bindemotiv wurde mit Hilfe der Software MEME gefunden (Bailey & Elkan, 1994). Dargestellt sind die einzelnen Basen (A in rot, T in grün, C in blau, G in gelb), die in den zur Suche eingesetzten Sequenzen vorkommen. Je größer eine Base dargestellt ist, desto konservierter ist sie im Konsensus-Bindemotiv.

Tabelle 16: Putative Bindestellen (farbig) der zur Suche eingesetzten Promotorfragmente mit angrenzenden Bereichen (grau). Die Farben der Basen der putativen Bindestellen sind wie unter Abbildung 23 beschrieben dargestellt.

Promotorbereich	putative Bindestelle							
cg2444	ACTTAGGGGC	AAAGA	TCA	GGG	AACT	CCC	CGA	CTCTCGCCA
cg3079	ACTACCACTT	AAGCA	TCA	GGG	AAAA	CCC	GTA	ACTTTAATGT
cg2812	CAAAGGACAT	ACGAA	TCA	GGG	AAGA	CCC	CCA	ATTA AAAATT
cg0706	TGCGACACCA	AACCA	TCA	GGG	AAGA	CCC	TGA	ACGCCACCTT
cg3322	ACCATT CACA	ACACA	TCA	GGG	AATC	CAC	CTA	CTTTGTTTT C
cg3100	TCACTTGAGA	AAAAA	TCC	GGG	TTTA	CCC	CTA	ATTTTCAACC
cg3142	CTACCCCAT	TCAGT	TCA	GGG	AATC	CCC	GGA	TTTAAAACAA
cg0451	CGTTCCAGAG	AAAGT	GCA	GGC	ATAA	CCC	CTA	AAATACCCTG
cg0781	GGCACCACCT	GGGAA	TCA	GGG	AATG	CCC	TTA	ATAAAAACTA
cg3264	CACGTA ACTA	AAACC	TCA	GGG	AAGT	GAC	TGA	TACGCTCTAG
cg1325	TTTTAGGGGT	TAGGA	GAG	GGG	AAAT	CCC	CGA	TGTGCTCTAG
cg2684	GGCCAGACGT	AAGCA	TCA	TGG	CCCA	CCA	CCG	GAACCGCCGA

Bei näherer Betrachtung dieses durch MEME vorgeschlagenen Konsensus-Bindemotivs fällt auf, dass es sich bei den Basen 5-21 um eine 16 bp lange unvollkommene invertierte Basenwiederholung („imperfect inverted repeat“) handelt. Die Bindemotive von Antwortregulatoren des LuxR-Typs, zu denen CgtR7 zählt, beinhalten häufig „inverted repeats“ (Fuqua *et al.*, 1994, Whitehead *et al.*, 2001, Bott

& Bocker, 2012). Zur Bestätigung, dass es sich bei dieser Basenfolge tatsächlich um das Konsensus-Bindemotiv von CgtR7 handelt sowie zur Identifizierung der Basen, welche essentiell für die Bindung durch CgtR7 sind, wurde der Bereich des Promotors von *cg0706* gewählt, in dem das mögliche Bindemotiv in perfekter invertierter Wiederholung, nämlich in Form von TCA GGG AAGA CCC TGA, vorliegt. Mit diesem Oligonukleotid wurde die direkte Bindung von CgtR7 an das putative Konsensus-Bindemotiv in Gelretardationsexperimenten nachgewiesen. Hierzu wurden zusätzlich zu den 21 Basen, die mit Hilfe der MEME Software als Konsensus-Bindemotiv identifiziert wurden, die beiden vorangehenden und die fünf nachfolgenden Basen ausgewählt. Dieses 28 Basenpaare lange Fragment wurde als DNA-Oligonukleotid inklusive des revers komplementären Strangs synthetisiert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und durch Aufkochen und Abkühlen zu doppelsträngiger DNA annealt. Für den Test, welche Basen essentiell für die Bindung durch CgtR7 sind, wurden immer drei oder vier Basen dahingehend mutiert, dass diese Basen anschließend möglichst verschieden zu den in der Konsensus-Bindesequenz vorhandenen Basen sind.

Tabelle 17: Oligonukleotide zur Bestätigung und genauen Definition des Bindemotivs von CgtR7. Die am besten konservierten Basen sind gelb unterlegt, mutierte Basen sind rot dargestellt.

Oligonukleotid	Basenfolge
<i>cg0706_WT</i>	C AAA CCA TCA GGG AAGA CCC TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut1</i>	C GCT CCA TCA GGG AAGA CCC TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut2</i>	C AAA TTG TCA GGG AAGA CCC TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut3</i>	C AAA CCA CTC GGG AAGA CCC TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut4</i>	C AAA CCA TCA ATT AAGA CCC TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut5</i>	C AAA CCA TCA GGG CGAG CCC TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut6</i>	C AAA CCA TCA GGG AAGA ATT TGA ACG CC
<i>cg0706_Mut7</i>	C AAA CCA TCA GGG AAGA CCC ACT ACG CC
<i>cg0706_Mut8</i>	C AAA CCA TCA GGG AAGA CCC TGA GGC CC
<i>cg0706_Mut9</i>	C AAA CCA TCA GGG AA - - CCC TGA ACG CC

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 17 dargestellt. In den mutierten Bindestellen *cg0706_Mut1* bis *cg0706_Mut8* sind je drei oder vier Basen mutiert und in *cg0706_Mut9* ist der Abstand zwischen den invertiert wiederholten Basen von vier auf zwei Basen verkürzt. Mit diesen zehn DNA-Fragmenten wurden im Folgenden Gelretardationsexperimente durchgeführt.

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, wird das Oligonukleotid, das die native Bindestelle vor *cg0706* enthält, bei Inkubation mit CgtR7 schon bei einem 25-fachen molaren

Überschuss (Spur 2) gebunden und dadurch im Gel verlangsamt. Dies bestätigt, dass es sich um die identifizierte Bindestelle handelt.

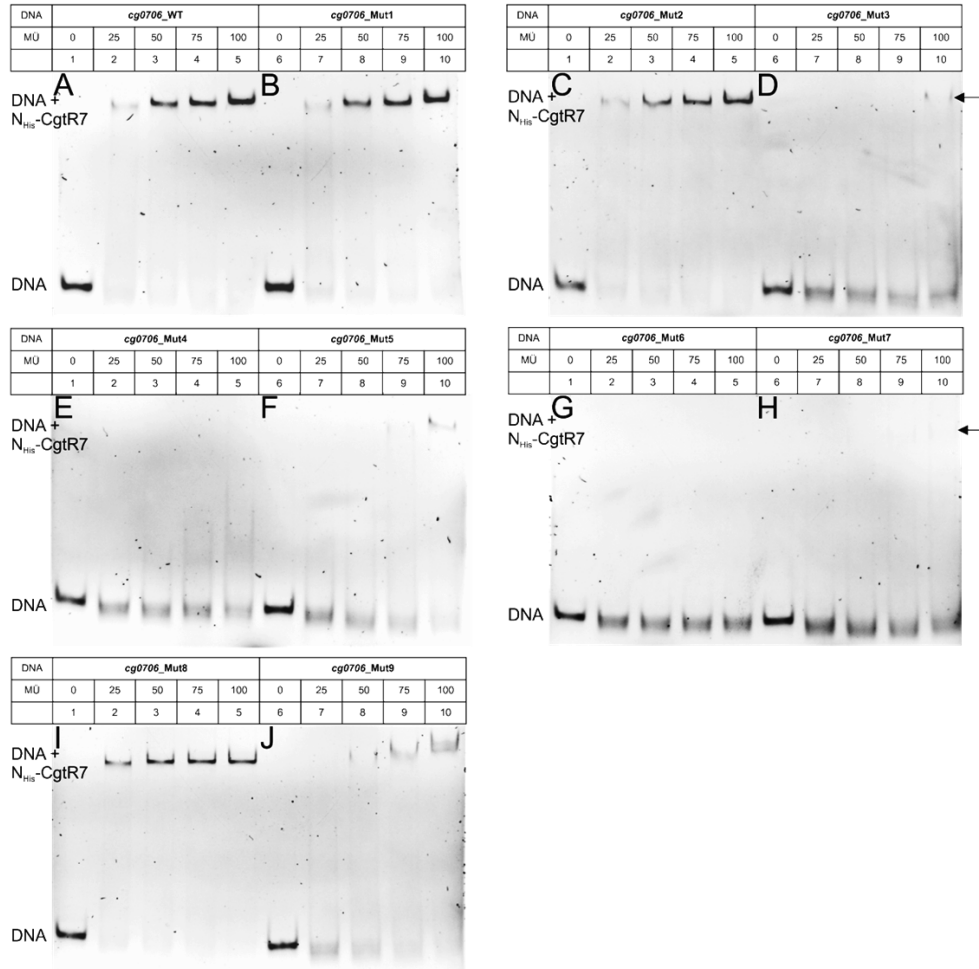


Abbildung 24: Gelretardationsexperimente mit CgtR7 und Oligonukleotiden, die die mögliche CgtR7-Bindestelle vor *cg0706*, bzw. mutierte Versionen davon enthalten. Aufgetragen sind in jeder Spur 35 ng des jeweiligen Promotorbereichs (DNA) mit molaren Überschüssen (MÜ) an phosphoryliertem CgtR7 von 0 (Spur 1, 5), 25 (Spur 2, 6), 50 (Spur 3, 7), 75 (Spur 4, 9) und 100 (Spur 5, 10). Der Phosphorylierungsschritt von N-His-CgtR7 wurde in allen anderen Experimenten in Acetylphosphat durchgeführt.

Die mutierten Varianten der Bindestelle werden unterschiedlich gut gebunden: *cg0706_Mut1* (B), *cg0706_Mut2* (C) und *cg0706_Mut8* (I) werden vergleichbar zur Wildtypvariante *cg0706_WT* (A) gebunden, daher gehören die in diesen Varianten mutierten Basen nicht zum Konsensus-Bindemotiv von CgtR7. Die mutierten Varianten *cg0706_Mut4* (E) und *cg0706_Mut6* (G) werden nicht durch CgtR7

gebunden. Die hier ausgetauschten Basen stellen demnach die wichtigsten Basen des Konsensus-Bindemotivs dar. Dies ist in guter Übereinstimmung damit, dass diese Basen im Bindemotiv am besten konserviert sind. Die Varianten *cg0706_Mut3* (D) und *cg0706_Mut7* (H) werden erst bei 100-fachem molarem Überschuss des Regulators CgtR7 schwach gebunden. Die in diesen Oligonukleotiden ausgetauschten Basen stellen also ebenfalls sehr wichtige Basen der Konsensus-Bindesequenz dar. Die Variante des Konsensus-Bindemotivs mit den mutierten Basen zwischen der invertierten Basenwiederholung, *cg0706_Mut5* (F), wird ab einem 75-fachen molaren Überschuss von CgtR7 schwach gebunden. Das zeigt, dass auch diese Basen zum Konsensus-Bindemotiv gehören. Das bestätigt auch die Variante *cg0706_Mut9* (J), bei der keine Basen mutiert sind, sondern die Verbindung zwischen der invertierten Basenwiederholung von vier auf zwei Basen verkürzt ist. Diese wird ab einem 50-fachen molaren Überschuss an CgtR7 gebunden, allerdings deutlich schwächer als die Wildtypvariante. Für die optimale Bindestelle ist somit auch der Abstand von vier Basen zwischen der invertierten Basenwiederholung wichtig.

Durch die Mutationsanalyse des Bindemotivs aus dem Promotorbereich von *cg0706* konnte ein – im Vergleich zu dem durch die MEME-Suche vorhergesagten – etwas kürzeres Konsensus-Bindemotiv experimentell bestätigt werden (Abbildung 25).

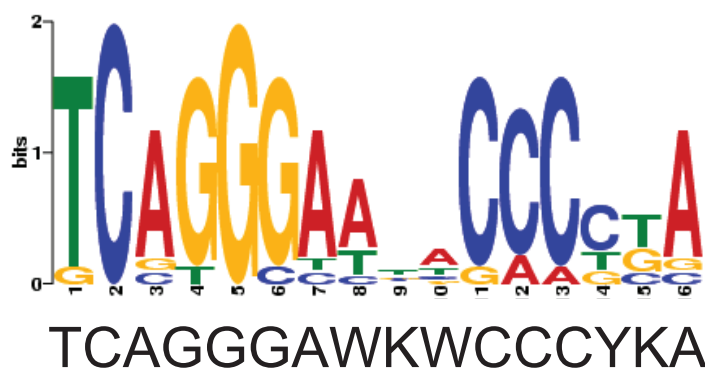


Abbildung 25: Experimentell bestätigtes Konsensus-Bindemotiv für den Antwortregulator CgtR7. W: A, T; K: T, C, G; Y: C, T. Die Basen sind wie in Abbildung 23 beschrieben dargestellt.

2.2.5 Suche nach weiteren Bindestellen im Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032

Nach Ermittlung des DNA-Bindemotivs von CgtR7 in *C. glutamicum* wurde dieses genutzt, um mit Hilfe der Software „Tiling Viewer“ (Polen, 2012, nicht publiziert) das Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 nach weiteren möglichen Zielgenen, die durch CgtR7 reguliert werden, zu durchsuchen. Die Suche wurde eingegrenzt auf einen Bereich 500 bp vor bis 100 bp hinter einem Startkodon. Die Bedingungen für die Suche wurden so festgelegt, dass maximal drei Abweichungen zum in Abbildung 25 dargestellten Konsensus-Bindemotiv auftreten durften. So wurden 304 mögliche Bindesequenzen identifiziert, von denen manche doppelt vorlagen, weil sowohl der kodierende Strang als auch der Gegenstrang dem Konsensus-Bindemotiv entsprachen. Von diesen 304 putativen Bindesequenzen lagen nach Aussortieren der doppelten Sequenzen 34 Sequenzen vor Genen, die in den DNA-Microarrays mehr als 1,5-fach reguliert waren. Wie in Tabelle 18 aufgeführt, wurden die Bindestellen der zur Suche des Konsensus-Bindemotivs verwendeten Promotorbereiche wie erwartet mit null bis drei Abweichungen zum Konsensus-Bindemotiv wiedergefunden. Einzig die putative Bindestelle aus dem Promotorbereich vor *cg2684*, das in den DNA-Microarrays mehr als zweifach erhöht transkribiert war und experimentell als direkt durch CgtR7 reguliert bestätigt wurde, konnte auf diese Weise nicht gefunden werden, da diese Bindestelle sechs Abweichungen zum Konsensus-Bindemotiv aufweist. Die bereits bekannten Bindestellen aus den Promotorbereichen, die auch zur Ermittlung des Konsensus-Bindemotivs eingesetzt wurden, sind mit * gekennzeichnet. Zusätzlich identifizierte neue putative Bindestellen sind mit # gekennzeichnet. Für die Promotorbereiche der Gene *cg0706*, *dnaK* (*cg3100*) und *cg3322* wurde jeweils eine zweite mögliche Bindestelle gefunden.

Tabelle 18: Gene, die in ihrem Upstreambereich das putative Konsensus-Bindemotiv von CgtR7 aufweisen. Die aufgelisteten putativen Konsensus-Bindemotive weisen höchstens drei Abweichungen zum Konsensus-Bindemotiv auf und befinden sich 500 bp vor bis 100 bp nach dem Startkodon eines Gens, das im DNA-Microarray mindestens 1,5-fach reguliert war.

Gen	Annotation	Position bezogen auf den Translationsstart ^b	Putative Bindestelle	Abweichungen zum Konsens	mRNA-Verhältnis ^a	p-Wert
* <i>cg1325</i>	Putativer stress-abhängiger Transkriptionsregulator	-83	TCGGGGATTCCCCTC	2	55,6	0,002
* <i>cg0706</i>	Hypothetisches Membranprotein Cg0706	-176	TCAGGGAAGACCCTGA	0	42,15	0,002

Gen	Annotation	Position bezogen auf den Transla- tionsstart ^b	Putative Bindestelle	Abwei- chungen zum Konsens	mRNA- Verhält- nis ^a	p- Wert
# <i>cg0706</i>	Hypothetisches Membranprotein Cg0706	-149	TCAGGGCTTTCCCCCA	2	42,15	0,002
* <i>cg3322</i>	Putatives sekretiertes Membranfusionsprotein	-140	TCAGGGAATCCACCTA	2	22,21	0
# <i>cg3322</i>	Putatives sekretiertes Membranfusionsprotein	-198	TCAAGCATTACCCCCA	3	22,21	0
* <i>cg3079</i>	ClpB, Putative ATP-abhängige Protease, Hitzeschockprotein	-208	TCAGGGAAAACCCGTA	2	18,05	0,002
* <i>cg0781</i>	Membranprotein Cg0781	-43	TCAGGGAATGCCCTTA	1	7,69	0,001
* <i>cg3142</i>	Hypothetisches Protein Cg3142	-44	TCAGGGAATCCCCGGA	2	7,36	0,002
* <i>cg2812</i>	ABC-Transporter, an der Lipoproteinfreisetzung beteiligt, ATPase-Komponente	-112	TCAGGGAAGACCCCCA	1	6,63	0
* <i>cg2444</i>	Hypothetisches Protein Cg2444	-40	TCAGGGAACCTCCCCGA	1	5,7	0,002
* <i>cg3100</i>	DnaK, Chaperon mit DnaJ, Hitzeschockprotein	-219	TCCGGGTTTACCCCTA	2	5,58	0,086
# <i>cg3100</i>	DnaK, Chaperon mit DnaJ, Hitzeschockprotein	-389	TCAGGAAACACCCCCAA	3	5,58	0,086
* <i>cg3264</i>	Hypothetisches Protein Cg3264	-10	TCAGGGAAGTGACTGA	2	4,72	0
* <i>cg0451</i>	Hypothetisches Protein Cg0451	-71	GCAGGCATAACCCCTA	3	4,08	0
# <i>cg0656</i>	50S ribosomales Protein L17	in Operon	GCAGGTAAGACCCTGG	3	2,08	0,079
# <i>cg2177</i>	Nukleinsäurebindeprotein, an Transkriptions-termination beteiligt	in Operon	TCATCGATTACTCCGA	3	1,83	0,119
# <i>cg1072</i>	50S ribosomales Protein L25 / Allgemeines Stressprotein Ctc	-461	TCAGTGATTCTACTAA	3	1,79	0,063
* <i>cg3323</i>	Myoinositol-1-Phosphat- synthase	-202	TCAGGGAATCCACCTA	2	1,76	0,005
# <i>cg3323</i>	Myoinositol-1-Phosphat- synthase	-144	TCAAGCATTACCCCCA	3	1,76	0,005
# <i>cg1109</i>	PorB, Anionenspe-zifisches Porin	-439	TCAGGGATTGCTGGA	3	1,7	0,015
<i>cg0652</i>	30S ribosomales Protein S13	in Operon	GCCGGGATATCCCCGA	3	1,69	0,056
<i>cg2983</i>	GTP Cyclohydrolase I	in Operon	TCCGGGAAGTCCGCTG	3	1,58	0,048
# <i>cg0748</i>	Cobalamin / Fe3+-Siderophortrans- portsystem, sekretierte Komponente	-137	TTAGGGCAGTCTCCGA	3	1,55	0,098
# <i>cg1551</i>	Universelles Stressprotein UspA- ähnliches Nukleotidbindeprotein	-379	TCGAGGATGTCCGCGA	3	1,52	0,2

Gen	Annotation	Position bezogen auf den Transla- tionsstart ^b	Putative Bindestelle	Abwei- chungen zum Konsens	mRNA- Verhält- nis ^a	p- Wert
<i>cg1202</i>	Hypothetisches Protein Cg1202	in Operon	TCAAGGATTTCCTT	3	0,67	0,04
<i>cg1997</i>	Typ II Restriktions- endonuklease	in Operon	CCAAAGATGACCCCTA	3	0,66	0,032
# <i>cg1988</i>	Hypothetisches Protein Cg1988	-129	TCAACGATGTCGCTGA	3	0,65	0,013
<i>cg3368</i>	ABC-Transporter Permeasekomponente	in Operon	TCAGTCATGAGCCCGA	3	0,64	0,02
# <i>cg2472</i>	Hydrolase oder Acyltransferase	-99	TCATGGATTTCACGA	3	0,62	0,031
# <i>cg1929</i>	Rekombinase	-407	TTAGGGTAGACCCTGA	2	0,61	0,055
# <i>cg1962</i>	Hypothetisches Protein Cg1962	-29	TCACGCAACACCCTTA	3	0,6	0,057
# <i>cg2402</i>	Putative Zellwand-peptidase	-374	TAAGGGTTCTCCCTA	3	0,55	0,007
* <i>cg0707</i>	CgtS7, Sensorkinase eines Zweikomponentensystems	36	TCAGGGAAGACCCTGA	0	(0,32)	0,022
# <i>cg0707</i>	CgtS7, Sensorkinase eines Zweikomponentensystems	9	TCAGGGCTTTCCCCCA	2	(0,32)	0,022

*bekannte Bindestelle; #putative neue Bindestelle;

^amRNA-Verhältnis des induzierten Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *cgtSR7* mit Expressionsvektor für CgtR7 zum Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 WT mit entsprechendem Leervektor

^bDie relative Position bezogen auf den Translationsstart gibt die Mitte des Bindemotivs an.

(Das veränderte mRNA-Verhältnis von *cgtS7* (*cg0707*) ist aufgrund der Deletion des Gens im untersuchten Stamm nicht bewertbar)

Putative neue Bindestellen, die nicht im Upstreambereich eines einzelnen transkribierten Gens oder des ersten Gens eines Operons nach Vorhersage von CoryneRegNet (Pauling *et al.*, 2012) lagen, wurden für weitere Analysen nicht berücksichtigt. Somit wurden weitere putative Bindestellen vor den hochregulierten Genen *cg1551*, *cg0748*, *cg1109*, *cg3323*, und *cg1072* und vor den herunterregulierten Genen *nlpC* (*cg2402*), *cg1962*, *cg1929*, *cg2472* und *cg1988* identifiziert. Ob diese möglichen Bindestellen tatsächlich durch CgtR7 gebunden werden, muss durch Gelretardationsexperimente experimentell überprüft werden. Exemplarisch wurde der Promotorbereich des Gens *nlpC* (*cg2402*) ausgewählt, das mit einer 1,78-fachen Repression das am stärksten signifikant herunterregulierte Gen im durchgeführten Transkriptomvergleich ist, das im Upstreambereich eine putative Bindestelle für CgtR7 aufweist. Mit diesem Experiment kann zudem überprüft werden, ob CgtR7 auch Gene reprimiert, da alle bisher gefundenen regulierten Gene aktiviert werden. Wie Abbildung 26 zeigt wird der Promotorbereich von *nlpC* ab einem molaren Überschuss von 25 teilweise (Spur 2) und ab einem molaren

Überschuss von 50 vollständig gebunden (Spur 3), *nlpC* wird also direkt durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 reguliert.

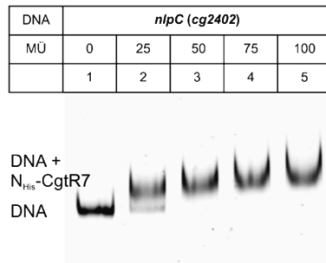


Abbildung 26: Gelretardationsexperimente mit CgtR7 und dem Promotorbereich von *nlpC* (*cg2402*). Aufgetragen sind in jeder Spur 70 ng des Promotorbereichs (DNA) mit molaren Überschüssen (MÜ) an phosphoryliertem CgtR7 von 0 (Spur 1), 25 (Spur 2), 50 (Spur 3), 75 (Spur 4) und 100 (Spur 5).

Wie die Bindung des Promotorbereichs von *nlpC* (*cg2402*) zeigt, ist es möglich, dass sich unter den Genen mit putativer Bindestelle für CgtR7 weitere tatsächliche Zielgene des Regulons CgtSR7 befinden, die sich durch Gelretardationsexperimente bestätigen lassen.

2.2.6 Das Gen *cgtS7* ist nicht korrekt annotiert

Wenn die relativen Positionen der putativen Bindestellen zum Translationsstart betrachtet werden (Tabelle 18), fällt auf, dass alle Bindestellen abgesehen von den beiden Bindestellen im Promotorbereich des Zweikomponentensystems selbst (Operon *cg0707-0710*) vor dem Translationsstart liegen. Dies entspricht der Erwartung, da Transkriptionsaktivatoren, wie es CgtR7 für *cgtS7* ist, normalerweise vor dem Promotor binden (Collado-Vides *et al.*, 1991). Als Besonderheit in *C. glutamicum* gibt es dort einige Beispiele, bei denen Transkriptions- und Translationsstart zusammenfallen (Koch *et al.*, 2005, Pátek *et al.*, 2003). Daher ist es unwahrscheinlich, dass der annotierte Translationsstart von *cgtS7* der tatsächliche Translationsstart ist. Wie in Abbildung 27 dargestellt ist, existieren bei NCBI drei verschiedene Annotationen für *cgtS7* (*cg0707*) (Rote Startkodons: 1272 bp, 423 AS (Tauch *et al.*, 2002, Kalinowski *et al.*, 2003), 1143 bp, 380 AS (Ikeda & Nakagawa, 2003), 1059 bp, 352 AS (Binder *et al.*, 2012)).

Kalinowski	ATGGGGGAAAGCCCTGAAAAGGTGGCGTTCAGGGTCTTCCCTGATGGTTTGGTGTGCGCAG
Binder	ATGGGGGAAAGCCCTGAAAAGGTGGCGTTCAGGGTCTTCCCTGATGGTTTGGTGTGCGCAG
Ikeda	ATGGGGGAAAGCCCTGAAAAGGTGGCGTTCAGGGTCTTCCCTGATGGTTTGGTGTGCGCAG
Kalinowski	GGGCATGACATGATCGAAGATATGAGTAACACACCTGCGCCTTATACCCGCGAGCCTGCG
Binder	GGGCATGACATGATCGAAGATATGAGTAACACACCTGCGCCTTATACCCGCGAGCCTGCG
Ikeda	GGGCATGACATGATCGAAGATATGAGTAACACACCTGCGCCTTATACCCGCGAGCCTGCG
Kalinowski	GGGCAAGCGGTGCCTTTATATCCACGTTTACCCGGTCAAGAGATGGTCGGGTTGTTGCG
Binder	GGGCAAGCGGTGCCTTTATATCCACGTTTACCCGGTCAAGAGATGGTCGGGTTGTTGCG
Ikeda	GGGCAAGCGGTGCCTTTATATCCACGTTTACCCGGTCAAGAGATGGTCGGGTTGTTGCG
Kalinowski	GGTGTGCGATCGGGGCTGGCAAAGCATCTTAATGTGTGCGGTGTTTGGGTTTCGTGCG...
Binder	GGTGTGCGATCGGGGCTGGCAAAGCATCTTAATGTGTGCGGTGTTTGGGTTTCGTGCG...
Ikeda	GGTGTGCGATCGGGGCTGGCAAAGCATCTTAATGTGTGCGGTGTTTGGGTTTCGTGCG...

Abbildung 27: Beginn der DNA-Sequenz des Gens *cgtS7*. In NCBI annotierte Startkodons sind rot dargestellt und die putative sowie die experimentell bestätigte Bindestelle für den Antwortregulator CgtR7 gelb unterlegt. Das unterstrichene ATG ist in den Homologen aus *C. efficiens*, *C. lipophiloflavum*, *C. aurimucosum*, *C. striatum* und *C. matruchotii* als Startkodon annotiert. Weitere „in frame“ liegende Startkodons sind grau dargestellt (Kalinowski *et al.*, 2003, Ikeda & Nakagawa, 2003, Binder *et al.*, 2012).

Darüber hinaus existieren weitere mögliche Startkodons (grau), von denen eines (schwarz, unterstrichen) in den Homologen aus *C. efficiens*, *C. lipophiloflavum*, *C. aurimucosum*, *C. striatum* und *C. matruchotii* konserviert ist und daher möglicherweise das tatsächliche Startkodon sein könnte. Das tatsächliche Startkodon muss jedoch durch eine experimentelle Überprüfung identifiziert werden.

2.2.7 Untersuchung der Proteine mit PspA-Domäne, Cg3264 und Cg2151

In den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* wird bei Induktion der „Phage Shock“ Antwort jeweils ein Gen für ein Protein mit PspA-Domäne hochreguliert, das die Cytoplasmamembran stabilisiert (Kleerebezem *et al.*, 1996, Kobayashi *et al.*, 2007, Wolf *et al.*, 2010). *C. glutamicum* besitzt zwei Proteine mit PspA-Domäne, Cg3264 und Cg2151.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird das Gen für Cg3264 tatsächlich durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 reguliert. Allerdings zeigt die Arbeit von Fiuza *et al.*, die Cg3264 im Kontext der Zellteilung untersuchte, dass es sich um ein essentielles Protein handelt, das für die Stäbchenform von *C. glutamicum* verantwortlich ist. Silencing des Gens *cg3264* bewirkte eine kokkoide Zellform, wohingegen eine Überexpression zu keulenförmigen Zellen führte. Daher wurde Cg3264 „Rod-shaped Morphology Protein“ RsmP genannt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RsmP *in vitro* Filamente bildet und auch *in vivo* abhängig vom Phosphorylierungszustand des Proteins helikale Filamente von einem Pol zum

anderen bildet (Fiuza *et al.*, 2010). Die PspA-Proteine PspA und LiaH, die als Effektoren der „Phage Shock“ Antwort beschrieben sind, bilden hingegen ringartige Multimere aus 36 Untereinheiten (Hankamer *et al.*, 2004, Wolf *et al.*, 2010). Dies legt nahe, dass RsmP funktionell eher kein Effektor der „Phage Shock“ Antwort ist.

Das zweite Gen für ein Protein mit PspA-Domäne, *pspA* (*cg2151*), wird nicht durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 reguliert, da es weder in den DNA-Microarrays hochreguliert war noch in Gelretardationsexperimenten durch CgtR7 gebunden wurde, wie in Abbildung 28 zu sehen ist. Bis zu einem 100-fach molaren Überschuss an CgtR7 (Spur 5) läuft der Promotorbereich von *pspA* (*cg2151*) auf Höhe des ungebundenen Promotorbereichs ohne CgtR7 (Spur 1).

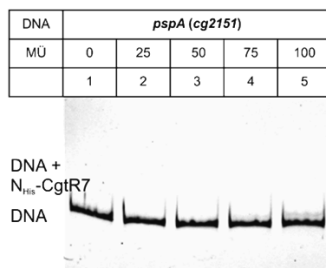


Abbildung 28: Gelretardationsexperimente mit CgtR7 und dem Promotorbereich von *pspA* (*cg2151*). Aufgetragen sind in jeder Spur 70 ng des Promotorbereichs (DNA) mit molaren Überschüssen (MÜ) an CgtR7 von 0 (Spur 1), 25 (Spur 2), 50 (Spur 3), 75 (Spur 4) und 100 (Spur 5).

Auf transkriptioneller Ebene besteht also kein Zusammenhang zwischen dem Zweikomponentensystem CgtSR7 und *pspA*. Ob es sich bei PspA (*Cg2151*) funktionell um ein Protein handelt, das die Zellhülle von *C. glutamicum* stabilisiert, muss experimentell untersucht werden.

2.2.8 Fazit der Regulation von Genen für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne als Reaktion auf die Sec-abhängige Sekretion von Proteinen in *C. glutamicum*

Es konnte gezeigt werden, dass die bei Sec-abhängiger Sekretion von Proteinen hochregulierten Gene für Proteine mit PspC- oder PspA-Domäne (*cg0706*, *cg1325*, *cg3264*) durch das Zweikomponentensystem CgtSR7 reguliert werden. Außer diesen Genen konnten mit Hilfe von DNA-Microarrays weitere putative Zielgene des Zweikomponentensystems CgtSR7 identifiziert werden. Durch Gelretardationsexperimente mit N_{His}-CgtR7 und den Promotorbereichen der putativen Zielgene konnten die Gene *cg1325*, *cg0706*, *rsmP* (*cg3264*), *nlpC*

(*cg2402*), *clpB* (*cg3079*)-*cg3078*, *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* (*cg3100-cg3097*), *cg3322-cg3321-cg3320*, *cg2812-cg2811*, *cg0451-cg0452-cg0453*, *cg0781*, *cg2444*, *cg2684* und *cg3142* als direkte Zielgene bestätigt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist *cgtSR7* zudem positiv autoreguliert. Bis auf *nlpC* werden somit alle Zielgene aktiviert. Im Hinblick auf die Funktion könnte Cg0706 der Repressor des Zweikomponentensystems CgtSR7 sein. Die Chaperone ClpB, DnaK, DnaJ und GrpE verhindern die Aggregation von Proteinen und die ABC-Transporter Cg3322-Cg3320 und Cg2812-Cg2811 könnten an der Resistenz gegen zellwandaktive Antibiotika beteiligt sein. Die Proteine RsmP, das als essentielles Protein für die Zellform verantwortlich ist, NlpC, das eine für die Zellteilung wichtige Peptidase ist, und das DedA-Familie-Protein Cg2684, das Einfluss auf die Membranzusammensetzung und Zellteilung haben könnte, könnten an der Zellteilung und Zellhüllenstabilität beteiligt sein. Die Funktion der übrigen hypothetischen Proteine ist nicht bekannt. Der insgesamt hohe Anteil an Membranproteinen und die Funktion mehrerer Proteine beim Auf- oder Umbau der Zellhülle deuten auf eine Funktion des Zweikomponentensystems CgtSR7 beim Schutz der Zellhülle hin.

VI. Diskussion

C. glutamicum ist ein vielversprechender Organismus zur sekretorischen Produktion heterologer Proteine. Durch die einfache genetische Manipulierbarkeit, schnelles Wachstum, die Einstufung als GRAS-Organismus, die endotoxinfreie Zellhülle und aufgrund hoher Proteinausbeuten erfüllt *C. glutamicum* alle nötigen Bedingungen, die an einen Expressions- und Sekretionswirt gestellt werden. Um ein besseres Verständnis der zellulären Reaktionen auf die Expression sowie Sekretion von Proteinen in *C. glutamicum* zu erlangen, wurden diese Reaktionen auf transkriptioneller Ebene untersucht.

1. Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf Expression und anschließende Tat-abhängige Sekretion der Modellproteine GFP und MalE in *C. glutamicum*

Zur Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen in *C. glutamicum* als Reaktion auf Expression sowie Tat-abhängige Sekretion heterologer Proteine wurden GFP, CopO-GFP, Cg0955-GFP, TorA-GFP, PhoD^{Bs}-GFP und TorA-MalE als Modellproteine gewählt. Das signalpeptidlose GFP erzeugt ausschließlich Reaktionen auf die Expression des GFP, da dieses nicht sekretiert werden kann. Die verschiedenen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten werden unterschiedlich effizient sekretiert und lassen so unterschiedliche Reaktionen auf transkriptioneller Ebene erwarten. TorA-MalE stellt ein weiteres Modellprotein dar, durch das eingeordnet werden kann, ob Reaktionen spezifisch durch Expression und Sekretion der GFP-Varianten oder allgemein durch Expression und Sekretion eines heterologen Proteins induziert werden.

1.1 Die Expression des signalpeptidlosen GFP induziert die SOS-Antwort

Als Reaktion auf die Expression des signalpeptidlosen GFP zeigten insgesamt sieben Gene eine mehr als zweifach veränderte Genexpression bei Vergleich der induzierten Kultur mit der uninduzierten Kultur. Drei von vier hochregulierten Genen gehörten hierbei dem LexA-Regulon an und sind somit Teil der SOS-Antwort in *C. glutamicum* (Jochmann *et al.*, 2009). Bei der SOS-Antwort handelt es sich um einen Schutzmechanismus, der bei DNA-schädigenden Bedingungen induziert wird (Erill *et al.*, 2007). Dieser Schutzmechanismus kann unter anderem durch Oxidantien

wie Wasserstoffperoxid induziert werden (Goerlich *et al.*, 1989). Da bei der Reifung des Chromophors des GFP pro Molekül GFP ein Molekül Wasserstoffperoxid freigesetzt wird (Zhang *et al.*, 2006), ist die Induktion der SOS-Antwort bei Überexpression des GFP plausibel. Eines der bei Expression des signalpeptidlosen GFP hochregulierten Gene der SOS-Antwort ist der Zellteilungsrepressor DivS, der während der SOS-Antwort die Zellteilung inhibiert (Ogino *et al.*, 2008). Dadurch entsteht ein Wachstumsunterschied zwischen der Kultur, in der die SOS-Antwort induziert ist und der Kultur, in der dies nicht der Fall ist. Ein solcher Wachstumsunterschied führt wiederum zu unterschiedlicher Gentranskription aufgrund unterschiedlicher Wachstumsraten (Magasanik, 2000). Auch im hier durchgeführten Vergleich zwischen der induzierten GFP exprimierenden Kultur und der uninduzierten Kultur (siehe V.1.1.3) könnte demnach die veränderte Transkriptionsstärke einiger Gene also auf beginnende unterschiedliche Wachstumsraten durch die Induktion der SOS-Antwort zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zur Expression des signalpeptidlosen GFP induzierte keine der exprimierten Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten eine SOS-Antwort. Dies könnte daran liegen, dass das signalpeptidlose GFP und somit auch das gebildete Wasserstoffperoxid in größerer Menge vorhanden war als die Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten (siehe Abbildung 7). Allerdings war die Gesamtmenge von PhoD^{Bs}-GFP in Zellfraktion und Überstand ähnlich, daher muss es noch einen weiteren Grund für die nicht vorhandene Induktion der SOS-Antwort geben. Eventuell wird die SOS-Antwort nicht durch die absolute Konzentration an Wasserstoffperoxid induziert, sondern vielmehr durch den Ort seiner Entstehung. Für gewöhnlich entsteht dieses hauptsächlich an der Membran im Zuge von Redoxreaktionen der Atmungskette (Imlay, 2003). Im Fall der Expression des signalpeptidlosen GFP entsteht das Wasserstoffperoxid jedoch im Cytoplasma der Zelle. Dort könnte dieses direkt mit Fe²⁺, das bevorzugt durch bestimmte DNA-Sequenzen gebunden wird (Henle *et al.*, 1999), die Entstehung eines äußerst reaktiven Hydroxylradikals durch die Fenton-Reaktion bewirken (Imlay *et al.*, 1988). Dieses entstehende Hydroxylradikal könnte die in unmittelbarer Nähe befindliche DNA schädigen, wodurch die SOS-Antwort induziert würde. Die Entstehung des Wasserstoffperoxids aufgrund der Reifung des Chromophors kann bei den sekretierten Varianten auch nach der Sekretion erfolgen, da zwar die Faltung des GFP vor der Sekretion stattfinden muss, aber die Reifung des Chromophors unabhängig davon später erfolgen kann, was aufgrund der

langsamen Halbwertszeit für die Reifung des Chromophors von mindestens 90 Minuten (Heim *et al.*, 1994, Crameri *et al.*, 1996) wahrscheinlich häufig geschieht.

Die Expression des signalpeptidlosen GFP führt also zur Induktion der SOS-Antwort, wohingegen diese bei Expression der Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten aufgrund der geringeren exprimierten Menge und / oder der extrazellulären Entstehung des Wasserstoffperoxids nicht induziert wird.

1.2 Die Expression sowie die Sekretion von Cg0955-GFP führt zur Repression von Genen, die in die Kupferhomöostase involviert sind – und teilweise Tat-abhängig transloziert werden

Die vier signifikant mehr als zweifach verringert transkribierten Gene aufgrund der Expression und anschließenden Sekretion von Cg0955-GFP sind alle an der Kupferhomöostase in *C. glutamicum* beteiligt (Schuplezow, 2009). Drei dieser vier Gene werden durch das Zweikomponentensystem CopRS bei Kupferüberschuss hochreguliert. Dabei handelt es sich um die Gene *cg3287*, (*copO*, lipidverankerte Multikupferoxidase), *cg3286* (putatives lipidverankertes Protein) und *cg3288* (hypothetisches Protein), die alle zur Resistenz bei Kupferüberschuss beitragen (Schelder *et al.*, 2011). Das vierte verändert transkribierte Gen *cg1884* (sekretiertes, C-terminal verankertes Kupferbindeprotein) wird hingegen als Reaktion auf Kupfermangel in *C. glutamicum* hochreguliert (Schuplezow, 2009) und durch LexA, den Repressor der SOS-Antwort, reprimiert (Jochmann *et al.*, 2009). Die Funktion des Proteins Cg1884, das eine CopC-Domäne besitzt, ist in *C. glutamicum* allerdings nicht untersucht. Cg1884 weist jedoch Ähnlichkeit zum Fusionsprotein YcnJ aus *B. subtilis* auf, dessen N-Terminus wie Cg1884 die CopC-Kupferbindedomäne und dessen C-Terminus die CopD-Kupferimporterdomäne besitzt. YcnJ wird ebenfalls unter Kupfermangel hochreguliert und dient wahrscheinlich der Kupferakquirierung (Chillappagari *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass diese bei unterschiedlichen Kupfermengen wichtigen Gene bei Expression und Sekretion von Cg0955-GFP nicht gegenläufig reguliert sind, lässt vermuten, dass die verfügbare Kupfermenge nicht die Ursache der Regulation dieser Gene ist.

Die verringerte Transkription dieser Gene kann also entweder ein Artefakt sein oder tatsächlich durch die Expression und Sekretion des Cg0955-GFP begründet sein. Da die genannten Gene bei Expression und Sekretion der effektiver sekretierten Varianten TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP nicht reguliert waren, kann die Regulation

dieser Gene keine Reaktion auf einen späten Schritt der Sekretion wie die Zellwand- oder Mycolatschichtpassage sein. Der Unterschied könnte demnach aufgrund der verschiedenen Signalpeptide in der Expression, im Targeting, der Translokation oder der Prozessierung liegen (siehe Abbildung 5).

Auffällig bei den regulierten Genen ist, dass sowohl *cg3287* (*copO*) für ein bestätigt Tat-abhängig transloziertes Protein als auch das mit *cg1884* im Operon liegende *cg1881* (1,96-fach verringert transkribiert) für ein putativ Tat-abhängig transloziertes Protein kodieren, dessen Homologe YwbN aus *B. subtilis* und EfeB (YcdB) aus *E. coli* Tat-abhängig transloziert werden (Jongbloed *et al.*, 2004, Sturm *et al.*, 2006). Die Repression von Genen für Tat-abhängig translozierte Proteine bei der Tat-Translokation eines überexprimierten Proteins, könnte darauf hindeuten, dass weniger wichtige Tat-Substrate bei einer weitgehenden Auslastung der Tat-Translokase reprimiert werden. Interessanterweise existieren für beide reprimierten Gene Aktivierungsmechanismen. Im Fall von *copO* kann eine Aktivierung durch den Antwortregulator CopR des Zweikomponentensystems CopRS erfolgen (Schelder *et al.*, 2011), im Fall von *cg1881* kann der Repressor LexA der SOS-Antwort eine Aktivierung durch Derepression bewirken (Jochmann *et al.*, 2009). Weil diese Aktivierungsmechanismen jedoch nicht aktiv sind, werden diese beiden Tat-Substrate zum betrachteten Zeitpunkt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht benötigt und die korrespondierenden Gene folglich durch einen putativen weiteren Regulator reprimiert, damit die durch die Überexpression von Cg0955-GFP annähernd ausgelastete Tat-Translokase entlastet wird. Zusätzlich wird die Theorie einer annähernden Auslastung der Tat-Translokase bei Expression und Sekretion von Cg0955-GFP dadurch unterstützt, dass die Gene *cg1884* (1,75-fach), *cg3286* (1,34-fach), *cg3287* (*copO*) (1, 52-fach) und *cg3288* (1,72-fach) im Stamm *C. glutamicum* Δ TatAC, der eine vollständig ausgelastete Tat-Translokase simuliert, ebenfalls tendenziell verringerte Transkriptionslevel zeigen. Auch in der *E. coli* *tatC* Deletionsmutante wurde eine Herunterregulation eines Gens, das durch denselben Regulator wie das ebenfalls für eine Tat-abhängig translozierte Multikupferoxidase kodierende *cueO* reguliert wird, beobachtet (Ize *et al.*, 2004). Hier könnte es sich ebenfalls um eine Repression eines Tat-Substrats aufgrund der Auslastung der Tat-Translokase handeln. Eine Repression von Genen für Tat-abhängig translozierte Proteine bei Expression und Sekretion von Cg0955-GFP deutet darauf hin, dass die Tat-Translokase durch die Translokation von Cg0955-GFP annähernd ausgelastet ist

und der Unterschied zwischen Cg0955-GFP, TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP im Translokationsschritt liegt. Eine annähernde Auslastung der Tat-Translokase bei Sekretion von Cg0955-GFP bedeutet jedoch auch, dass die Translokation dieses Fusionsproteins in *C. glutamicum* ATCC 13032 ineffizient und langsam erfolgt, da die effektiver sekretierten Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten TorA-GFP und PhoD^{Bs}-GFP keine Tendenz zur Repression der Gene *copO* und *cg1881* für (putative) Tat-Substrate zeigen. Manche artifiziellen Tat-Substrate werden sehr langsam transloziert, wie das chimäre Protein 16 / 23, von dem in Chloroplasten sogar Translokationsintermediate isoliert werden konnten (Berghöfer & Klösken, 1999). Allerdings ist das Signalpeptid von Cg0955 in *C. glutamicum* R als effektives Tat-Signalpeptid für GFP und als das effektivste Signalpeptid überhaupt zur sekretorischen Produktion einer α -Amylase beschrieben (Watanabe *et al.*, 2009, Teramoto *et al.*, 2011).

Es könnte sich also bei der Repression von Genen, die an der Kupferhomöostase beteiligt sind, aber auch für ein Tat-abhängig beziehungsweise putativ Tat-abhängig transloziertes Protein kodieren, entweder um Artefakte, um indirekte Regulationen oder um die Repression von temporär nicht benötigten Tat-Substraten aufgrund der annähernden Auslastung der Tat-Translokase handeln. Letzteres impliziert, dass die Auslastung der Tat-Translokase bei Sekretion von TorA-GFP oder PhoD^{Bs}-GFP geringer ist, obwohl mehr sekretiertes GFP in den Überstand gelangt. Dies wäre möglich, wenn der Translokationsschritt an sich unterschiedlich effizient abläuft.

1.3 Die Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP führt zur Induktion von Genen für Chaperone in *C. glutamicum*

Bei Expression und Sekretion der am effektivsten sekretierten Tat-Signalpeptid-GFP-Variante PhoD^{Bs}-GFP waren nach einstündiger Induktion elf Gene mehr als zweifach signifikant hochreguliert. Sieben dieser elf Gene kodieren für Chaperone, die zu den Hitzeschockproteinen zählen. Die Induktion von Hitzeschockproteinen wurde schon früh als Reaktion auf die vermehrte Expression von schlecht gefalteten Proteinen entdeckt (Goff & Goldberg, 1985, Parsell & Sauer, 1989). Bei Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP waren die Gene für die Chaperone GroEL1 / GroES (Cg0690, Cg0691, Cg0693), GroEL2 (Cg3011), ClpB (Cg3079) und DnaK / GrpE / DnaJ (Cg3098, Cg3099, Cg3100) mehr als zweifach erhöht transkribiert. Mit Ausnahme von DnaJ wurden diese Chaperone in *C. glutamicum*

auch als Reaktion auf einen Hitzeschock auf Proteinebene identifiziert (Barreiro *et al.*, 2005). Die Gene für Chaperone waren in den anderen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten eventuell aus dem Grund nicht induziert, dass PhoD^{Bs}-GFP intrazellulär in größerer Menge als die übrigen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten vorhanden war. Das signalpeptidlose GFP, das ebenso in großer Menge vorhanden war, hat im Gegensatz zu PhoD^{Bs}-GFP kein frei zugängliches hydrophobes Signalpeptid, durch das Chaperone induziert werden könnten. Außerdem könnte PhoD^{Bs}-GFP langsamer falten als GFP, was ebenfalls zur Induktion von Chaperonen führen könnte.

Das GroEL / ES-System bietet sich faltenden Monomeren einen abgeschlossenen Raum zur Faltung (Horwich *et al.*, 1993, Horwich *et al.*, 2009) und könnte daher einzelne PhoD^{Bs}-GFP abschirmen, um zu verhindern, dass diese über die hydrophoben Signalpeptide miteinander aggregieren, oder um im Fall einer langsameren Faltung des PhoD^{Bs}-GFP dessen korrekte Faltung zu ermöglichen. Die Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE verhindern ebenfalls, dass (teilweise) ungefaltete Proteine aggregieren, indem sie diese temporär binden (Skowyra *et al.*, 1990) und können darüber hinaus vor allem in Kombination mit ClpB auch zur Disaggregation von Proteinen beitragen (Mogk *et al.*, 1999). Erstere könnten also das Signalpeptid binden, um sicherzustellen, dass dieses ausschließlich Interaktionen mit der Membran eingeht oder mit Hilfe von ClpB bereits aggregierte Signalpeptid-GFPs wieder in Lösung bringen.

Neben der Funktion von Chaperonen als Faltungshelfer für cytoplasmatische Proteine ist ein weiterer positiver Effekt von cytoplasmatischen Chaperonen sowohl auf die Sec-abhängige Proteintranslokation (Chirico *et al.*, 1988, Deshaies *et al.*, 1988, Bochkareva *et al.*, 1988, Phillips & Silhavy, 1990) als auch auf die Tat-abhängige Proteintranslokation beschrieben (Graubner *et al.*, 2007, Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2012). Überexprimierte Tat-Substrate könnten durch allgemeine Chaperone im Cytoplasma vor einem vorzeitigen proteolytischen Abbau geschützt werden (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007). Wenn auch PhoD^{Bs}-GFP durch die induzierten Chaperone translokationskompetent gehalten und folglich vor Abbau geschützt wird, könnte dies ein Grund für die effektive Sekretion der Variante sein.

1.4 Auch nach längerer Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP erfolgen keine spezifischen Reaktionen auf die Sekretion des heterologen Proteins

Um zu überprüfen, ob nach vierstündiger Kultivierung, nachdem mehr Vorläufer in der Zelle akkumuliert hat, mehr oder andere Reaktionen auf transkriptioneller Ebene erfolgen, wurde ein Transkriptomvergleich zwischen einer vier Stunden induzierten Kultur mit Expressionsvektor für PhoD^{Bs}-GFP und der entsprechenden Kultur mit Leervektor gemacht. Hier waren insgesamt neun Gene signifikant mehr als zweifach reguliert. Im Gegensatz zu den nach einstündiger Expression und Sekretion signifikant mehr als zweifach verändert transkribierten Genen, von denen ein Großteil für Chaperone kodierte, kodierte nach vierstündiger Expression und Sekretion nur noch ein signifikant mehr als zweifach verändert transkribiertes Gen für ein Chaperon (*groEL2*). Dies steht in Einklang mit der beschriebenen transienten Induktion der Hitzeschockproteine, zu denen viele Chaperone gehören. Ihre Transkription erreicht nach einem Hitzeschock ein Maximum und pendelt sich anschließend auf einem bestimmten Level ein (Lemaux *et al.*, 1978, Wetzstein *et al.*, 1992, Bukau, 1993, Barreiro *et al.*, 2004). Die weniger starke Induktion der Hitzeschockproteine nach vier Stunden entspricht also deren transienter Induktion.

Bei Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP akkumuliert im Vergleich zu den anderen Tat-Signalpeptid-GFP-Varianten die größte Menge an Vorläufer in der Zellfraktion. Außerdem handelt es sich um die am effektivsten sekretierte Variante (siehe Abbildung 7). Falls in *C. glutamicum* also auf transkriptioneller Ebene Reaktionen auf die Tat-abhängige Sekretion des GFP erfolgen, sind diese bei Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP zu erwarten. Theoretisch könnten Engpässe im Sekretionsweg, auf die die Zelle transkriptionell reagieren kann, in allen Teilschritten, das heißt beim Targeting, bei der Translokation, bei der Prozessierung oder bei der Zellwand- und Mycolatschichtpassage auftreten. Diese Schritte werden im Folgenden diskutiert. Beim Targeting müssten cytosolisch lokalisierte Proteine mitwirken. Nach solchen Proteinen wurde bereits auf Proteinebene gesucht (Oresnik *et al.*, 2001, Jong *et al.*, 2004, Graubner *et al.*, 2007, Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007) und dabei REMPs („Redox Enzyme Maturation Proteins“, spezifische Chaperone für ein jeweiliges Redoxenzym) wie DmsD (Oresnik *et al.*, 2001), HyaE und HybE (Dubini & Sargent, 2003) entdeckt, die das Tat-Signalpeptid ihres spezifischen Redoxenzyms binden, um verfrühte Kontakte zur Tat-Translokase oder

proteolytische Degradation zu vermeiden, und teilweise auch an der Reifung und der Insertion des jeweiligen Kofaktors beteiligt sein können (Turner *et al.*, 2004). Ebenso wurden allgemeine Chaperone wie DnaK, Triggerfaktor, GroEL und SlyD identifiziert, die mit Tat-Substraten interagieren und diesen bei der Faltung helfen oder deren hydrophobe Signalpeptid durch Bindung vor Degradation schützen könnten (Oresnik *et al.*, 2001, Jong *et al.*, 2004, Graubner *et al.*, 2007, Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007). Für die Translokation selbst wurden bisher außer den Proteinen der Tat-Translokase keine weiteren beteiligten Proteine entdeckt (Kreutzenbeck, 2004) und die Gene für diese waren bei Expression und Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP nicht signifikant verändert transkribiert. Die Prozessierung wird durch die Signalpeptidase bewerkstelligt. Das entsprechende Gen zeigte jedoch keine veränderte Transkription. Von besonderer Bedeutung ist die Frage wie die translozierten Proteine in *C. glutamicum* die Mycolatschicht passieren und in den Kulturüberstand gelangen. Es ist zu erwarten, dass hierbei ein sekretiertes, konserviertes Protein beteiligt ist. Allerdings wird das einzige hochregulierte Gen *cg2052*, das für ein Protein mit Signalpeptid kodiert, als in der Plasmamembran verankert vorhergesagt (Zhou *et al.*, 2008) und ist darüber hinaus nicht konserviert. Daher ist dieses Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der Mycolatschichtpassage des sekretierten GFP beteiligt.

C. glutamicum zeigt also weder nach einstündiger noch nach vierstündiger Induktion auf transkriptioneller Ebene eine Sekretionsstressantwort als Reaktion auf die Expression sowie Sekretion des PhoD^{Bs}-GFP. Dies kann entweder darauf zurückzuführen sein, dass es keine transkriptionellen Reaktionen auf die Tat-abhängige Sekretion in *C. glutamicum* gibt, dass spezifisch die Sekretion von PhoD^{Bs}-GFP keine Reaktionen auslöst oder dass die Menge des sekretierten GFP zu gering ist, um Reaktionen auszulösen.

1.5 *C. glutamicum* zeigt auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion des Modellproteins TorA-MalE keine Reaktionen auf transkriptioneller Ebene

Um zu überprüfen, ob nur die Tat-abhängige Sekretion des GFP keine transkriptionellen Reaktionen mit Ausnahme der Repression zweier Gene für (putative) Tat-Substrate in *C. glutamicum* bewirkt, wurden die Reaktionen auf die Expression und Sekretion von TorA-MalE untersucht. Diese ruft auf transkriptioneller

Ebene keine Reaktionen in *C. glutamicum* hervor. Dies zeigt für ein zweites Modellprotein neben GFP, dass *C. glutamicum* heterologe Proteine exprimieren und effektiv über den Tat-Weg translozieren kann, ohne dass auf transkriptioneller Ebene Reaktionen auf die Sekretion induziert werden. Wieder bleibt die Frage, ob die Tat-abhängige Sekretion der meisten Tat-Signalpeptid-Protein-Varianten in *C. glutamicum* generell keine Tat-sekretionsspezifischen Reaktionen auf transkriptioneller Ebene hervorrufen kann oder ob die Menge der sekretierten Modellproteine noch zu gering ist, um diese hervorzurufen.

1.6 *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC als Simulation vollständiger Auslastung der Tat-Translokase zeigt transkriptionelle Reaktionen

Die Expression und Sekretion der untersuchten Modellproteine löste nur wenige Reaktionen auf transkriptioneller Ebene in *C. glutamicum* aus. Theoretisch betrachtet könnte eine sehr starke Tat-abhängige Translokation eines Proteins dazu führen, dass die Tat-Translokase vollständig ausgelastet ist und daher native Substrate nicht mehr in ausreichender Menge transloziert werden. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass die Überexpression eines Tat-Substrats, welches andere Tat-Substrate kompetitiv von der Translokation ausschließt, und das Fehlen einer funktionalen Tat-Translokase zu denselben Reaktionen auf transkriptioneller Ebene führen (Ize *et al.*, 2004). Das bedeutet, dass zumindest in *E. coli* die Deletion der Tat-Translokase deren vollständige Auslastung durch ein überexprimiertes Tat-Substrat simulieren kann. Ebenso könnte die Deletion der Tat-Translokase in *C. glutamicum* deren vollständige Auslastung durch ein überexprimiertes Tat-Substrat simulieren. Daher diene die Untersuchung der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC dazu, transkriptionellen Reaktionen auf eine solche Auslastung in *C. glutamicum* zu untersuchen.

Die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen Wachstumsdefekt. Um im Transkriptomvergleich nicht hauptsächlich Reaktionen aufgrund dieses Wachstumsdefekts zu untersuchen, wurde die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC mit der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ qcrA, der das für die aerobe Atmung wichtige putative Tat-Substrat QcrA fehlt (Keller *et al.*, 2012), verglichen. Das Fehlen des korrekt lokalisierten QcrA stellt sehr wahrscheinlich den Hauptgrund für den

Wachstumsunterschied zwischen der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC und dem Wildtyp dar.

1.6.1 Die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC hat oxidativen Stress

Insgesamt wurden 52 signifikant mehr als zweifach verändert transkribierte Gene beobachtet. Unter den am höchsten regulierten Genen befanden sich Gene zum Schutz vor oxidativem Stress wie das Gen für den Regulator OxyR. Dieser nimmt Wasserstoffperoxid wahr und dereprimiert seine Zielgene in Anwesenheit von oxidativem Stress (Milse, nicht veröffentlicht). In Übereinstimmung hiermit sind alle Zielgene von OxyR, nämlich das Gen für die Katalase (*katA*, *cg0310*, 19-fach), für Dps (*dps*, *cg3327*, 76-fach), für die Flavin-enthaltende Monooxygenase (*cg1292*, 29-fach), *cg1293* (14-fach) und *cg1294* (3-fach), für die Ferrochelatase HemH (*cg1734*, 4-fach), für die Cytochrom-*bd*-Oxidase (*cydABCD*, *cg1301-cg1298*, 4-fach) und für OxyR selbst (*oxyR*, *cg2109*, 10-fach) (Milse, nicht veröffentlicht) hochreguliert. Die Hochregulation dieser Gene deutet ebenso wie die Hochregulation des Gens für Ferritin (*cg2782*, 7-fach) darauf hin, dass die Deletion der Tat-Translokase zu oxidativem Stress führt (Cabisco *et al.*, 2000). Oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies entsteht fortlaufend, wird aber normalerweise direkt durch Enzyme, wie zum Beispiel die Katalase, abgebaut (Imlay, 2003). Folglich müssten in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC entweder mehr reaktive Sauerstoffspezies entstehen oder die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies langsamer abgebaut werden als in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *qcrA*. Mehr reaktive Sauerstoffspezies könnten beispielsweise durch einen erhöhten Energiebedarf und somit einen erhöhten Fluss durch die Glykolyse und erhöhte Atmungsraten entstehen, wie es bei Deletion der ATP-Synthase in *C. glutamicum* beobachtet wurde (Koch-Koerfges *et al.*, 2012). Allerdings gibt es dafür auf transkriptioneller Ebene beim Vergleich von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC mit *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *qcrA* keine Hinweise.

Somit scheint ein fehlender Abbaumechanismus zur Inaktivierung entstehender reaktiver Sauerstoffspezies – wahrscheinlich aufgrund des Fehlens eines oder mehrerer Tat-Substrate an ihren extracytoplasmatischen Wirkort – die Ursache für den oxidativen Stress der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC zu sein. Für die Verhinderung der Entstehung solcher reaktiver Sauerstoffspezies

kommt das putative Tat-Substrat Cg1881 in Frage (Müller, nicht veröffentlicht). Bei diesem handelt es sich um ein Lipoprotein, das als eisenabhängige Peroxidase annotiert ist und Homologie zu DyP-Typ Peroxidasen aufweist (Sugano, 2009). Die genaue Funktion dieses Proteins ist bislang nicht experimentell untersucht, jedoch werden die Homologe YwbN aus *B. subtilis* und EfeB (YcdB) aus *E. coli* Tat-abhängig transloziert und sind an der Eisenaufnahme beteiligt (Sturm *et al.*, 2006, Létoffe *et al.*, 2009, Jongbloed *et al.*, 2004, van der Ploeg *et al.*, 2011). Eine Beteiligung von Cg1881 in *C. glutamicum* an der Eisenaufnahme ist unwahrscheinlich, da es keine Homologe zu den Aufnahmekomponenten aus *E. coli* und *B. subtilis* (EfeU, EfeO beziehungsweise YwbL, YwbM) gibt. Dies macht eine Peroxidase-Aktivität des Enzyms wahrscheinlich, die für EfeB aus *E. coli* *in vitro* auch gezeigt ist (Sturm *et al.*, 2006). Das Homolog aus *C. glutamicum* Cg1881 könnte also auf der extracytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran am Abbau von Wasserstoffperoxid beteiligt sein.

Neben der Hochregulation von Genen zum Schutz vor oxidativem Stress war auffällig, dass viele Zielgene des Regulators DtxR, Gene für die Eisenaufnahme, reprimiert waren (Brune *et al.*, 2006). Dies tritt normalerweise bei ausreichendem Eisengehalt ein, allerdings wurden die beiden verglichenen Kulturen im gleichen Medium kultiviert und sollten daher keine Regulation aufgrund unterschiedlicher Eisenkonzentrationen zeigen. Die Repression der Zielgene von DtxR könnte deshalb aufgrund des oxidativen Stresses erfolgen. Freies Eisen(II) ist bei oxidativem Stress gefährlich für die Zellen, da es die Entstehung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion fördert (Imlay, 2003). Aus diesem Grund hat oxidativer Stress in verschiedenen Organismen Einfluss auf die Metallhomöostase (Faulkner & Helmann, 2011). So aktiviert der Regulator der oxidativen Stressantwort OxyR aus *E. coli* die Transkription des Eisenaufnahmerepressorgens *fur* (Zheng *et al.*, 1999). Analog hierzu führt in *B. subtilis* die Derepression des dortigen Eisenaufnahmerepressorgens *fur* durch Deletion des Regulators für oxidativen Stress, *perR*, der seine Zielgene bei Abwesenheit von oxidativem Stress reprimiert, zu einem Wachstumsdefekt aufgrund von Eisenmangel (Faulkner *et al.*, 2012). Es ist also denkbar, dass die 1,6-fache Hochregulation des Regulators der Eisenhomöostase DtxR in *C. glutamicum* ebenfalls eine Reaktion auf oxidativen Stress ist. Die vermehrte Expression von DtxR würde somit, analog zur Situation in *E. coli* und *B. subtilis*, bei oxidativem Stress zur Repression der Gene für die

Eisenaufnahme führen, um die Eisenkonzentration in der Zelle zu verringern. Die Wichtigkeit von DtxR bei oxidativem Stress wird auch dadurch unterstützt, dass eine Deletion der homologen Gene für IdeR in *M. smegmatis* oder *M. tuberculosis*, beziehungsweise eine Inaktivierung des homologen Gens für DtxR in *Corynebacterium diphtheriae*, zu jeweils erhöhter Sensitivität gegenüber oxidativem Stress führt (Dussurget *et al.*, 1996, Rodriguez *et al.*, 2002, Oram *et al.*, 2002) und die *C. glutamicum dtxR* Deletionsmutante nur in CGXII mit verringerter Eisenkonzentration Wachstum zeigte (Brune *et al.*, 2006).

1.6.2 Die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC hat Kupferstress

C. glutamicum besitzt zwei Tat-abhängig translozierte Multikupferoxidasen, CopO (Cg3287) und Cg1080 (Müller, nicht veröffentlicht), die in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC an ihrem Wirkort fehlen. Die Funktion von CopO bei der Toleranz von Kupfer ist experimentell bestätigt, da eine Deletionsmutante des Gens *copO* (*cg3287*) für eine der Multikupferoxidasen eine erhöhte Kupfersensitivität zeigte (Schelder, 2011). Mechanistisch könnten die Multikupferoxidasen aus *C. glutamicum* wie die Multikupferoxidase CueO aus *E. coli* an der extrazellulären Entgiftung von Kupferionen, das heißt der Oxidation von Kupfer(I) zu Kupfer(II), beteiligt sein (Grass & Rensing, 2001), was zu einer erhöhten Menge an Kupfer(I) in der Zellhülle von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC führen würde. Die höhere Toxizität von Kupfer(I) im Vergleich zu Kupfer(II) (Beswick *et al.*, 1976) rührt vermutlich daher, dass Kupfer(I) energetisch einfacher über die Cytoplasmamembran aufgenommen werden kann (Outten *et al.*, 2001) und eine Fenton-ähnliche Reaktion mit Wasserstoffperoxid eingehen kann (Gunther *et al.*, 1995), was wiederum zu vermehrtem oxidativen Stress führt. Vermutlich trägt zur höheren Toxizität von Kupfer(I) im Vergleich zu Kupfer(II) ebenso bei, dass Kupfer(I) Eisen-Schwefelcluster direkt angreifen kann (Macomber & Imlay, 2009). Eine vermehrte Schädigung von Proteinen mit Eisen-Schwefelclustern in der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC durch oxidativen Stress oder Kupfer(I) wird auch durch die Tatsache deutlich, dass die Assemblierungs- und Reparaturmaschinerie der Eisenschwefelcluster, das *suf*-Operon (*cg1765-cg1759*) signifikant 1,36-fach bis 1,89-fach hochreguliert ist. Wenn vermehrt vorhandenes Kupfer(I) zu einer vermehrten Kupferaufnahme führt, wäre zu erwarten, dass die Transkription der

Zielgene des intrazellulären Kupfersensors CsoR erhöht ist. Tatsächlich zeigt sein wichtigstes Zielgen, das für eine putative Kupferexport-ATPase kodierende *ctpV* (Schelder, 2011) ein 1,26-fach erhöhtes mRNA-Verhältnis (p -Wert 0,039). Dieses leicht erhöhte mRNA-Verhältnis deutet darauf hin, dass die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC leichten Kupferstress hat. Bei analogen Untersuchungen der *E. coli* *tatC* Deletionsmutante war das dort zusätzlich vorhandene Kupferschutzsystem *cusCFBA* induziert (Ize *et al.*, 2004). Die erhöhte Kupfersensitivität der *E. coli* *tatC* Deletionsmutante konnte sowohl der falschen Lokalisation der dortigen Tat-abhängig translozierten Multikupferoxidase CueO als auch dem pleiotropen Zellhüllendefekt aufgrund der ebenfalls falsch lokalisierten Tat-abhängig translozierten Amidasen AmiA und AmiC zugeordnet werden (Ize *et al.*, 2004).

Insgesamt konnten einige Unterschiede zwischen der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC und dem Wildtyp definiert werden. Zum einen zeigt *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC einen drastischen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp. Da der Stamm *C. glutamicum* Δ *qcrA* einen fast ebenso drastischen Wachstumsdefekt zeigt, stellt das Fehlen des putativ Tat-abhängig in die Membran inserierten QcrA (Keller *et al.*, 2012) an seinem Wirkort den Hauptgrund für den Wachstumsdefekt dar. Wahrscheinlich steht *C. glutamicum* ohne den effizienten *bc₁-aa₃*-Superkomplex der Atmungskette weniger Energie zur Verfügung (Niebisch & Bott, 2001). Zum anderen zeigt die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC oxidativen Stress, der einen Wachstumsdefekt verursachen kann (Carlioz & Touati, 1986, Krömer *et al.*, 2008), und leichten Kupferstress.

1.7 Fazit zur Expression und Tat-abhängigen Sekretion von heterologen Proteinen in *C. glutamicum*

Insgesamt verursachte die Expression und Sekretion der getesteten Modellproteine in *C. glutamicum* sehr wenige Reaktionen auf transkriptioneller Ebene. Diese geringe Anzahl an regulierten Genen ist in Übereinstimmung mit einer Studie, in der keine transkriptionellen Reaktionen auf die Tat-abhängige Sekretion eines Proteins beobachtet wurden (Scheele, 2012). Allerdings zeigt der genomweite Transkriptionsvergleich zwischen der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ TatAC und der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ *qcrA*, dass *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene eine Vielzahl an Reaktionen auf das

Fehlen der Tat-Translokation zeigt. Falls ein sehr hohes Maß an Tat-Sekretion eines überexprimierten Proteins in *C. glutamicum* wie in *E. coli* dazu führen kann, dass native Tat-Substrate durch kompetitive Verdrängung nicht mehr in ausreichender Menge transloziert werden, sollte das hohe Maß an Tat-abhängiger Sekretion eines Modellproteins zu eben diesen Reaktionen führen. Die Tatsache, dass solche Reaktionen bei den hier untersuchten Modellproteinen nicht auftraten, deutet darauf hin, dass die Modellproteine in zu geringer Menge sekretiert wurden, um diese Reaktionen hervorzurufen. Das Potential für die Expression und Tat-abhängige Sekretion von heterologen Proteinen in *C. glutamicum* scheint daher noch nicht ausgeschöpft zu sein. Engpässe bei der Expression und Tat-abhängigen Sekretion können bei der Transkription und Translation, bei der Faltung, beim „Targeting“ des Proteins zur Translokase, bei der Translokation über die Cytoplasmamembran oder bei der Passage von Zellwand- und Mycolatschicht auftreten. Da die Translokase in den untersuchten Fällen nicht vollständig ausgelastet war, liegt in den der Translokation vorangehenden Schritten, wie der Transkription und Translation, der Faltung und dem „Targeting“ des Proteins zur Translokase, das Potential zur Optimierung des ganzen Prozesses. Die Transkription und Translation könnten durch ein verbessertes Expressionssystem optimiert werden. Die Koexpression von Chaperonen könnte einen positiven Einfluss auf die Faltung und die Stabilität der hydrophoben Signalpeptide, durch Schutz vor Degradation, aller Tat-Signalpeptid-Protein-Varianten haben (Graubner *et al.*, 2007, Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2012). Eine gezielte Optimierung des „Targetings“ zur Tat-Translokase ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Eventuell kann jedoch durch die Überexpression der Tat-Komponenten aufgrund der häufigeren Interaktion zwischen Translokase und Substrat eine verbesserte Sekretion bewirkt werden, da gezeigt ist, dass die Überexpression der Tat-Translokase in *C. glutamicum* die Tat-abhängige Sekretion steigern kann (Kikuchi *et al.*, 2009). Insgesamt ist *C. glutamicum* ein geeigneter Wirt zur Expression und Tat-abhängigen Sekretion von heterologen Proteinen, in dem es allerdings noch viele Ansatzpunkte zur Optimierung des gesamten Expressions- und Sekretionsprozesses gibt.

2 Hinweise auf eine Beteiligung der Zweikomponentensysteme CgtRS2 und CgtSR7 am Schutz der Zellhülle

2.1 Das Zweikomponentensystem CgtRS2

Bei der Expression und Sekretion Sec-abhängig translozierter Proteine in *C. glutamicum* war das Gen für die extracytoplasmatische Protease HtrA hochreguliert (Scheele, 2012, Kleine, nicht veröffentlicht). Dieses Gen liegt im Genom von *C. glutamicum* in einem Operon hinter den Genen für das Zweikomponentensystem CgtRS2, was auf eine Regulation durch dieses hindeutet. Auch in *E. coli*, *B. subtilis* oder *M. tuberculosis* werden die Gene für HtrA-Homologe durch Zweikomponentensysteme reguliert (Danese *et al.*, 1995, Hyyryläinen *et al.*, 2001, He & Zahrt, 2005). In *E. coli* und *B. subtilis* erfolgt diese Regulation als Reaktion auf die Überexpression sekretierter Proteine, wohingegen die Induktion durch Sec-abhängig sekretierte Proteine in *M. tuberculosis* nicht untersucht ist. In *C. glutamicum* ist über die Regulation von *htrA* bislang nichts bekannt. Daher stellt sich die Frage, ob *htrA*, wie im Fall des Gens für das Homolog aus *M. tuberculosis*, durch das benachbarte Zweikomponentensystem reguliert wird, und ob CgtRS2 möglicherweise am Schutz der Zellhülle in *C. glutamicum* beteiligt ist.

2.1.1 Deletionsmutanten des Zweikomponentensystems CgtRS2 zeigen Sekundärsuppressionen

Zwei unabhängig voneinander generierte Deletionsmutanten in *cgtRS2* zeigten ein unterschiedliches Wachstumsverhalten (Kleine, nicht veröffentlicht). Dieses unterschiedliche Wachstum deutet auf die Bildung von Sekundärsuppressoren hin. Diese könnten entstehen, weil die Aktivierung oder Repression eines oder mehrerer Zielgene essentiell ist. Der Versuch, das Regulon des Zweikomponentensystems CgtRS2 mit Hilfe von DNA-Microarrays durch die Überexpression des Antwortregulators CgtR2 in einer Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC 13032 $\Delta cgtRS2$ zu definieren, die in Anwesenheit des plasmidkodierten Antwortregulators CgtR2 hergestellt wurde, um die Bildung von Sekundärsuppressionen zu vermeiden, führte zu fast 300 signifikant mehr als zweifach regulierten Genen. Dies ist im Vergleich zur Anzahl an regulierten Genen (2 bis 22 Zielgene / Operons) der bisher untersuchten Zweikomponentensysteme (Bott & Brocker, 2012) eine sehr große Anzahl. Um sicher zu sein, dass nicht auch die Deletion des

Zweikomponentensystems in Anwesenheit des Antwortregulators zur Bildung von Sekundärsuppressoren führt, wurde als alternativer Ansatz die Überexpression des Antwortregulators CgtR2 im *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtyp gewählt.

2.1.2 Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 und ihre Funktion

Putative Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 wurden durch Überexpression von CgtR2 im Wildtyphintergrund mittels DNA-Microarrays definiert. Dieser Ansatz führte zu zehn signifikant mehr als zweifach verändert transkribierten Genen. Da der Wildtyp jedoch die zugehörige Sensorkinase CgtS2 besitzt, ist es möglich, dass diese den Antwortregulator CgtR2 durch Dephosphorylierung sehr effektiv in inaktivem Zustand hält und daher nicht alle Gene des Regulons ein verändertes mRNA-Verhältnis aufweisen, sondern nur die am stärksten regulierten Gene. Die direkte Bindung von CgtR2 an die Promotorbereiche der zehn Gene, die in den Microarrays ein verändertes mRNA-Verhältnis aufwiesen, wurde mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten überprüft. Dadurch konnten sieben Operons mit insgesamt zehn Genen als direkte Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 identifiziert werden. Diese sind in Abbildung 29 dargestellt und ihre Funktion ist im Folgenden kurz erläutert.

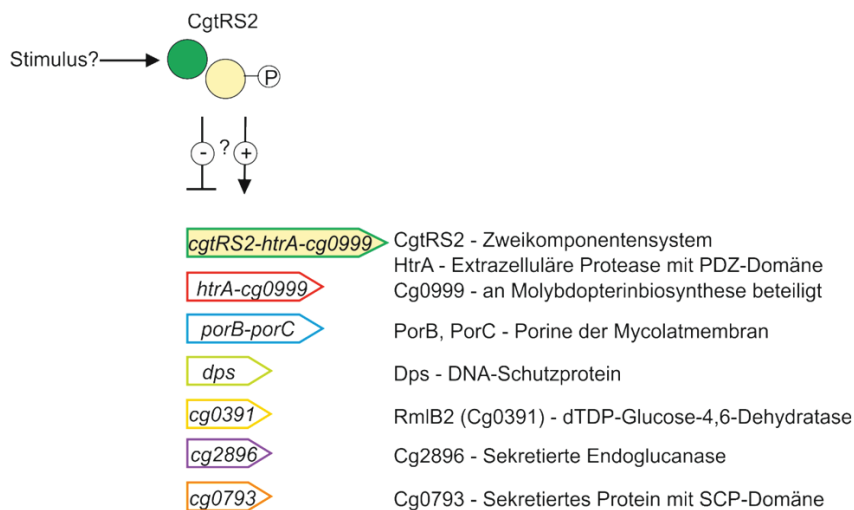


Abbildung 29: Direkte Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2. Als Reaktion auf einen nicht identifizierten Stimulus reguliert das Zweikomponentensystem CgtRS2 die dargestellten Zielgene. Aufgrund der scheinbar negativen Autoregulation des Zweikomponentensystems CgtRS2, die so für kein Zweikomponentensystem beschrieben ist, ist unklar, ob die jeweiligen Gene aktiviert oder reprimiert werden. Kenntnisse zur Funktion der Gene sind im Text erläutert.

Die Gene für das Zweikomponentensystem CgtRS2 sind wie die Gene für die Zweikomponentensysteme PhoRS und CopRS aus *C. glutamicum* autoreguliert (Schaaf & Bott, 2007, Schelder *et al.*, 2011). Allerdings ist aufgrund der Überexpression des plasmidkodierten Gens für den Antwortregulator CgtR2 im DNA-Microarray-Experiment, die zu einem erhöhten mRNA-Verhältnis von *cgtR2* führt, nicht zu unterscheiden, ob sich das Zweikomponentensystem CgtRS2 reprimiert oder aktiviert. Die signifikante 1,32-fache Herunterregulation des Gens für die Sensor kinase CgtS2, die im Operon hinter dem Gen für den Antwortregulator CgtR2 liegt, deutet jedoch darauf hin, dass es sich möglicherweise um eine negative Autoregulation handelt. Als in der Literatur beschriebene Zweikomponentensysteme, die sich selbst reprimieren, finden sich nur die Zweikomponentensysteme zur Regulation der Stickstoffassimilierung in *Enterobacteria*, wie NtrBC aus *E. coli* oder *Klebsiella pneumoniae* (Pahel *et al.*, 1982, Alvarez-Morales *et al.*, 1984). Allerdings reprimieren sich diese Zweikomponentensysteme nur im uninduzierten Zustand und sobald der Stimulus vorhanden ist, aktivieren sie ihre Transkription (Reitzer & Magasanik, 1985, Magasanik, 1988). Das bedeutet, dass es sich im Gegensatz zur Situation bei CgtRS2 um eine Repression im inaktiven Zustand und nicht im aktivierten Zustand handelt.

Das Zweikomponentensystem CgtRS2 wird zusammen mit den dahinterliegenden Genen *htrA* und *cg0999* als putatives Operon transkribiert (Pauling *et al.*, 2012). Dies entspricht der Situation in *M. tuberculosis*, in dem experimentell bestätigt ist, dass die homologen Gene für das Zweikomponentensystem, das Gen für die Protease und das Gen für das folgende Protein als Operon und zusätzlich ein kürzeres Transkript mit dem Gen für die Protease und dem folgenden Gen transkribiert werden (White *et al.*, 2010). Auch in *C. glutamicum* wird das Gen *htrA* zusätzlich von einem separaten Promotor transkribiert, wie in Abbildung 29 dargestellt ist. Dies ist neben den Hinweisen aus den Gelretardationsexperimenten, mit denen die direkte Bindung des Promotorbereichs von *htrA* durch CgtR2 gezeigt werden konnte, durch eine Promotorfusion mit dem Promotorbereich von *htrA* und dem Gen für die β -Galactosidase bestätigt (Kleine, nicht veröffentlicht). HtrA ist eine extracytoplasmatisch lokalisierte Protease mit PDZ-Domäne. Diese schützt die Zelle wie andere Vertreter dieser Proteasefamilie vor der Akkumulation falsch gefalteter oder ungefalteter Proteine in der Zellhülle (Hunke & Betton, 2003, Clausen *et al.*,

2011). Das Gen *cg0999* kodiert für ein Protein, das an der Molybdopterinbiosynthese beteiligt sein könnte.

Ein weiteres reguliertes Gen kodiert für das DNA-Bindeprotein Dps, ein universelles Stressprotein, das vor allem bei oxidativem Stress, der Eisenhomöostase und in der stationären Phase, aber auch bei hohem Druck, Hitzestress, Kupferüberschuss und sauren oder alkalischen Bedingungen wichtig ist (Calhoun & Kwon, 2011).

Ebenso gehört das Gen *rmIB2* (*cg0391*), dessen korrespondierendes Protein als dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase annotiert ist, zu den direkt durch CgtRS2 regulierten Genen. Solche Enzyme sind an der Synthese von Rhamnose beteiligt. Zumindest die Verwandten *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Nocardia* weisen Rhamnose in der Zellhülle auf (Daffé *et al.*, 1993). Die Zellhülle von *C. glutamicum* ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenso aufgebaut. Da für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase aus *M. tuberculosis* gezeigt ist, dass diese essentiell für die Integrität der Zellhülle ist (Li *et al.*, 2006), könnte *rmIB2* in *C. glutamicum* ebenfalls Einfluss auf die Integrität der Zellhülle haben.

Des Weiteren gehören die Gene für den für Anionen selektiven Kanal PorB der Mycolatmembran und dessen Homolog PorC zu den Zielgenen des Zweikomponentensystems CgtRS2 (Costa-Riu *et al.*, 2003). PorB dient der Aufnahme kleiner hydrophiler Stoffe wie Nährstoffe (Costa-Riu *et al.*, 2003). Die Herunterregulation dieser Gene könnte also zu einer Isolation gegenüber der Umwelt führen, wohingegen eine Aktivierung der Nährstoffaufnahme dienen könnte.

Die weiteren Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 sind nicht experimentell untersucht. *cg0793* kodiert für ein sekretiertes Protein, auf dessen Funktionalität keine Hinweise existieren. Das Gen *cg2896* kodiert für eine putative sekretierte Endoglucanase der Glycohydrolase-Familie 16. Zu dieser Familie gehören beispielsweise Laminarinasen, die Laminarin, einen Speicherstoff der Braun- und Kieselalgen, spalten können. Eine solche enzymatische Aktivität dient der Nährstoffbereitstellung und wurde beispielsweise in anaerob lebenden Darmbakterien und einem Tiefseebakterium gefunden (Salyers *et al.*, 1977, Zverlov *et al.*, 1997). Für das aus Japan stammende Bodenbakterium *C. glutamicum* könnte eine sekretierte Laminarinase der Nährstoffbereitstellung aus angespülten oder verarbeiteten Algen dienen.

Mit großer Wahrscheinlichkeit wurden bisher nicht alle direkten Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 identifiziert. Mit Hilfe der bereits identifizierten Gene könnte in folgenden Untersuchungen das Bindemotiv für CgtR2 experimentell aufgeklärt werden, da dies *in silico* nicht erfolgreich war, und durch eine Suche nach diesem Motiv im Genom von *C. glutamicum* weitere putative Zielgene identifiziert werden. Diese könnten weitere Hinweise auf die biologische Funktion des Zweikomponentensystems CgtRS2 liefern. Alternativ können weitere putative Zielgene (beispielsweise alle mehr als 1,5-fach verändert transkribierten Gene aus den DNA-Microarrays) auf eine direkte Bindung durch CgtR2 untersucht werden.

2.1.3 Vergleich zwischen den beiden Zweikomponentensystemen CgtRS2 aus *C. glutamicum* und MprAB aus *M. tuberculosis*

Wie erwähnt weisen die Proteine für die beiden Zweikomponentensysteme CgtRS2 aus *C. glutamicum* und MprAB aus *M. tuberculosis* große Ähnlichkeit zueinander auf (CgtR2 zu MprA 69% identische und 84% ähnliche AS, CgtS2 zu MprB 42% identische und 63% ähnliche AS). Trotzdem bestehen auch deutliche Unterschiede zwischen beiden Systemen. Stimuli für das MprAB-System aus *M. tuberculosis* sind beispielsweise SDS oder Nährstoffmangel (Manganelli *et al.*, 2001, Betts *et al.*, 2002). In *C. glutamicum* hingegen ließ sich eine Fusion des Promotorbereichs von *cgtR2* mit dem strukturellen Gen für die β -Galactosidase nicht durch SDS induzieren (Kleine, nicht veröffentlicht). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass das Zweikomponentensystem MprAB in *M. tuberculosis* positiv autoreguliert ist und das *htrA*-Homolog *pepD* sowie die Gene *sigE* und *sigB* aktiviert (He & Zahrt, 2005, He *et al.*, 2006, Pang *et al.*, 2007). Im Gegensatz hierzu weisen diese Gene in *C. glutamicum* bei der Überproduktion des Antwortregulators CgtR2 ein signifikant reduziertes mRNA-Verhältnis (1,32-fach bis 1,54-fach) im Vergleich zum Wildtyp auf. Diese genau umgekehrte Regulation in *C. glutamicum* im Vergleich zu *M. tuberculosis* ist unerwartet. In *C. glutamicum* wurde die Deletionsmutante im Zweikomponentensystem *cgtRS2* nicht untersucht, da der Verdacht bestand, dass sie Sekundärmutationen aufweisen könnte. In *M. tuberculosis* wurden hingegen zur Untersuchung des Zweikomponentensystems MprAB eine Mutante mit einer Insertion im Gen für den Antwortregulator MprA und eine Mutante, in der Teile der Gene *mprAB* deletiert waren, herangezogen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass bei He *et al.* in Untersuchungen der Insertionsmutante von

mprA mittels DNA-Microarrays drei Gene herunterreguliert waren, die bei Pang *et al.* in der Deletionsmutante *mprAB* im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert waren (He *et al.*, 2006, Pang *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigten zwar beide Arbeiten, dass das Zweikomponentensystem MprAB den Sigmafaktor σ^B regulieren kann, jedoch konnte mit Hilfe der Untersuchung der Insertionsmutante in *mprA* keine MprA-abhängige Regulation des Sigmafaktors als Reaktion auf SDS gezeigt werden, wohingegen durch die Untersuchung der Deletionsmutante eine MprA-abhängige Induktion des Gens für den Sigmafaktor σ^B durch SDS gezeigt werden konnte (He *et al.*, 2006, Pang *et al.*, 2007). Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass auch in *M. tuberculosis* im Zuge der Generierung der Insertionsmutante in *mprA* oder der Deletionsmutante in *mprAB* die Bildung von Sekundärsuppressionen oder zumindest weitreichende Regulationsänderungen erfolgen. Vor dem Hintergrund der scheinbar negativen Autoregulation des Zweikomponentensystems CgtRS2 in *C. glutamicum* aufgrund der Daten aus den DNA-Microarray-Experimenten, muss daher in Betracht gezogen werden, dass auch die Überexpression des Antwortregulators CgtR2 im Wildtyphintergrund zur Bildung von Sekundärsuppressoren oder Regulationsänderungen führen könnte. Dies wird im Folgenden erläutert.

2.1.4 Fazit zum Zweikomponentensystem CgtRS2 aus *C. glutamicum*

Mit Hilfe von DNA-Microarrays sowie Gelretardationsexperimenten konnten direkte Zielgene des Zweikomponentensystems CgtRS2 identifiziert werden (*cgtRS2*, *htrA*, *cg0999*, *porB*, *porC*, *dps*, *rmIB2*, *cg2896* und *cg0793*). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CgtR2 phosphoryliert mit höherer Affinität an seine Zielgene bindet als unphosphoryliert. Allerdings zeigten die Zielgene *cgtRS2* und *htrA* in *C. glutamicum* eine Repression und nicht eine Aktivierung wie im Fall des homologen Zweikomponentensystems MprAB aus *M. tuberculosis*. Vor dem Hintergrund, dass das Fehlen des Zweikomponentensystems, des Antwortregulators oder dessen Überexpression wahrscheinlich sowohl in *C. glutamicum* als auch in *M. tuberculosis* zur Bildung von Sekundärsuppressoren oder zumindest zu Regulationsveränderungen führt, können die Ergebnisse der DNA-Microarrays unterschiedlich interpretiert werden. Dies ist im Folgenden dargelegt.

Erstens ist es möglich, dass in *C. glutamicum* als Reaktion auf die Überexpression von CgtR2 weder Mutationen gebildet werden noch Regulationsveränderungen

erfolgen. In diesem Fall entsprechen die in den DNA-Microarrays beobachteten Transkriptionsänderungen der Regulation aufgrund eines aktivierten CgtRS2-Systems. Die Sensorkinase zeigt bei Aktivierung Kinaseaktivität, was durch die Überexpression des Antwortregulators und dessen unspezifische Phosphorylierung simuliert wurde. Dies würde zur Repression aller bisher identifizierten direkten Zielgene bis auf *dps* führen, also auch zur Repression des Zweikomponentensystems selbst. CgtRS2 wäre somit ein außergewöhnliches Zweikomponentensystem, da in diesem Zusammenhang der Fall einer negativen Autoregulation bisher nicht beschrieben ist. Auch für Gene, die für HtrA-Homologe kodieren, sind keine Repressions- sondern nur Aktivierungsmechanismen beschrieben. Biologisch betrachtet würde eine Herunterregulation von Schutzmechanismen, wie der Expression von HtrA oder auch einem Zweikomponentensystem, nur in einer Situation logisch erscheinen, in der diese Schutzmechanismen in naher Zukunft nicht mehr benötigt werden. Dabei könnte es sich um einen Überdauerungszustand handeln, was jedoch für *C. glutamicum* bisher nicht beschrieben ist. Die Herunterregulation der Porine könnte während eines Überdauerungszustandes der besseren Abgrenzung gegenüber der Umwelt dienen. Zu dieser These würde passen, dass das MprAB-System aus *M. tuberculosis* ursprünglich als wichtiger Faktor zur Etablierung persistenter Infektionen beschrieben wurde, die ebenfalls eine Art Überdauerungszustand darstellen (Zahrt & Deretic, 2001).

Zweitens ist es möglich, dass die Sensorkinase CgtS2 in Abwesenheit eines Stimulus Kinaseaktivität und als Reaktion auf einen Stimulus Phosphataseaktivität zeigt. Ein solcher Fall ist von den Histidinkinasen der Zweikomponentensysteme des Quorum Sensing bekannt (Henke & Bassler, 2004). Dies würde bedeuten, dass die Überexpression des Antwortregulators und dessen künstliche Phosphorylierung, die für die DNA-Microarrays gewählt wurde, das inaktive und nicht das aktive Zweikomponentensystem CgtRS2 simuliert hat. Demzufolge würde als Reaktion auf einen Stimulus, umgekehrt als im DNA-Microarray beobachtet, eine Derepression von *cgtRS2*, *htrA*, *cg0999*, *porB*, *porC*, *rmlB2*, *cg0793* und *cg2896* erfolgen. Im Hinblick auf den Schutz der Zellhülle dient CgtRS2 der Reizwahrnehmung und –weiterleitung, HtrA baut falsch gefaltete Proteine in der Zellhülle ab, RmlB2 könnte die Zellhülle stabilisieren, und PorB und PorC können Nährstoffe aufnehmen, die unter Umständen von Cg2896 zur Verfügung gestellt wurden. Der Stimulus wäre dann sehr wahrscheinlich eine Art Zellhüllenstress, wobei es sich um entfaltete

Proteine oder schädigende Substanzen handeln könnte, und bei CgtRS2 würde es sich um ein Zweikomponentensystem zum Zellhüllenschutz handeln.

Drittens ist aufgrund der Bildung von Sekundärmutationen in *C. glutamicum* bei Deletion von *cgtRS2* denkbar, dass auch die Überexpression von CgtR2 entweder zur Bildung von Sekundärsuppressoren oder aber zu Regulationen führt, die die Funktion des überexprimierten Antwortregulators CgtR2 unterbinden. Bei Regulationsveränderungen könnte es sich beispielsweise um die Hochregulation oder Aktivierung von Phosphatasen handeln, die den Antwortregulator effektiv dephosphorylieren und so inaktiv halten. Ein Beispiel für die Inhibition eines Antwortregulators durch Phosphatasen stellt die Regulation der Sporulation in *B. subtilis* dar. Dort kann der Antwortregulator Spo0A durch die Phosphatasen RapA, RapB, RapE und RapH dephosphoryliert werden (Higgins & Dworkin, 2012). Bei der Bildung von Sekundärmutationen als Reaktion auf die Überexpression von CgtR2 sind Mutationen von Bindestellen für CgtR2 vor Genen, die nicht im Überschuss vorhanden sein sollten, wahrscheinlich. Dafür kommen beispielsweise die Gene *sigE* und *sigB* für Sigmafaktoren in Frage, da diese ihrerseits eine Vielzahl an Transkriptionsänderungen bewirken. Falls es Histidinkinasen anderer Zweikomponentensysteme gibt, die CgtR2 dephosphorylieren können, könnte auch die vermehrte Expression einer solchen Histidinkinase der Regulation der Zielgene von CgtR2 entgegenwirken. Eine Mutation vor dem Gen einer solchen Histidinkinase könnte die Transkription oder die Ribosomenbindestelle verbessern und so zu vermehrter Expression beitragen. Bei der Überexpression von CgtR2 gibt es aus den DNA-Microarray-Experimenten Hinweise auf die erhöhte Transkription von zwei Histidinkinasen, die eine solche Theorie unterstützen. Zum einen deutet die 1,27-fach bis 1,61-fach signifikant erhöhte Transkription der Zielgene des Zweikomponentensystems CopRS (Schelder *et al.*, 2011) aufgrund der Autoregulation dieses Systems auf eine erhöhte Transkription der Sensorkinase hin. Zum anderen zeigt die Sensorkinase HrrS (CgtS11), für die kein Regulator bekannt ist, eine 1,32-fach erhöhte Transkription. Für die DNA-Microarrays würde dies durch die effektive Dephosphorylierung des überexprimierten CgtR2 wie unter zweitens beschrieben bedeuten, dass die tatsächliche Regulation nicht wie beobachtet, sondern umgekehrt erfolgt und CgtRS2 am Schutz der Zellhülle beteiligt ist.

Die Frage, ob das Zweikomponentensystem CgtRS2 *htrA* als Reaktion auf die vermehrte Sec-abhängige Sekretion von Proteinen reguliert, ist somit nicht endgültig

zu beantworten. Der Antwortregulator CgtR2 dieses Zweikomponentensystems bindet im Upstreambereich von *htrA* und ist daher sehr wahrscheinlich an der Regulation von *htrA* beteiligt, jedoch ist unklar, welcher Stimulus dafür benötigt wird. Die Tatsache, dass *htrA* in den *cgtRS2* Deletionsmutanten als Reaktion auf die Sec-abhängige Proteinsekretion nach wie vor vermehrt transkribiert wird, weist darauf hin, dass es neben CgtR2 weitere Transkriptionsfaktoren oder Sigmafaktoren geben muss, die *htrA* regulieren. Für den Sigmafaktor σ^B , der im Übergang zur stationären Phase und durch Induktion durch Säure, Ethanol, Salz, Kälte- oder Hitzestress oder Sauerstoffmangel eine erhöhte Transkription zeigt (Pátek & Nesvera, 2011) ist beispielsweise eine Hochregulation von *htrA* beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase gezeigt, die in der Deletionsmutante $\Delta sigB$ nicht erfolgt (Larisch *et al.*, 2007). Ebenso zeigt die Deletionsmutante des Gens für den Antisigmafaktor von σ^H , einen an der Regulation der Antworten auf Hitzestress und oxidativen Stress beteiligten Sigmafaktor, eine Hochregulation von *htrA* (Busche *et al.*, 2012). Somit können zwei Sigmafaktoren ebenfalls die Transkription von *htrA* induzieren. Die Funktion des Zweikomponentensystems kann zum einen eine zusätzliche Induktion von *htrA* unter bestimmten Bedingungen sein und zum anderen der Feinabstimmung, Abstufung oder Verstärkung der Regulation durch die Sigmafaktoren dienen. Durch welche Regulationsmechanismen *htrA* bei der Sec-abhängigen Proteinsekretion induziert wird, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

2.2 Das Zweikomponentensystem CgtSR7

Bei Sec-abhängiger Sekretion von Amylasen waren die Gene *cg0706*, *cg1325* und *cg3264* hochreguliert, die für Proteine mit PspC- beziehungsweise PspA-Domäne kodieren (Scheele, 2012, Kleine, nicht veröffentlicht). Da *cg0706* neben den Genen für ein Zweikomponentensystem liegt, dessen Sensorkinase ebenfalls eine PspC-Domäne aufweist, stellte sich die Frage, ob dieses Zweikomponentensystem, das zudem Ähnlichkeit zu den am Schutz der Zellhülle beteiligten LiaSR-Zweikomponentensystemen der *Firmicutes* aufweist, mit seinen Zielgenen das Pendant der „Phage Shock“ Antwort in *C. glutamicum* und für die beobachtete Regulation von *cg0706*, *cg1325* und *cg3264* verantwortlich ist.

2.2.1 Ähnlichkeit des Zweikomponentensystems CgtSR7 zu den Lia-Systemen der *Firmicutes*

Das Zweikomponentensystem CgtSR7 aus *C. glutamicum* besitzt Ähnlichkeit zum Zweikomponentensystem LiaSR aus *B. subtilis*. Beide Systeme besitzen einen Repressor, das Lia-System LiaF (Jordan *et al.*, 2006) und das CgtSR7-System Cg0706 (Kleine *et al.*, in Vorbereitung), der das System in Abwesenheit eines Stimulus reprimiert und eine DUF2154-Domäne besitzt, die an der Wahrnehmung zellwandaktiver Antibiotika beteiligt sein könnte. Außerdem sind beide Systeme durch zellwandaktive Antibiotika, wie zum Beispiel Bacitracin, induzierbar (Mascher *et al.*, 2003, Kleine *et al.*, in Vorbereitung). Durch die Ähnlichkeit des CgtSR7-Systems zum LiaSR-System aus *B. subtilis* liegt auch ein Vergleich mit den Zweikomponentensystemen VraSR aus *S. aureus*, CesSR aus *L. lactis*, LiaSR aus *Streptococcus mutans* und LiaSR aus *Streptococcus pneumoniae* (Mascher *et al.*, 2004, Kuroda *et al.*, 2003, Martínez *et al.*, 2007, Suntharalingam *et al.*, 2009, Eldholm *et al.*, 2010) nahe, da diese ihrerseits Ähnlichkeit zum LiaSR-System aus *B. subtilis* aufweisen. Die genannten Zweikomponentensysteme dieser *Firmicutes* besitzen allesamt Histidinkinasen, die nicht über einen periplasmatischen Loop zur Reizwahrnehmung verfügen und den Reiz folglich in oder an der Membran wahrnehmen (Mascher, 2006). Obwohl sich die Sensorkinase CgtS7 in diesem Punkt von den Histidinkinasen der *Firmicutes* unterscheidet, da sie im Gegensatz zu diesen über eine periplasmatisch lokalisierte PspC-Domäne zur Reizwahrnehmung verfügt, sind all diese Zweikomponentensysteme inklusive CgtSR7 unter anderem durch Bacitracin induzierbar. Darüber hinaus ist LiaSR aus *B. subtilis* auch durch Ramoplanin, Vancomycin (Mascher *et al.*, 2004), CAMPs (Pietiläinen *et al.*, 2005), Ethanol (Petersohn *et al.*, 2001) und einen alkalischen Schock (Wiegert *et al.*, 2001) induzierbar. VraSR aus *S. aureus* ist neben Bacitracin durch Teicoplanin, Ceftizoxim, Imipenem und D-Cycloserin induzierbar (Kuroda *et al.*, 2003). LiaSR aus *S. mutans* ist neben Bacitracin durch Vancomycin, Nisin und Chlorhexidin induzierbar (Suntharalingam *et al.*, 2009). CesSR aus *L. lactis* ist durch Vancomycin und das Bacteriocin Lcn972 (Martínez *et al.*, 2007) und LiaSR aus *S. pneumoniae* durch Tunicamycin, Nisin und Lysozym induzierbar (Eldholm *et al.*, 2010). Aufgrund dieser unterschiedlichen Induktoren handelt es sich um generelle Zellhüllenschutzsysteme. Dieser Schutz der Zellhülle wird durch unterschiedliche Zielgene erreicht. Die Zielgene und Besonderheiten der Lia-ähnlichen Systeme der *Firmicutes* werden im

Folgenden kurz erläutert. So führt die Induktion des Zweikomponentensystems LiaSR aus *B. subtilis* zur Hochregulation des PspA-Homologs LiaH, das wie PspA aus *E. coli* ringförmige Multimere aus 36 Untereinheiten bilden und zur Stabilität der inneren Membran beitragen kann (Mascher *et al.*, 2004, Wolf *et al.*, 2010). Das VraSR-System aus *S. aureus* aktiviert hingegen unter anderem Gene, die zur Zellwandsynthese benötigt werden, und bildet eine Ausnahme dahingehend, dass das Homolog des Repressors LiaF, YvqF, das VraSR-System nicht inhibiert, sondern für dessen Aktivierung nötig ist (Kuroda *et al.*, 2003, McCallum *et al.*, 2011). Das CesSR-System aus *L. lactis* reguliert 21 Gene, die unter anderem an der Membranproteinbiogenese (OxaA2), an der Proteinfaltung (PpiB) und an der Resistenz gegen Lysozym beteiligt sind (SpxB) (Martínez *et al.*, 2007, Veiga *et al.*, 2007). Die Inaktivierung der am stärksten regulierten Gene *lmg0169*, das für ein putatives Membranprotein ohne Homologe kodiert, und *lmg2164*, das für ein putatives konserviertes cytosolisches Protein kodiert, führen zu Hitzebeziehungsweise NaCl-Sensitivität und in beiden Fällen zu erhöhter Sensitivität gegenüber niedrigem pH. Die Überexpression des Operons *lmg2164-lmg2163*, in dem *lmg2163* für ein Membranprotein mit PspC-Domäne kodiert, führt hingegen zu erhöhter Resistenz gegen das Bacteriocin Lcn972, welches das Zweikomponentensystem CesSR auch induzieren kann (Roces *et al.*, 2009). Dies unterstreicht die Rolle dieses Zweikomponentensystems beim Schutz der Zellhülle. Das LiaSR-System aus *S. mutans* reguliert wiederum Gene für die Membranbiosynthese, für die Peptidoglycanbiosynthese, für Zellhüllenchaperone und -proteasen und für Transkriptionsregulatoren (Suntharalingam *et al.*, 2009). Das ebenfalls LiaSR genannte System aus *S. pneumoniae* weist eine Besonderheit auf. Dieses kann neben Bacitracin auch durch Lysozym induziert werden. Anders als die bisher beschriebenen Systeme vermittelt dieses Zweikomponentensystem allerdings keinen Schutz gegen Antibiotika, die den Lipid II Zyklus inhibieren, sondern schützt gegen Autolyse, die durch Fratrizid induziert wird (Eldholm *et al.*, 2010). Hierbei sind ein Protein mit PspC-Domäne (Spr0810) und das Protein PcpC, ein Cholinbindepotein der Zellwand, besonders wichtig. Darüber hinaus wurden in DNA-Microarrays zur Definition des Regulons von LiaSR in *S. pneumoniae* die Gene für die Hitzeschockproteine HrcA und GrpE identifiziert (Eldholm *et al.*, 2010). Alle beschriebenen Zweikomponentensysteme besitzen also die Gemeinsamkeit, dass sie durch Bacitracin und weitere Induktoren induzierbar sind und regulieren dennoch

2.2.2 Zielgene des Zweikomponentensystems EsrSR und ihre Funktion

A

EsrI
Inhibitor von CgtSR7
in Abwesenheit eines Stimulus

Bacitracin,
Sekretionsstress

EsrSR
kann durch Bacitracin
oder Sekretionsstress
induziert werden und
ist positiv autoreguliert

B

Zellwandpeptidase NlpC
Die Repression könnte die
weitere Destabilisation der
sowie geschwächten
Zellhülle verhindern

C

ABC-Transporter
Die Deletion von cg3322-cg3320
führt zu einem Wachstumsdefekt
auf Bacitracin

D

RsmP
Essentiell und für die
Zellform verantwortlich

E

Intrazelluläre Chaperone
könnten bei der vermehrten
Expression von Membranproteinen bei Induktion des
Regulons von CgtSR7 deren Aggregation verhindern

Hypothetische (Membran-)Proteine

F

Cg1325
Membranprotein mit
PspC-Domäne, schützt
in *S. pneumoniae* gegen
Fratrizin-induzierte Autolyse
und in *Y. enterocolitica* gegen
Secretin

Cg1325

Cg0451

Cg0452

Cg0453

Cg0781

Cg3142

Cg2684

Cg2444

Cg3078

Cg2684
könnte an der Membran-
zusammensetzung und
Zellteilung beteiligt sein

Cg3322

Cg3320

Cg3321

Cg2812

Cg2811

NlpC

EsrR

EsrSR

RsmP

HspR

DnaK

DnaJ

GrpE

ClpB

CgtSR7

Abbildung 30: Putative Lokalisation und Funktion der korrespondierenden Proteine der durch EsrSR regulierten Gene. Diese wurden zur besseren Übersicht in die funktionalen Gruppen A-F eingeteilt.

(A) Das Zweikomponentensystem EsrSR ist positiv autoregulierte, wie die meisten der genannten Zweikomponentensysteme, die durch Bacitracin induziert werden können (Kuroda *et al.*, 2003, Mascher *et al.*, 2004, Martínez *et al.*, 2007, Eldholm *et al.*, 2010, Kleine *et al.*, in Vorbereitung). Außerdem kann es durch Sec-abhängige Sekretion von Amylasen induziert werden, wie auch das LiaSR-System aus *B. subtilis* (Hyryläinen *et al.*, 2005). Es wird durch EsrI, einem Membranprotein mit PspC- und DUF2154-Domäne, in Abwesenheit eines Stimulus reprimiert.

(B) Das einzige herunterregulierte Gen kodiert das für die Zellwandpeptidase NlpC (Tsuge *et al.*, 2008). Dieses könnte reprimiert werden, um die beispielsweise durch Bacitracin angegriffene Zellwand nicht zusätzlich zu destabilisieren. In Übereinstimmung hiermit haben Kuroda *et al.* als Reaktion auf Vancomycin in *S. aureus* ebenfalls eine Herunterregulation zellwandlytischer Enzyme beobachtet (Kuroda *et al.*, 2003).

(C) Darüber hinaus sind die Gene für zwei ABC-Transporter (*cg2812-cg2811; cg3322-cg3321-cg3320*) hochreguliert. ABC-Transporter wurden beispielsweise in *S. coelicolor* als Resistenzmechanismus gegen zellwandaktive Antibiotika beschrieben (Hesketh *et al.*, 2011). Die beiden ABC-Transporter in *S. coelicolor* weisen wie Cg2811 zehn Transmembranhelices auf und zwischen der ersten und zweiten sowie der siebten und achten Transmembranhelix jeweils einen größeren extracytoplasmatischen Loop (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Somit sind sie minimal anders aufgebaut als die in *Firmicutes* weit verbreiteten ABC-Transporter für Antibiotikaresistenz, die ebenfalls zehn Transmembranhelices, aber nur einen größeren extracytoplasmatischen Loop zwischen der siebten und achten Transmembranhelix besitzen (Dintner *et al.*, 2011). Die Permeasekomponente (Cg3320) des zweiten induzierten ABC-Transporter Cg3322-Cg3321-Cg3320 ähnelt mit ihren vier Transmembranhelices und dem größeren extracytoplasmatischen Loop zwischen der ersten und zweiten Transmembranhelix dem Makrolidexporter MacB aus *E. coli*, der zur Erythromycinresistenz beiträgt (Kobayashi *et al.*, 2001). Tatsächlich zeigen erste Experimente, dass die Deletion der Gene für den ABC-Transporter Cg3322-Cg3321-Cg3320 zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Bacitracin führt (Kleine *et al.*, in Vorbereitung). Dies deutet darauf hin, dass dieser ABC-Transporter in Analogie zu den erwähnten ABC-Transportern aus *S. coelicolor* und den *Firmicutes* de facto zur Resistenz gegen Bacitracin beiträgt.

(D) Zu dieser Gruppe gehört lediglich das durch das EsrSR-System induzierbare Gen *rsmP*. Das essentielle Protein RsmP, das eine PspA-Domäne besitzt, kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* je nach Phosphorylierungszustand Filamente ausbilden und bildet somit ein Cytoskelett in *C. glutamicum* (Fiuza *et al.*, 2010). Die Autoren dieser Studie vermuteten, dass RsmP als inneres Gerüst der Stabilisierung der Zelle dienen oder an der polaren Peptidoglycansynthese beteiligt sein könnte, die der Zellteilung vorausgeht. Beide putativen Funktionen passen ins Bild der „Phage Shock“- oder Lia-Antwort, da die PspA-Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis*, wenn auch auf andere Weise, der Stabilisierung der Cytoplasmamembran dienen (Kleerebezem *et al.*, 1996, Wolf *et al.*, 2010) und sowohl das VraSR-System aus *S. aureus* als auch das LiaSR-System aus *S. mutans* eine Aktivierung der Peptidoglycansynthese bewirken (Kuroda *et al.*, 2003, Suntharalingam *et al.*, 2009). Darüber hinaus ändert sich die Zellform von *C. glutamicum* durch das Silencing von *rsmP* von der charakteristischen Stäbchenform in eine kokkoide Form (Fiuza *et al.*, 2010), was für die Deletion von *liaR* in *S. mutans* bei Wachstum im Biofilm ebenfalls der Fall ist (Perry *et al.*, 2008).

(E) Die hochregulierten Gene dieser Gruppe kodieren für Chaperone. Die Induktion der Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE und ClpB durch das Zweikomponentensystem EsrSR könnte erfolgen, um eine Aggregation von vermehrt exprimierten Membranproteinen bei Induktion des EsrSR-Systems zu verhindern. Die meisten Membranproteine werden cotranslational über den SRP-Weg in die Membran inseriert (Facey & Kuhn, 2010) und kommen daher höchstwahrscheinlich nicht mit den cytoplasmatischen Chaperonen in Kontakt. Allerdings führt eine Reduktion der Menge von SRP in *E. coli* zur Induktion der Hitzeschockantwort, also von Chaperonen und Proteasen (Bernstein & Hyndman, 2001). Darüber hinaus wurde durch die *in vitro* Translation der Lactosepermease LacY in Anwesenheit von GroEL und ihrer anschließenden Insertion in INVs (Cytoplasmamembranvesikel) gezeigt, dass die posttranslationale Insertion von Membranproteinen möglich ist (Bochkareva *et al.*, 1996). Möglicherweise können Membranproteine also auch *in vivo*, falls nicht ausreichend SRP oder dessen Rezeptor für eine ausschließlich cotranslationale Insertion vorhanden ist, durch cytoplasmatische Chaperone löslich gehalten werden und posttranslational in die Membran inserieren. Alternativ könnte die Induktion der intrazellulären Chaperone aber auch eine präventive Maßnahme sein, da die Störung der Integrität der Zellhülle auch die Denaturierung intrazellulärer Proteine nach sich ziehen könnte. Ein solcher Fall ist beispielsweise aus *E. coli* für Ethanol bekannt, das

einerseits die Zellhülle angreift und die „Phage Shock“ Antwort induziert (Brissette *et al.*, 1990) und andererseits Proteine denaturiert und somit die Hitzeschockantwort induziert (Neidhardt *et al.*, 1984). In *S. pneumoniae* wurde ebenfalls eine LiaSR-abhängige Induktion des Gens für das Chaperon GrpE und dessen zugehörigen Repressor HrcA beobachtet, die für diesen Organismus für die Hitze- und Säuretoleranz wichtig sind (Eldholm *et al.*, 2010, Lemos *et al.*, 2001).

(F) In der Gruppe F sind mehrere Gene für hypothetische Proteine, darunter auch hypothetische Membranproteine, zusammengefasst, die durch das EsrSR-System reguliert sind. Nur für zwei der Proteine existieren Studien anhand derer über eine mögliche Funktion der Proteine Vermutungen angestellt werden können. In diesen Studien wurden Proteine untersucht, die die gleichen Domänen aufweisen wie die hier regulierten hypothetischen Proteine oder Homologien zu ihnen aufweisen. Dabei handelt es sich zum einen um das Protein Cg2684, das zur DedA-Proteinfamilie gehört und zum zweiten um das Protein Cg1325, das eine PspC-Domäne besitzt. Die Familie der DedA-Proteine ist noch nicht genau funktionell charakterisiert. Studien in *E. coli* weisen jedoch auf eine Beteiligung an Zellteilung und Zusammensetzung der Cytoplasmamembran hin, wobei der Einfluss auf die Zellteilung ein sekundärer Effekt sein könnte (Thompkins *et al.*, 2008, Sikdar & Doerrler, 2010). In *Mycobacterium smegmatis* konnte die Überexpression des Gens BCG2664 aus *M. bovis*, das ebenfalls als *dedA* Gen annotiert ist, die minimale inhibitorische Konzentration für die antimycobakterielle Substanz Halicycliclin A erhöhen (Arai *et al.*, 2011). Die Autoren vermuteten, dass Halicycliclin A möglicherweise durch Inhibition des Proteins BCG2664 der DedA-Familie die Zellhüllenbiogenese und -erhaltung beeinträchtigen könnte. Eine analoge Funktion von Cg2684 würde die Rolle des EsrSR-Systems als Zellhüllenschutzsystem unterstreichen. Cg1325, das Protein mit PspC-Domäne, könnte analog zu PspC aus *E. coli* an der Reizwahrnehmung zur Induktion des EsrSR-Systems beteiligt sein (Brissette *et al.*, 1991, Weiner *et al.*, 1991). In *S. pneumoniae* ist ein Protein mit PspC-Domäne hingegen am Schutz gegen Fratrizid-induzierte Autolyse beteiligt und in *Yersinia enterocolitica*, das ein ähnliches „Phage Shock“-System wie *E. coli* besitzt, wurde gezeigt, dass PspC der toxischen Membranpermeabilität aufgrund falsch lokalisierter Sekretine entgegenwirkt (Eldholm *et al.*, 2010, Horstman & Darwin, 2012). Dies deutet auf eine Funktion der jeweiligen PspC-Proteine beim Schutz der Zellhülle oder Zellmembran hin.

2.2.3 Fazit – ist das EsrSR-System ein „Phage Shock“-System?

Wie das Lia-System aus *B. subtilis* und das „Phage Shock“-System aus *E. coli* kann das EsrSR-System durch Sec-abhängig sekretierte Proteine induziert werden. Als weitere Gemeinsamkeit werden Gene für Proteine mit PspC-Domäne und PspA-Domäne reguliert. Proteine mit PspC-Domäne wie die Sensorkinase EsrS oder der Repressor EsrI sind mit großer Wahrscheinlichkeit wie PspC in *E. coli* an der Reizwahrnehmung beteiligt (Brissette *et al.*, 1991, Weiner *et al.*, 1991). Allerdings bildet das PspA-Protein RsmP Filamente und nicht ringförmige Multimere wie die PspA-Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis* (Fiuza *et al.*, 2010, Hankamer *et al.*, 2004, Wolf *et al.*, 2010). Ob es sich bei dem Zweikomponentensystem EsrSR und seinen Zielgenen um das Pendant der „Phage Shock“ Antwort in *C. glutamicum* handelt, hängt davon ab wie die „Phage Shock“ Antwort definiert wird. Wenn diese zur Induktion eines PspA-Proteins führt, das die Zellhülle stabilisiert und ringförmige Multimere wie die PspA-Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis* bildet, ist das EsrSR-Systeme kein „Phage Shock“-System. Wenn ein „Phage Shock“ System jedoch allgemein zur Stabilisierung der Zellhülle führt, handelt es sich aufgrund der Induktion von RsmP, das der Zelle Stabilität verleiht, aufgrund der Repression des Gens für NlpC, das als Zellwandpeptidase die Zellwand destabilisieren kann, und aufgrund dem Beitrag zur Toleranz von Bacitracin bei EsrSR, wie auch bei allen anderen Lia-ähnlichen Zellhüllenschutzsystemen, um ein „Phage Shock“ System.

Da das Zweikomponentensystem EsrSR auch durch die Sec-abhängige Sekretion von Proteinen induziert werden kann, könnte die Deletion oder Überexpression möglicherweise auch die Ausbeute an sekretiertem Protein beeinflussen und somit biotechnologisch genutzt werden. In Übereinstimmung hiermit konnte das Wissen über die Zellhüllenschutzproteine PspA aus *E. coli* und *S. lividans* (DeLisa *et al.*, 2004, Aldor *et al.*, 2005, Vrancken *et al.*, 2007) und das Zellhüllenschutzsystem CssRS aus *B. subtilis* (Zweers *et al.*, 2009) bereits zur Steigerung der Ausbeute von sekretierten Proteinen oder Membranproteinen genutzt werden. Das EsrSR-System ist daher ein vielversprechender Ansatzpunkt zur gezielten Optimierung der Sec-abhängigen Proteinsekretion heterologer Proteine in *C. glutamicum*.

VII. Literatur

- Abé, S., K.-I. Takayama & S. Kinoshita, (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **13**: 279-301.
- Alami, M., I. Lüke, S. Deitermann, G. Eisner, H. G. Koch, J. Brunner & M. Müller, (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular cell* **12**: 937-946.
- Aldor, I. S., D. C. Krawitz, W. Forrest, C. Chen, J. C. Nishihara, J. C. Joly & K. M. Champion, (2005) Proteomic profiling of recombinant *Escherichia coli* in high-cell-density fermentations for improved production of an antibody fragment biopharmaceutical. *Applied and environmental microbiology* **71**: 1717-1728.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**: 403-410.
- Alvarez-Morales, A., R. Dixon & M. Merrick, (1984) Positive and negative control of the *glnA ntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. *The EMBO journal* **3**: 501-507.
- amfep, (2009) LIST OF ENZYMES OCTOBER 2009. www.amfep.org.
- Arai, M., L. Liu, T. Fujimoto, A. Setiawan & M. Kobayashi, (2011) DedA protein relates to action-mechanism of halicyclamine A, a marine spongean macrocyclic alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. *Marine drugs* **9**: 984-993.
- Arnau, J., C. Lauritzen, G. E. Petersen & J. Pedersen, (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification* **48**: 1-13.
- Bachmann, J., B. Bauer, K. Zwicker, B. Ludwig & O. Anderka, (2006) The Rieske protein from *Paracoccus denitrificans* is inserted into the cytoplasmic membrane by the twin-arginine translocase. *The FEBS journal* **273**: 4817-4830.
- Bageshwar, U. K., N. Whitaker, F. C. Liang & S. M. Musser, (2009) Interconvertibility of lipid- and translocon-bound forms of the bacterial Tat precursor pre-Sufl. *Molecular microbiology* **74**: 209-226.
- Bailey, T. L. & C. Elkan, (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* **2**: 28-36.
- Barreiro, C., E. González-Lavado, S. Brand, A. Tauch & J. F. Martín, (2005) Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensable chaperone. *Journal of bacteriology* **187**: 884-889.
- Barreiro, C., E. González-Lavado, M. Pátek & J.-F. Martín, (2004) Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *Journal of bacteriology* **186**: 4813-4817.
- Berghöfer, J. & R. B. Klösgen, (1999) Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Δ ph) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS letters* **460**: 328-332.

- Berks, B. C., (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Molecular microbiology* **22**: 393-404.
- Bernstein, H. D. & J. B. Hyndman, (2001) Physiological basis for conservation of the signal recognition particle targeting pathway in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **183**: 2187-2197.
- Beswick, P. H., G. H. Hall, A. J. Hook, K. Little, D. C. McBrien & K. A. Lott, (1976) Copper toxicity: evidence for the conversion of cupric to cuprous copper in vivo under anaerobic conditions. *Chemico-biological interactions* **14**: 347-356.
- Betts, J. C., P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam & K. Duncan, (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular microbiology* **43**: 717-731.
- Billman-Jacobe, H., L. Wang, A. Kortt, D. Stewart & A. Radford, (1995) Expression and secretion of heterologous proteases by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and environmental microbiology* **61**: 1610-1613.
- Binder, S., G. Schendzielorz, N. Stäbler, K. Krumbach, K. Hoffmann, M. Bott & L. Eggeling, (2012) A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. *Genome biology* **13**: R40.
- Blaudeck, N., P. Kreutzenbeck, R. Freudl & G. A. Sprenger, (2003) Genetic analysis of pathway specificity during posttranslational protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Journal of bacteriology* **185**: 2811-2819.
- BMBF, (2012) Die Deutsche Biotechnologie-Branche 2012. *Bundesministerium für Umwelt und Forschung*, www.biotechnologie.de.
- Bochkareva, E., A. Seluanov, E. Bibi & A. Girshovich, (1996) Chaperonin-promoted post-translational membrane insertion of a multispinning membrane protein lactose permease. *The Journal of biological chemistry* **271**: 22256-22261.
- Bochkareva, E. S., N. M. Lissin & A. S. Girshovich, (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* **336**: 254-257.
- Bott, M. & M. Bocker, (2012) Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Applied microbiology and biotechnology* **94**: 1131-1150.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Brazma, A., P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, T. Gaasterland, P. Glenisson, F. C. Holstege, I. F. Kim, V. Markowitz, J. C. Matese, H. Parkinson, A. Robinson, U. Sarkans, S. Schulze-Kremer, J. Stewart, R. Taylor, J. Vilo & M. Vingron, (2001) Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nature genetics* **29**: 365-371.
- Bretl, D. J., C. Demetriadou & T. C. Zahrt, (2011) Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology and molecular biology reviews* **75**: 566-582.

- Brissette, J. L., M. Russel, L. Weiner & P. Model, (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 862-866.
- Brissette, J. L., L. Weiner, T. L. Ripmaster & P. Model, (1991) Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *Journal of molecular biology* **220**: 35-48.
- Brocker, M., (2006) MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum*. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Brocker, M., C. Mack & M. Bott, (2011) Target genes, consensus binding site, and role of phosphorylation for the response regulator MtrA of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* **193**: 1237-1249.
- Brockmeier, U., M. Caspers, R. Freudl, A. Jockwer, T. Noll & T. Eggert, (2006) Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. *Journal of molecular biology* **362**: 393-402.
- Brundage, L., J. P. Hendrick, E. Schiebel, A. J. Driessen & W. Wickner, (1990) The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**: 649-657.
- Brune, I., H. Werner, A. T. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler & A. Tauch, (2006) The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **7**: 21.
- Brüser, T. & C. Sanders, (2003) An alternative model of the twin arginine translocation system. *Microbiological research* **158**: 7-17.
- Bukau, B., (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Molecular microbiology* **9**: 671-680.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez & J. M. Short, (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-379.
- Busche, T., R. Silar, M. Picmanova, M. Patek & J. Kalinowski, (2012) Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **13**: 445.
- Cabiscol, E., J. Tamarit & J. Ros, (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology: the official Journal of the Spanish Society for Microbiology* **3**: 3-8.
- Calhoun, L. N. & Y. M. Kwon, (2011) Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *Journal of applied microbiology* **110**: 375-386.
- Carlioz, A. & D. Touati, (1986) Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *The EMBO journal* **5**: 623-630.

- Chaba, R., B. M. Alba, M. S. Guo, J. Sohn, N. Ahuja, R. T. Sauer & C. A. Gross, (2011) Signal integration by DegS and RseB governs the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 2106-2111.
- Chaddock, A. M., A. Mant, I. Karnauchov, S. Brink, R. G. Herrmann, R. B. Klösgen & C. Robinson, (1995) A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *The EMBO journal* **14**: 2715-2722.
- Chang, C. N., G. Blobel & P. Model, (1978) Detection of prokaryotic signal peptidase in an *Escherichia coli* membrane fraction: endoproteolytic cleavage of nascent f1 pre-coat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 361-365.
- Chillappagari, S., M. Miethke, H. Trip, O. P. Kuipers & M. A. Marahiel, (2009) Copper acquisition is mediated by YcnJ and regulated by YcnK and CsoR in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **191**: 2362-2370.
- Chirico, W. J., M. G. Waters & G. Blobel, (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**: 805-810.
- Clausen, T., M. Kaiser, R. Huber & M. Ehrmann, (2011) HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**: 152-162.
- Cline, K. & H. Mori, (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *The Journal of cell biology* **154**: 719-729.
- Cohen, S. N., A. C. Chang & L. Hsu, (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 2110-2114.
- Collado-Vides, J., B. Magasanik & J. D. Gralla, (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **55**: 371-394.
- Costa-Riu, N., E. Maier, A. Burkovski, R. Krämer, F. Lottspeich & R. Benz, (2003) Identification of an anion-specific channel in the cell wall of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular microbiology* **50**: 1295-1308.
- Cramer, A., E. A. Whitehorn, E. Tate & W. P. Stemmer, (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature biotechnology* **14**: 315-319.
- Creighton, A. M., A. Hulford, A. Mant, D. Robinson & C. Robinson, (1995) A monomeric, tightly folded stromal intermediate on the delta pH-dependent thylakoidal protein transport pathway. *The Journal of biological chemistry* **270**: 1663-1669.
- Daffé, M., M. McNeil & P. J. Brennan, (1993) Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydrate research* **249**: 383-398.

- Danese, P. N., W. B. Snyder, C. L. Cosma, L. J. Davis & T. J. Silhavy, (1995) The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes & development* **9**: 387-398.
- de Marco, A., E. Deuerling, A. Mogk, T. Tomoyasu & B. Bukau, (2007) Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC biotechnology* **7**: 32.
- DeLisa, M. P., P. Lee, T. Palmer & G. Georgiou, (2004) Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *Journal of bacteriology* **186**: 366-373.
- Demain, A. L. & P. Vaishnav, (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* **27**: 297-306.
- Deshaies, R. J., B. D. Koch, M. Werner-Washburne, E. A. Craig & R. Schekman, (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**: 800-805.
- Dintner, S., A. Staron, E. Berchtold, T. Petri, T. Mascher & S. Gebhard, (2011) Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in *Firmicutes* Bacteria. *Journal of bacteriology* **193**: 3851-3862.
- Djoko, K. Y., Z. Xiao, D. L. Huffman & A. G. Wedd, (2007) Conserved mechanism of copper binding and transfer. A comparison of the copper-resistance proteins PcoC from *Escherichia coli* and CopC from *Pseudomonas syringae*. *Inorganic chemistry* **46**: 4560-4568.
- Driessen, A. J., (2001) SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends in microbiology* **9**: 193-196.
- du Plessis, D. J., N. Nouwen & A. J. Driessen, (2011) The Sec translocase. *Biochimica et biophysica acta* **1808**: 851-865.
- Dubini, A. & F. Sargent, (2003) Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS letters* **549**: 141-146.
- Dudoit, S. & Y. H. Yang, (2003) Bioconductor R packages for exploratory analysis and normalization of cDNA microarray data. In: *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software*. G. Parmigiani, E. S. Garrett, R. A. Irizarry & S. L. Zeger (eds). New York: Springer, pp. 73-101.
- Dussurget, O., M. Rodriguez & I. Smith, (1996) An *ideR* mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative-stress response. *Molecular microbiology* **22**: 535-544.
- Eikmanns, B. J., N. Thum-Schmitz, L. Eggeling, K. U. Lüdtkke & H. Sahm, (1994) Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-1828.
- Eldholm, V., B. Gutt, O. Johnsborg, R. Brückner, P. Maurer, R. Hakenbeck, T. Mascher & L. S. Havarstein, (2010) The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *Journal of bacteriology* **192**: 1761-1773.

- Erickson, J. W. & C. A. Gross, (1989) Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes & development* **3**: 1462-1471.
- Erill, I., S. Campoy & J. Barbé, (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS microbiology reviews* **31**: 637-656.
- Facey, S. J. & A. Kuhn, (2010) Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cellular and molecular life sciences* **67**: 2343-2362.
- Faulkner, M. J. & J. D. Helmann, (2011) Peroxide stress elicits adaptive changes in bacterial metal ion homeostasis. *Antioxidants & redox signaling* **15**: 175-189.
- Faulkner, M. J., Z. Ma, M. Fuangthong & J. D. Helmann, (2012) Derepression of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide stress response leads to iron deficiency. *Journal of bacteriology* **194**: 1226-1235.
- Ferrari, E., A. S. Jarnagin & B. F. Schmidt, (1993) Commercial Production of Extracellular Enzymes. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick (eds). Washington, DC.: American Society for Microbiology, pp. 917-937.
- Ferrer-Miralles, N., J. Domingo-Espín, J. L. Corchero, E. Vázquez & A. Villaverde, (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories* **8**: 17.
- Fiuza, M., M. Letek, J. Leiba, A. F. Villadangos, J. Vaquera, I. Zanella-Cléon, L. M. Mateos, V. Molle & J. A. Gil, (2010) Phosphorylation of a novel cytoskeletal protein (RsmP) regulates rod-shaped morphology in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 29387-29397.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans & E. P. Greenberg, (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* **176**: 269-275.
- Gao, R. & A. M. Stock, (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology* **63**: 133-154.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel & A. Bairoch, (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research* **31**: 3784-3788.
- Goerlich, O., P. Quillardet & M. Hofnung, (1989) Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology* **171**: 6141-6147.
- Goff, S. A., L. P. Casson & A. L. Goldberg, (1984) Heat shock regulatory gene *htpR* influences rates of protein degradation and expression of the *lon* gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 6647-6651.
- Goff, S. A. & A. L. Goldberg, (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41**: 587-595.
- Gottesman, S., (1990) Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. *Methods in enzymology* **185**: 119-129.
- Goyal, K., R. Qamra & S. C. Mande, (2006) Multiple gene duplication and rapid evolution in the *groEL* gene: functional implications. *Journal of molecular evolution* **63**: 781-787.

- Grass, G. & C. Rensing, (2001) CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* **286**: 902-908.
- Graubner, W., A. Schierhorn & T. Brüser, (2007) DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *The Journal of biological chemistry* **282**: 7116-7124.
- Gunther, M. R., P. M. Hanna, R. P. Mason & M. S. Cohen, (1995) Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study. *Archives of biochemistry and biophysics* **316**: 515-522.
- Hankamer, B. D., S. L. Elderkin, M. Buck & J. Nield, (2004) Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring. *The Journal of biological chemistry* **279**: 8862-8866.
- Harwood, C. R. & R. Cranenburgh, (2008) *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends in microbiology* **16**: 73-79.
- Hasselblatt, H., R. Kurzbauer, C. Wilken, T. Krojer, J. Sawa, J. Kurt, R. Kirk, S. Hasenbein, M. Ehrmann & T. Clausen, (2007) Regulation of the σ^E stress response by DegS: how the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress. *Genes & development* **21**: 2659-2670.
- Haußmann, U., S. W. Qi, D. Wolters, M. Rögner, S. J. Liu & A. Poetsch, (2009) Physiological adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to benzoate as alternative carbon source - a membrane proteome-centric view. *Proteomics* **9**: 3635-3651.
- He, H., R. Hovey, J. Kane, V. Singh & T. C. Zahrt, (2006) MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology* **188**: 2134-2143.
- He, H. & T. C. Zahrt, (2005) Identification and characterization of a regulatory sequence recognized by *Mycobacterium tuberculosis* persistence regulator MprA. *Journal of bacteriology* **187**: 202-212.
- Heim, R., D. C. Prasher & R. Y. Tsien, (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12501-12504.
- Henke, J. M. & B. L. Bassler, (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* **186**: 6902-6914.
- Henle, E. S., Z. Han, N. Tang, P. Rai, Y. Luo & S. Linn, (1999) Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *The Journal of biological chemistry* **274**: 962-971.
- Hesketh, A., C. Hill, J. Mokhtar, G. Novotna, N. Tran, M. Bibb & H. J. Hong, (2011) Genome-wide dynamics of a bacterial response to antibiotics that target the cell envelope. *BMC Genomics* **12**: 226.
- Higgins, D. & J. Dworkin, (2012) Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS microbiology reviews* **36**: 131-148.

- Hinsley, A. P., N. R. Stanley, T. Palmer & B. C. Berks, (2001) A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS letters* **497**: 45-49.
- Hoffelder, M., K. Raasch, J. van Ooyen & L. Eggeling, (2010) The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *Journal of bacteriology* **192**: 5203-5211.
- Hoffmann, C., A. Leis, M. Niederweis, J. M. Plitzko & H. Engelhardt, (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3963-3967.
- Hoffmann, F. & U. Rinas, (2004) Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **89**: 143-161.
- Horstman, N. K. & A. J. Darwin, (2012) Phage shock proteins B and C prevent lethal cytoplasmic membrane permeability in *Yersinia enterocolitica*. *Molecular microbiology* **85**: 445-460.
- Horwich, A. L., A. C. Apetri & W. A. Fenton, (2009) The GroEL/GroES cis cavity as a passive anti-aggregation device. *FEBS letters* **583**: 2654-2662.
- Horwich, A. L., K. B. Low, W. A. Fenton, I. N. Hirshfield & K. Furtak, (1993) Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* **74**: 909-917.
- Hou, B. & T. Brüser, (2011) The Tat-dependent protein translocation pathway. *BioMolecular Concepts* **2**: 507-523.
- Hou, B., S. Frielingsdorf & R. B. Klösgen, (2006) Unassisted membrane insertion as the initial step in DeltapH/Tat-dependent protein transport. *Journal of molecular biology* **355**: 957-967.
- Houry, W. A., D. Frishman, C. Eckerskorn, F. Lottspeich & F. U. Hartl, (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**: 147-154.
- Hunke, S. & J. M. Betton, (2003) Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **50**: 1579-1589.
- Hunke, S., R. Keller & V. S. Müller, (2012) Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett* **326**: 12-22.
- Hutchings, M. I., H. J. Hong, E. Leibovitz, I. C. Sutcliffe & M. J. Buttner, (2006) The σ^E cell envelope stress response of *Streptomyces coelicolor* is influenced by a novel lipoprotein, CseA. *Journal of bacteriology* **188**: 7222-7229.
- Hyryläinen, H.-L., M. Sarvas & V. P. Kontinen, (2005) Transcriptome analysis of the secretion stress response of *Bacillus subtilis*. *Applied microbiology and biotechnology* **67**: 389-396.
- Hyryläinen, H. L., A. Bolhuis, E. Darmon, L. Muukkonen, P. Koski, M. Vitikainen, M. Sarvas, Z. Prágai, S. Bron, J. M. van Dijl & V. P. Kontinen, (2001) A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Molecular microbiology* **41**: 1159-1172.

- Ikeda, M. & S. Nakagawa, (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology* **62**: 99-109.
- Imlay, J. A., (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology* **57**: 395-418.
- Imlay, J. A., S. M. Chin & S. Linn, (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240**: 640-642.
- Iwanczyk, J., D. Damjanovic, J. Kooistra, V. Leong, A. Jomaa, R. Ghirlando & J. Ortega, (2007) Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein. *Journal of bacteriology* **189**: 3176-3186.
- Ize, B., I. Porcelli, S. Lucchini, J. C. Hinton, B. C. Berks & T. Palmer, (2004) Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *The Journal of biological chemistry* **279**: 47543-47554.
- Ize, B., N. R. Stanley, G. Buchanan & T. Palmer, (2003) Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Molecular microbiology* **48**: 1183-1193.
- Jäger, W., A. Schäfer, A. Pühler, G. Labes & W. Wohlleben, (1992) Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology* **174**: 5462-5465.
- Jochmann, N., A. K. Kurze, L. F. Czaja, K. Brinkrolf, I. Brune, A. T. Hüser, N. Hansmeier, A. Pühler, I. Borovok & A. Tauch, (2009) Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays. *Microbiology* **155**: 1459-1477.
- Joliff, G., L. Mathieu, V. Hahn, N. Bayan, F. Duchiron, M. Renaud, E. Schechter & 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. *Molecular microbiology* **6**: 2349-2362.
- Joly, N., C. Engl, G. Jovanovic, M. Huvet, T. Toni, X. Sheng, M. P. Stumpf & M. Buck, (2010) Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology. *FEMS microbiology reviews* **34**: 797-827.
- Jones, C. H., P. N. Danese, J. S. Pinkner, T. J. Silhavy & S. J. Hultgren, (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *The EMBO journal* **16**: 6394-6406.
- Jong, W. S., C. M. ten Hagen-Jongman, P. Genevaux, J. Brunner, B. Oudega & J. Luirink, (2004) Trigger factor interacts with the signal peptide of nascent Tat substrates but does not play a critical role in Tat-mediated export. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**: 4779-4787.
- Jongbloed, J. D., U. Grieger, H. Antelmann, M. Hecker, R. Nijland, S. Bron & J. M. van Dijl, (2004) Two minimal Tat translocases in *Bacillus*. *Molecular microbiology* **54**: 1319-1325.

- Jordan, S., A. Junker, J. D. Helmann & T. Mascher, (2006) Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *Journal of bacteriology* **188**: 5153-5166.
- Jovanovic, G., L. Weiner & P. Model, (1996) Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *Journal of bacteriology* **178**: 1936-1945.
- Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Möckel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegräbe & A. Tauch, (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology* **104**: 5-25.
- Kang, D. G., C. S. Kim, J. H. Seo, I. G. Kim, S. S. Choi, J. H. Ha, S. W. Nam, G. Lim & H. J. Cha, (2012) Coexpression of molecular chaperone enhances activity and export of organophosphorus hydrolase in *Escherichia coli*. *Biotechnology progress* **28**: 925-930.
- Kang, D. H., Y. S. Gho, M. K. Suh & C. H. Kang, (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **23**: 1511-1512.
- Keilhauer, C., L. Eggeling & H. Sahm, (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *Journal of bacteriology* **175**: 5595-5603.
- Keller, R., J. de Keyser, A. J. Driessen & T. Palmer, (2012) Co-operation between different targeting pathways during integration of a membrane protein. *The Journal of cell biology*.
- Kikuchi, Y., M. Date, H. Itaya, K. Matsui & L. F. Wu, (2006) Functional analysis of the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Applied and environmental microbiology* **72**: 7183-7192.
- Kikuchi, Y., M. Date, K. Yokoyama, Y. Umezawa & H. Matsui, (2003) Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-Like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Applied and environmental microbiology* **69**: 358-366.
- Kikuchi, Y., H. Itaya, M. Date, K. Matsui & L. F. Wu, (2008) Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein-glutaminase using the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology* **78**: 67-74.
- Kikuchi, Y., H. Itaya, M. Date, K. Matsui & L. F. Wu, (2009) TatABC overexpression improves *Corynebacterium glutamicum* Tat-dependent protein secretion. *Applied and environmental microbiology* **75**: 603-607.

- Kinoshita, S., K. Nakayama & S. Akita, (1958) Taxonomical Study of Glutamic Acid Accumulating Bacteria, *Micrococcus glutamicus* nov. sp. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* **22**: 176-185.
- Kinoshita, S., S. Udaka & M. Shimono, (1957) Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *The Journal of general and applied microbiology* **3**: 193-205.
- Kirchner, O. & A. Tauch, (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 287-299.
- Kirk, O., T. V. Borchert & C. C. Fuglsang, (2002) Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology* **13**: 345-351.
- Kleerebezem, M., W. Crielaard & J. Tommassen, (1996) Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *The EMBO journal* **15**: 162-171.
- Kleerebezem, M. & J. Tommassen, (1993) Expression of the *pspA* gene stimulates efficient protein export in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **7**: 947-956.
- Kleine, B., (nicht veröffentlicht).
- Kleine, B., A. Chattopadhyay, M. Brocker, T. Polen, T. Mascher & R. Freudl, (in Vorbereitung) The two component system EsrSR in *Corynebacterium glutamicum* combats envelope stress.
- Kobayashi, N., K. Nishino & A. Yamaguchi, (2001) Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **183**: 5639-5644.
- Kobayashi, R., T. Suzuki & M. Yoshida, (2007) *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Molecular microbiology* **66**: 100-109.
- Kocan, M., S. Schaffer, T. Ishige, U. Sorger-Herrmann, V. F. Wendisch & M. Bott, (2006) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *Journal of bacteriology* **188**: 724-732.
- Koch-Koerfges, A., (2011) Novel insights into the energy metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by comprehensive analysis of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Koch-Koerfges, A., A. Kabus, I. Ochrombel, K. Marin & M. Bott, (2012) Physiology and global gene expression of a *Corynebacterium glutamicum* DeltaF(1)F(O)-ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* **1817**: 370-380.
- Koch, D. J., C. Rückert, A. Albersmeier, A. T. Hüser, A. Tauch, A. Pühler & J. Kalinowski, (2005) The transcriptional regulator SsuR activates expression of the *Corynebacterium glutamicum* sulphonate utilization genes in the absence of sulphate. *Molecular microbiology* **58**: 480-494.
- Korber, P., J. M. Stahl, K. H. Nierhaus & J. C. Bardwell, (2000) Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *The EMBO journal* **19**: 741-748.

- Kouwen, T. R., A. K. Nielsen, E. L. Denham, J. Y. Dubois, R. Dorenbos, M. D. Rasmussen, W. J. Quax, R. Freudl & J. M. van Dijl, (2010) Contributions of the pre- and pro-regions of a *Staphylococcus hyicus* lipase to secretion of a heterologous protein by *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* **76**: 659-669.
- Kreutzenbeck, P., (2004) Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli*. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Krojer, T., J. Sawa, E. Schäfer, H. R. Saibil, M. Ehrmann & T. Clausen, (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**: 885-890.
- Krömer, J. O., C. J. Bolten, E. Heinzle, H. Schröder & C. Wittmann, (2008) Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiology* **154**: 3917-3930.
- Kulp, A. & M. J. Kuehn, (2011) Recognition of beta-strand motifs by RseB is required for σ^E activity in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **193**: 6179-6186.
- Kumamoto, C. A. & J. Beckwith, (1983) Mutations in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **154**: 253-260.
- Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori & K. Hiramatsu, (2003) Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* **49**: 807-821.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larisch, C., D. Nakunst, A. T. Hüser, A. Tauch & J. Kalinowski, (2007) The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genomics* **8**: 4.
- Lausberg, F., A. R. Chattopadhyay, A. Heyer, L. Eggeling & R. Freudl, (2012) A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. *Plasmid* **68**: 142-147.
- Leblanc, S. K., C. W. Oates & T. L. Raivio, (2011) Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **193**: 3367-3375.
- Lemaux, P. G., S. L. Herendeen, P. L. Bloch & F. C. Neidhardt, (1978) Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell* **13**: 427-434.
- Lemos, J. A., Y. Y. Chen & R. A. Burne, (2001) Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* **183**: 6074-6084.

- Létoffe, S., G. Heuck, P. Delepelaire, N. Lange & C. Wandersman, (2009) Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 11719-11724.
- Leuchtenberger, W., K. Huthmacher & K. Drauz, (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* **69**: 1-8.
- Li, W., Y. Xin, M. R. McNeil & Y. Ma, (2006) *rmlB* and *rmlC* genes are essential for growth of *mycobacteria*. *Biochemical and biophysical research communications* **342**: 170-178.
- Liebl, W., A. J. Sinskey & K. H. Schleifer, (1992) Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* **174**: 1854-1861.
- Lill, R., K. Cunningham, L. A. Brundage, K. Ito, D. Oliver & W. Wickner, (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **8**: 961-966.
- Link, A. J., D. Phillips & G. M. Church, (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *Journal of bacteriology* **179**: 6228-6237.
- Lipinska, B., O. Fayet, L. Baird & C. Georgopoulos, (1989) Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *Journal of bacteriology* **171**: 1574-1584.
- Lipinska, B., S. Sharma & C. Georgopoulos, (1988) Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic acids research* **16**: 10053-10067.
- Luirink, J., S. High, H. Wood, A. Giner, D. Tollervy & B. Dobberstein, (1992) Signal-sequence recognition by an *Escherichia coli* ribonucleoprotein complex. *Nature* **359**: 741-743.
- Luirink, J., C. M. ten Hagen-Jongman, C. C. van der Weijden, B. Oudega, S. High, B. Dobberstein & R. Kusters, (1994) An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *The EMBO journal* **13**: 2289-2296.
- Lukat, G. S., W. R. McCleary, A. M. Stock & J. B. Stock, (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 718-722.
- Macomber, L. & J. A. Imlay, (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 8344-8349.
- MacRitchie, D. M., D. R. Buelow, N. L. Price & T. L. Raivio, (2008) Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **631**: 80-110.
- Magasanik, B., (1988) Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trends in biochemical sciences* **13**: 475-479.

- Magasanik, B., (2000) Global regulation of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 14044-14045.
- Manganelli, R., M. I. Voskuil, G. K. Schoolnik & I. Smith, (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor σ^E : role in global gene expression and survival in macrophages. *Molecular microbiology* **41**: 423-437.
- Marciniak, B. C., H. Trip, P. J. van-der Veeke & O. P. Kuipers, (2012) Comparative transcriptional analysis of *Bacillus subtilis* cells overproducing either secreted proteins, lipoproteins or membrane proteins. *Microbial cell factories* **11**: 66.
- Martínez, B., A. L. Zomer, A. Rodríguez, J. Kok & O. P. Kuipers, (2007) Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR. *Molecular microbiology* **64**: 473-486.
- Mascher, T., (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS microbiology letters* **264**: 133-144.
- Mascher, T., N. G. Margulis, T. Wang, R. W. Ye & J. D. Helmann, (2003) Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular microbiology* **50**: 1591-1604.
- Mascher, T., S. L. Zimmer, T. A. Smith & J. D. Helmann, (2004) Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2888-2896.
- Mattanovich, D., P. Branduardi, L. Dato, B. Gasser, M. Sauer & D. Porro, (2012) Recombinant protein production in yeasts. *Methods in molecular biology* **824**: 329-358.
- McCallum, N., P. S. Meier, R. Heusser & B. Berger-Bächi, (2011) Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**: 1391-1402.
- McCleary, W. R. & J. B. Stock, (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *The Journal of biological chemistry* **269**: 31567-31572.
- Mecsas, J., P. E. Rouviere, J. W. Erickson, T. J. Donohue & C. A. Gross, (1993) The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & development* **7**: 2618-2628.
- Meißner, D., (2005) Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Meissner, D., A. Vollstedt, J. M. van Dijl & R. Freudl, (2007) Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* **76**: 633-642.

- Miller, J. H., (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold-Spring-Harbor, NY.
- Milse, J., (nicht veröffentlicht) Dissertation über den Regulator OxyR aus *C. glutamicum* an der Universität Bielefeld unter Betreuung von J. Kalinowski.
- Milstein, C., G. G. Brownlee, T. M. Harrison & M. B. Mathews, (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature: New biology* **239**: 117-120.
- Mogk, A., T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Röder, H. Langen & B. Bukau, (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO journal* **18**: 6934-6949.
- Molik, S., I. Karnauchov, C. Weidlich, R. G. Herrmann & R. B. Klösgen, (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *The Journal of biological chemistry* **276**: 42761-42766.
- Mori, H. & K. Cline, (2002) A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid Δ pH/Tat translocase. *The Journal of cell biology* **157**: 205-210.
- Müller, S., (nicht veröffentlicht) Dissertation.
- Musser, S. M. & S. M. Theg, (2000) Characterization of the early steps of OE17 precursor transport by the thylakoid DeltapH/Tat machinery. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 2588-2598.
- Nakunst, D., C. Larisch, A. T. Hüser, A. Tauch, A. Pühler & J. Kalinowski, (2007) The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes. *Journal of bacteriology* **189**: 4696-4707.
- Natale, P., T. Brüser & A. J. Driessen, (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane - distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1778**: 1735-1756.
- Neidhardt, F. C., R. A. VanBogelen & V. Vaughn, (1984) The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annual review of genetics* **18**: 295-329.
- Niebisch, A. & M. Bott, (2001) Molecular analysis of the cytochrome *bc*₁-*aa*₃ branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c*₁. *Archives of microbiology* **175**: 282-294.
- Noone, D., A. Howell, R. Collery & K. M. Devine, (2001) YkdA and YvtA, HtrA-like serine proteases in *Bacillus subtilis*, engage in negative autoregulation and reciprocal cross-regulation of ykdA and yvtA gene expression. *J Bacteriol* **183**: 654-663.
- Ogino, H., H. Teramoto, M. Inui & H. Yukawa, (2008) DivS, a novel SOS-inducible cell-division suppressor in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular microbiology* **67**: 597-608.
- Oram, D. M., A. Avdalovic & R. K. Holmes, (2002) Construction and characterization of transposon insertion mutations in *Corynebacterium diphtheriae* that affect expression of the diphtheria toxin repressor (DtxR). *Journal of bacteriology* **184**: 5723-5732.
- Oresnik, I. J., C. L. Ladner & R. J. Turner, (2001) Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Molecular microbiology* **40**: 323-331.

- Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale & T. V. O'Halloran, (2001) The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 30670-30677.
- Oxender, D. L., J. J. Anderson, C. J. Daniels, R. Landick, R. P. Gunsalus, G. Zurawski & C. Yanofsky, (1980) Amino-terminal sequence and processing of the precursor of the leucine-specific binding protein, and evidence for conformational differences between the precursor and the mature form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 2005-2009.
- Pahel, G., D. M. Rothstein & B. Magasanik, (1982) Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **150**: 202-213.
- Pallen, M. J. & B. W. Wren, (1997) The HtrA family of serine proteases. *Molecular microbiology* **26**: 209-221.
- Pang, X., P. Vu, T. F. Byrd, S. Ghanny, P. Soteropoulos, G. V. Mukamolova, S. Wu, B. Samten & S. T. Howard, (2007) Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an *mprAB* deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **153**: 1229-1242.
- Paradis, F. W., R. A. Warren, D. G. Kilburn & R. C. Miller, Jr., (1987) The expression of *Cellulomonas fimi* cellulase genes in *Brevibacterium lactofermentum*. *Gene* **61**: 199-206.
- Parsell, D. A. & R. T. Sauer, (1989) Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes & development* **3**: 1226-1232.
- Pátek, M. & J. Nesvera, (2011) Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **154**: 101-113.
- Pátek, M., J. Nesvera, A. Guyonvarch, O. Reyes & G. Leblon, (2003) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 311-323.
- Pauling, J., R. Rottger, A. Tauch, V. Azevedo & J. Baumbach, (2012) CoryneRegNet 6.0--Updated database content, new analysis methods and novel features focusing on community demands. *Nucleic acids research* **40**: D610-614.
- Pérez-Rodríguez, R., A. C. Fisher, J. D. Perlmutter, M. G. Hicks, A. Chanal, C. L. Santini, L. F. Wu, T. Palmer & M. P. DeLisa, (2007) An essential role for the DnaK molecular chaperone in stabilizing over-expressed substrate proteins of the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Journal of molecular biology* **367**: 715-730.
- Perry, J. A., C. M. Lévesque, P. Suntharalingam, R. W. Mair, M. Bu, R. T. Cline, S. N. Peterson & D. G. Cvitkovitch, (2008) Involvement of *Streptococcus mutans* regulator RR11 in oxidative stress response during biofilm growth and in the development of genetic competence. *Letters in applied microbiology* **47**: 439-444.
- Petersohn, A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Völker & M. Hecker, (2001) Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **183**: 5617-5631.
- Phillips, G. J. & T. J. Silhavy, (1990) Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*. *Nature* **344**: 882-884.

- Pietiäinen, M., M. Gardemeister, M. Mecklin, S. Leskelä, M. Sarvas & V. P. Kontinen, (2005) Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* **151**: 1577-1592.
- Polen, T., (2012, nicht publiziert) Tiling Viewer (Software).
- Polen, T., (nicht publiziert) Chiphandling (Software).
- Polen, T. & V. F. Wendisch, (2004) Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Applied biochemistry and biotechnology* **118**: 215-232.
- Poritz, M. A., H. D. Bernstein, K. Strub, D. Zopf, H. Wilhelm & P. Walter, (1990) An *E. coli* ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. *Science* **250**: 1111-1117.
- Prickril, B. C., M. H. Czechowski, A. E. Przybyla, H. D. Peck, Jr. & J. LeGall, (1986) Putative signal peptide on the small subunit of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of bacteriology* **167**: 722-725.
- Puech, V., N. Bayan, K. Salim, G. Leblon & M. Daffe, (2000) Characterization of the *in vivo* acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Molecular microbiology* **35**: 1026-1041.
- Raffa, R. G. & T. L. Raivio, (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **45**: 1599-1611.
- Raivio, T. L., D. L. Popkin & T. J. Silhavy, (1999) The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *Journal of bacteriology* **181**: 5263-5272.
- Reitzer, L. J. & B. Magasanik, (1985) Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 1979-1983.
- Rensing, C. & G. Grass, (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS microbiology reviews* **27**: 197-213.
- Rhodus, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West & C. A. Gross, (2006) Conserved and variable functions of the σ^E stress response in related genomes. *PLoS biology* **4**: e2.
- Roces, C., A. B. Campelo, P. Veiga, J. P. Pinto, A. Rodríguez & B. Martínez, (2009) Contribution of the CesR-regulated genes *lmg0169* and *lmg2164-2163* to *Lactococcus lactis* fitness. *International journal of food microbiology* **133**: 279-285.
- Rodriguez, G. M., M. I. Voskuil, B. Gold, G. K. Schoolnik & I. Smith, (2002) *ideR*, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infection and Immunity* **70**: 3371-3381.
- Rudiger, S., L. Germeroth, J. Schneider-Mergener & B. Bukau, (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *The EMBO journal* **16**: 1501-1507.
- Ruiz, N. & T. J. Silhavy, (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Current opinion in microbiology* **8**: 122-126.

- Salim, K., V. Haedens, J. Content, G. Leblon & K. Huygen, (1997) Heterologous expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding antigen 85A in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and environmental microbiology* **63**: 4392-4400.
- Salyers, A. A., J. K. Palmer & T. D. Wilkins, (1977) Laminarinase (beta-glucanase) activity in *Bacteroides* from the human colon. *Applied and environmental microbiology* **33**: 1118-1124.
- Sargent, F., U. Gohlke, E. De Leeuw, N. R. Stanley, T. Palmer, H. R. Saibil & B. C. Berks, (2001) Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**: 3361-3367.
- Schaaf, S. & M. Bott, (2007) Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* **189**: 5002-5011.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach & A. Pühler, (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scheele, S., (2012) Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum*. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Schelder, S., (2011) CopRS and CsoR: two regulatory systems involved in copper homeostasis of *Corynebacterium glutamicum*. *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Schelder, S., D. Zaade, B. Litsanov, M. Bott & M. Bocker, (2011) The two-component signal transduction system CopRS of *Corynebacterium glutamicum* is required for adaptation to copper-excess stress. *PloS one* **6**: e22143.
- Schlieker, C., B. Bukau & A. Mogk, (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *Journal of Biotechnology* **96**: 13-21.
- Schuplezow, X., (2009) Regulation der Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*. *Diplomarbeit*.
- Shalon, D., S. J. Smith & P. O. Brown, (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome research* **6**: 639-645.
- Sikdar, R. & W. T. Doerrler, (2010) Inefficient Tat-dependent export of periplasmic amidases in an *Escherichia coli* strain with mutations in two DedA family genes. *Journal of bacteriology* **192**: 807-818.
- Simonen, M. & I. Palva, (1993) Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiological reviews* **57**: 109-137.
- Skowyra, D., C. Georgopoulos & M. Zylicz, (1990) The *E. coli dnaK* gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**: 939-944.

- Smith, M. D., J. L. Flickinger, D. W. Lineberger & B. Schmidt, (1986) Protoplast transformation in coryneform bacteria and introduction of an alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* into *Brevibacterium lactofermentum*. *Applied and environmental microbiology* **51**: 634-639.
- Smyth, G. K., (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry & W. Huber (eds). New York: Springer, pp. 397-420.
- Snyder, W. B., L. J. Davis, P. N. Danese, C. L. Cosma & T. J. Silhavy, (1995) Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *Journal of bacteriology* **177**: 4216-4223.
- Spiess, C., A. Beil & M. Ehrmann, (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**: 339-347.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey & N. L. Ward-Rainey, (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *International journal of systematic bacteriology* **47**: 479-491.
- Stoscheck, C. M., (1990) Quantitation of protein. *Methods in enzymology* **182**: 50-68.
- Strauch, K. L. & J. Beckwith, (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 1576-1580.
- Strauch, K. L., K. Johnson & J. Beckwith, (1989) Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *Journal of bacteriology* **171**: 2689-2696.
- Student, (1908) The Probable Error of a Mean. *Biometrika* **6**: 1-25 (Pseudonym von W. S. Gosset).
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt, (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* **189**: 113-130.
- Sturm, A., A. Schierhorn, U. Lindenstrauss, H. Lilie & T. Brüser, (2006) YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *The Journal of biological chemistry* **281**: 13972-13978.
- Sugano, Y., (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and molecular life sciences* **66**: 1387-1403.
- Suntharalingam, P., M. D. Senadheera, R. W. Mair, C. M. Levesque & D. G. Cvitkovitch, (2009) The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* **191**: 2973-2984.
- Suzuki, N., K. Watanabe, N. Okibe, Y. Tsuchida, M. Inui & H. Yukawa, (2009) Identification of new secreted proteins and secretion of heterologous amylase by *C. glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology* **82**: 491-500.

- Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin & D. A. Natale, (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC bioinformatics* **4**: 41.
- Tatusov, R. L., E. V. Koonin & D. J. Lipman, (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**: 631-637.
- Tauch, A., I. Homann, S. Mormann, S. Rüberg, A. Billault, B. Bathe, S. Brand, O. Brockmann-Gretza, C. Rückert, N. Schischka, C. Wrenger, J. Hoheisel, B. Möckel, K. Huthmacher, W. Pfefferle, A. Pühler & J. Kalinowski, (2002) Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *Journal of Biotechnology* **95**: 25-38.
- Teramoto, H., K. Watanabe, N. Suzuki, M. Inui & H. Yukawa, (2011) High yield secretion of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using its own Tat-type signal sequence. *Applied microbiology and biotechnology* **91**: 677-687.
- Thomas, J. G., A. Ayling & F. Baneyx, (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Applied biochemistry and biotechnology* **66**: 197-238.
- Thompkins, K., B. Chattopadhyay, Y. Xiao, M. C. Henk & W. T. Doerrler, (2008) Temperature sensitivity and cell division defects in an *Escherichia coli* strain with mutations in yghB and yqjA, encoding related and conserved inner membrane proteins. *Journal of bacteriology* **190**: 4489-4500.
- Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon, (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354.
- Tsuge, Y., H. Ogino, H. Teramoto, M. Inui & H. Yukawa, (2008) Deletion of *cgR_1596* and *cgR_2070*, encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum* R. *Journal of bacteriology* **190**: 8204-8214.
- Tullman-Ercek, D., M. P. DeLisa, Y. Kawarasaki, P. Iranpour, B. Ribnicky, T. Palmer & G. Georgiou, (2007) Export pathway selectivity of *Escherichia coli* twin arginine translocation signal peptides. *The Journal of biological chemistry* **282**: 8309-8316.
- Turner, R. J., A. L. Papish & F. Sargent, (2004) Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Canadian journal of microbiology* **50**: 225-238.
- Umakoshi, M., T. Hirasawa, C. Furusawa, Y. Takenaka, Y. Kikuchi & H. Shimizu, (2011) Improving protein secretion of a transglutaminase-secreting *Corynebacterium glutamicum* recombinant strain on the basis of ¹³C metabolic flux analysis. *Journal of bioscience and bioengineering* **112**: 595-601.
- Valent, Q. A., P. A. Scotti, S. High, J. W. de Gier, G. von Heijne, G. Lentzen, W. Wintermeyer, B. Oudega & J. Lührink, (1998) The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *The EMBO journal* **17**: 2504-2512.

- van der Ploeg, R., U. Mäder, G. Homuth, M. Schaffer, E. L. Denham, C. G. Monteferrante, M. Miethke, M. A. Marahiel, C. R. Harwood, T. Winter, M. Hecker, H. Antelmann & J. M. van Dijl, (2011) Environmental salinity determines the specificity and need for Tat-dependent secretion of the YwbN protein in *Bacillus subtilis*. *PloS one* **6**: e18140.
- van der Rest, M. E., C. Lange & D. Molenaar, (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied microbiology and biotechnology* **52**: 541-545.
- Veiga, P., C. Bulbarello-Sampieri, S. Furlan, A. Maisons, M. P. Chapot-Chartier, M. Erkelenz, P. Mervelet, P. Noirot, D. Frees, O. P. Kuipers, J. Kok, A. Gruss, G. Buist & S. Kulakauskas, (2007) SpxB regulates O-acetylation-dependent resistance of *Lactococcus lactis* peptidoglycan to hydrolysis. *The Journal of biological chemistry* **282**: 19342-19354.
- von Heijne, G., (1990) The signal peptide. *The Journal of membrane biology* **115**: 195-201.
- Vrancken, K., S. De Keersmaecker, N. Geukens, E. Lammertyn, J. Anne & L. Van Mellaert, (2007) *pspA* overexpression in *Streptomyces lividans* improves both Sec- and Tat-dependent protein secretion. *Applied microbiology and biotechnology* **73**: 1150-1157.
- Waegeman, H. & W. Soetaert, (2011) Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **38**: 1891-1910.
- Walsh, G., (2010) Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug discovery today* **15**: 773-780.
- Watanabe, K., Y. Tsuchida, N. Okibe, H. Teramoto, N. Suzuki, M. Inui & H. Yukawa, (2009) Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences. *Microbiology* **155**: 741-750.
- Weiner, L., J. L. Brissette & P. Model, (1991) Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on σ^{54} and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes & development* **5**: 1912-1923.
- Wendisch, V. F., (2008) DNA Microarray-based Transcriptome Analysis in *C. glutamicum*. In: *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology* A. Burkovski (ed). Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 33-54.
- Westers, H., L. Westers, E. Darmon, J. M. van Dijl, W. J. Quax & G. Zanen, (2006) The CsxRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *The FEBS journal* **273**: 3816-3827.
- Westers, L., H. Westers & W. J. Quax, (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et biophysica acta* **1694**: 299-310.
- Westphal, S., L. Heins, J. Soll & U. C. Vothknecht, (2001) *Vipp1* deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4243-4248.

- Wetzstein, M., U. Volker, J. Dedio, S. Lobau, U. Zuber, M. Schiesswohl, C. Herget, M. Hecker & W. Schumann, (1992) Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **174**: 3300-3310.
- White, M. J., H. He, R. M. Penoske, S. S. Twining & T. C. Zahrt, (2010) PepD participates in the mycobacterial stress response mediated through MprAB and SigE. *Journal of bacteriology* **192**: 1498-1510.
- Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson & G. P. Salmond, (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews* **25**: 365-404.
- Wiegert, T., G. Homuth, S. Versteeg & W. Schumann, (2001) Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon. *Molecular microbiology* **41**: 59-71.
- Wolf, D., F. Kalamorz, T. Wecke, A. Juszczak, U. Mäder, G. Homuth, S. Jordan, J. Kirstein, M. Hoppert, B. Voigt, M. Hecker & T. Mascher, (2010) In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **192**: 4680-4693.
- Wu, X. C., W. Lee, L. Tran & S. L. Wong, (1991) Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of bacteriology* **173**: 4952-4958.
- Yahr, T. L. & W. T. Wickner, (2001) Functional reconstitution of bacterial Tat translocation in vitro. *The EMBO journal* **20**: 2472-2479.
- Zahrt, T. C. & V. Deretic, (2001) *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12706-12711.
- Zhang, L., H. N. Patel, J. W. Lappe & R. M. Wachter, (2006) Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *Journal of the American Chemical Society* **128**: 4766-4772.
- Zhang, X. Y., C. K. Asiedu, P. C. Supakar & M. Ehrlich, (1992) Increasing the activity of affinity-purified DNA-binding proteins by adding high concentrations of nonspecific proteins. *Analytical biochemistry* **201**: 366-374.
- Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider & G. Storz, (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *Journal of bacteriology* **181**: 4639-4643.
- Zhou, M., J. Boekhorst, C. Francke & R. J. Siezen, (2008) LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC bioinformatics* **9**: 173.
- Zuber, B., M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths & M. Daffé, (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of bacteriology* **190**: 5672-5680.
- Zverlov, V. V., I. Y. Volkov, T. V. Velikodvorskaya & W. H. Schwarz, (1997) Highly thermostable endo-1,3-beta-glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology* **143** (Pt 5): 1701-1708.
- Zweers, J. C., T. Wiegert & J. M. van Dijl, (2009) Stress-responsive systems set specific limits to the overproduction of membrane proteins in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology* **75**: 7356-7364.

Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Roland Freudl für die Überlassung des überaus interessanten und spannenden Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die konstruktiven Ratschläge und die Bereitschaft auch gewagte Theorien zu überprüfen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Dr. Tino Polen danke ich für die unzähligen Hilfestellungen bei der Nutzung und dem Verständnis der Software zur Auswertung von DNA-Microarrays.

Besonders danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Proteinsekretion, Astrid Bida, Bertan Bopp, Liuyang Diao, Doris Dohmen-Olma, Stefan Fleckenstein, Britta Kleine, Frank Lausberg, Sonja Müller, Dan Oertel und Sandra Scheele für das gute Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft. Ich werde mich immer an unser Kellerkarma erinnern.

Ebenso danke ich den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Bringer-Meyer und Ulli Degner für die stete Hilfsbereitschaft und die Kaffeegespräche und den Mitgliedern der AG Eggeling für das eine oder andere Flurgespräch. Besonders schätze ich Steffis Tips und kurzfristige Korrekturen...

Allen Mitgliedern der Aachener Fahrgemeinschaft danke ich für die gute Gesellschaft unterwegs und manch leckeres Essen oder Getränk.

Steffi danke ich für die schöne Zeit in der WG und alle kurzfristigen Korrekturen, Ratschläge und sonstige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Bott danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit am Institut für Bio- und Geowissenschaften und allen Mitgliedern des Instituts für das gute Arbeitsklima. Insbesondere danke ich der Infrastruktur für die fortwährende Garantie eines reibungslosen Arbeitsalltags.

Von ganzem Herzen danke ich Stefan für Aufmunterung, Motivation, Unterstützung, ein offenes Ohr und viel Geduld und Verständnis.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich unterstützt seit ich mich erinnern kann.

Erklärung

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

Jülich, den 12. November 2012

Ava Rebecca Chattopadhyay

Band / Volume 48

**Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex
in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit OdhI**

K. Raasch (2012), VI, 86 pp.

ISBN: 978-3-89336-764-1

Band / Volume 49

**Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*:
Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne**

S. Krawczyk (2012), 125 pp.

ISBN: 978-3-89336-771-9

Band / Volume 50

Analysis of functional domains of Par-4

U.K. Tiruttani Subhramanyam (2012), 85 pp.

ISBN: 978-3-89336-766-5

Band / Volume 51

**Transcriptional responses and transcriptional regulators
of *Gluconobacter oxydans* 621H**

S. K. Schweikert (2012), XVI, 140 pp.

ISBN: 978-3-89336-780-1

Band / Volume 52

**Characterization of the human mu opioid receptor:
Structural and functional studies of a G protein-coupled receptor**

Y. Ma (2012), 129 pp.

ISBN: 978-3-89336-767-2

Band / Volume 53

**Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana*
für die enantio-selektive Synthese von (R)-Cyanhydrinen**

Entwicklung und Etablierung geeigneter Reaktionsparameter und molekulare
Stabilisierung durch rationales Enzymdesign

D. Okrob (2012), XV, 135 pp.

ISBN: 978-3-89336-782-5

Band / Volume 54

**Eine kritische Evaluierung FRET-basierter Biosensoren
als Werkzeuge für die quantitative Metabolitanalytik**

R. Moussa (2012), 113 pp.

ISBN: 978-3-89336-792-4

Band / Volume 55

**Development of Surface-FIDA towards a diagnostic tool
for Alzheimer's disease**

L. Wang-Dietrich (2012), VI, 103 pp.

ISBN: 978-3-89336-801-3

Band / Volume 56

Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum*

S. Scheele (2012), vii, 127 pp.

ISBN: 978-3-89336-815-0

Band / Volume 57

Novel insights into the energy metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by comprehensive analysis of mutants defective in respiration or oxidative phosphorylation

A. Koch-Körfges (2012), III, 137 pp.

ISBN: 978-3-89336-826-6

Band / Volume 58

Prozessnahe Hochdurchsatzoptimierung der heterologen Proteinproduktion in alternativen Wirtsorganismen

P. Rohe (2012), 165 pp.

ISBN: 978-3-89336-834-1

Band / Volume 59

Validation and characterisation of novel cellular ligands of membrane-associated HIV-1 Nef

E.C.Kammula (2012), 151 pp.

ISBN: 978-3-89336-839-6

Band / Volume 60

Untersuchungen zur Membranintegrität während der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli*

S. Fleckenstein (2013), VI, 160 pp.

ISBN: 978-3-89336-841-9

Band / Volume 61

Characterization of Novel Amyloid- β Peptide (A β) Binding Ligands

S. Dornieden (2013), vii, 129 pp.

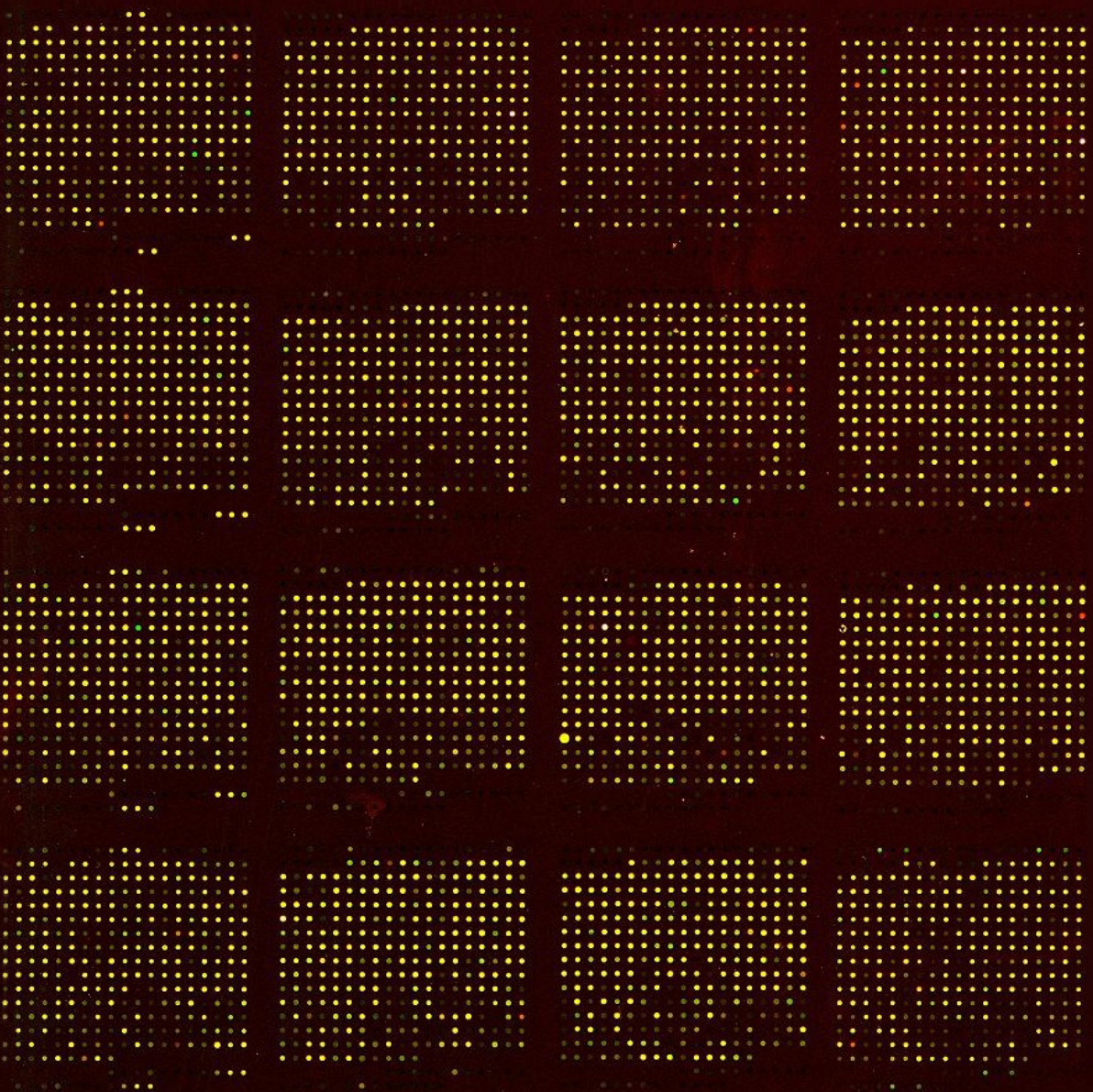
ISBN: 978-3-89336-844-0

Band / Volume 62

Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

A. R. Chattopadhyay (2013), VIII, 178 pp.

ISBN: 978-3-89336-845-7



Gesundheit / Health
Band / Volume 62
ISBN 978-3-89336-845-7

