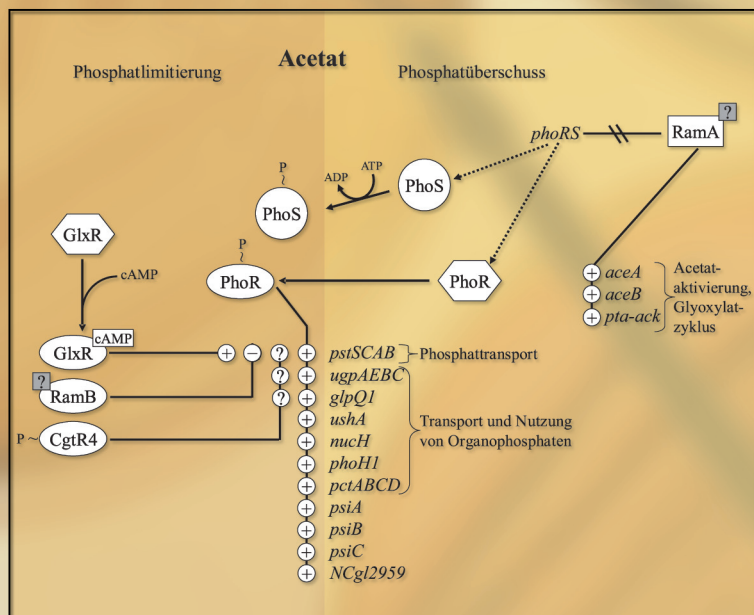


Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum*

Ulrike Sorger-Herrmann



Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 33

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 1

Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum*

Ulrike Sorger-Herrmann

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 33

ISSN 1433-5549

ISBN 3-89336-466-8

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
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 2006

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 33

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2006)

ISSN 1433-5549
ISBN-10: 3-89336-466-8
ISBN-13: 978-3-89336-466-4

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.

Abstract

In this work the regulation mechanism of the phosphorus metabolism in *C. glutamicum* was characterized. It was based on the knowledge that the two-component regulatory system PhoRS is involved in this regulation, but it is not essential for the induction of the *pstSCAB* operon, which encodes a high-affinity uptake system for phosphate, upon phosphate starvation. Consequently, the goal was to characterize the PhoRS independent regulation of the *pstSCAB* operon.

Initially, it was determined whether the phosphate starvation inducible genes are controlled by mRNA degradation. For the first time mRNA stability experiments were performed in *C. glutamicum*. In terms of mRNA stability, the genes of the phosphate starvation stimulon did not differ from all other genes of the *C. glutamicum* genome and showed an average mRNA half life of 5 min. Thus, the regulation of the phosphate starvation inducible genes primarily occurs on the transcriptional level and not by mRNA degradation.

A detailed analysis of the long-term effects of PhoRS on the regulation of phosphorus metabolism genes revealed that PhoRS is neither essential for growth under phosphate starvation conditions nor for growth with 5'-adenosine monophosphate, L- α -glycerolphosphate or UDP-glucose as alternative sources of phosphorus. However, the delayed induction of the genes of the phosphate starvation stimulon observed in the absence of PhoRS showed its importance for the fast adaptation to phosphate starvation. The binding region of PhoR, which is located in a 35 bp long region, -217 to -182 bp upstream of the transcriptional start, could be determined employing deletion analysis of the *pstS* promoter.

By DNA affinity chromatography and MALDI-MS analysis the transcriptional regulators of acetate metabolism RamB and GlxR as well as of the uncharacterized response regulator CgtR4 could be identified as proteins binding to the *pstS* promoter. RamB and CgtR4 interacted with the *pstS* promoter after cultivation on glucose medium under phosphate excess as well as on acetate medium under phosphate limiting conditions. However, binding of GlxR could only be detected after cultivation on acetate medium upon phosphate starvation.

In electrophoretic mobility shift assays purified GlxR bound to the *pstS* promoter *in vitro* with high affinity. Binding of GlxR to the *pstS* promoter was only detected in the presence of cAMP. The binding region of GlxR is located in a region of the *pstS* promoter ranging from bp -129 to bp +126 related to the transcriptional start site.

Based on the known RamB binding motif, 5'-AA/GAACTTTGCAAA-3', two incompletely conserved RamB binding motifs could be identified in the *pstS* promoter. In electrophoretic mobility shift assays with different fragments of the *pstS* promoter and with fragments carrying mutated binding motifs it could be shown that both binding motifs are necessary for the interaction of RamB with the *pstS* promoter. Transcriptional fusion analyses revealed that the regulator RamB activates the *pstS* promoter after a shift from phosphate-containing to phosphate-free glucose medium *in vivo*. However, RamB represses the *pstS* promoter after a shift from phosphate-containing to phosphate-free acetate medium.

In addition, transcriptional fusion analyses and transcriptome analyses revealed that the induction level of the *pstSCAB* operon upon phosphate starvation depends on the carbon source. The induction of the *pstSCAB* operon after a shift from phosphate-containing to phosphate-free medium was higher with glucose as carbon source than with acetate as carbon source. These results and the observations that the genes of the two component system PhoRS showed a higher expression on phosphate-free glucose medium than on phosphate-free acetate medium and that a potential RamA binding site could be identified upstream of the *phoRS* operon by bioinformatical analysis reveal link between phosphate- and carbon-dependent regulation of genes of the phosphorus metabolism.

Thus, this work for the first time shows that the regulation of carbon and phosphorus metabolism is connected by the carbon regulators RamA, RamB and GlxR.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Regulation des Phosphorstoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum* charakterisiert. Es war bekannt, dass das Zweikomponentensystem PhoRS an dieser Regulation beteiligt ist, aber nicht essentiell für die Induktion des *pstSCAB*-Operons bei Phosphatmangel ist. Im Mittelpunkt stand daher die Identifizierung und Charakterisierung des/der PhoRS-unabhängigen Regulators/en des *pstSCAB*-Operons.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst überprüft, ob die Gene des Phosphatmangelstimulons einer Kontrolle durch mRNA-Abbau unterliegen. Dafür wurde zum ersten Mal die mRNA-Stabilität in *C. glutamicum* in einem genomweiten Ansatz untersucht. Die mRNA-Stabilität der Gene des Phosphatmangelstimulons entsprach mit einer durchschnittlichen mRNA-Halbwertszeit von 5 min der durchschnittlichen mRNA-Stabilität aller Gene des *C. glutamicum*-Genoms. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation der Phosphatmangelgene im Wesentlichen auf Ebene der Transkription und nicht durch Kontrolle des mRNA-Abbaus erfolgt.

Die bisherigen Untersuchungen zu PhoRS waren auf die kurzfristige Antwort auf Phosphatmangel beschränkt. Die experimentellen Daten dieser Arbeit zeigten, dass PhoRS weder essentiell für das Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen noch für das Wachstum auf den alternativen Phosphorquellen Adenosin-5'-Monophosphat, L- α -Glycerinphosphat und UDP-Glucose ist. Das verzögerte Wachstum nach einem Transfer in Phosphatmangelmedium und die verzögerte Induktion der Gene des Phosphatmangelstimulons in Abwesenheit von PhoRS zeigen allerdings, dass PhoRS wichtig für die schnelle Anpassung an Phosphatmangel ist.

Durch Deletionsanalyse des *pstS*-Promotors aus *C. glutamicum* konnte die Binderegion eingegrenzt werden. Diese befindet sich in einem 35 bp langen Bereich, -217 bis -182 stromaufwärts vom Transkriptionsstart. Mit Hilfe der DNA-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Regulatoren des Acetatstoffwechsels RamB und GlxR sowie der Antwortregulator CgtR4 als an den *pstS*-Promotor bindende Proteine identifiziert. RamB und CgtR4 interagierten sowohl auf Glucose-Medium unter ausreichender Phosphatkonzentration als auch auf Acetat-Medium unter Phosphatmangel mit dem *pstS*-Promotor, während GlxR nur auf Acetat-Medium bei Phosphatmangel an den *pstS*-Promotor band.

In Gelretardierungsexperimenten wurde nachgewiesen, dass gereinigtes GlxR-Protein *in vitro* mit einer hohen Affinität an den *pstS*-Promotor bindet. Die Bindung von GlxR an den *pstS*-Promotor erfolgte dabei nur in Anwesenheit von cAMP. GlxR bindet an eine 255 bp lange Region des *pstS*-Promotors, die sich von -129 bis +126 bezogen auf den Transkriptionsstart erstreckt.

Basierend auf dem kürzlich identifizierten RamB-Bindemotiv, 5'-AA/GAACTTTGCAAA-3', gelang es bei einer genaueren bioinformatischen Analyse der *pstS*-Promotorregion zwei nicht vollständig konservierte RamB-Bindemotive zu identifizieren. In Gelretardierungsexperimenten mit verschiedenen Teilfragmenten des *pstS*-Promotors und durch Mutation der Bindemotive konnte experimentell gezeigt werden, dass beide Bindemotive an der Interaktion von RamB mit dem *pstS*-Promotor beteiligt sind. Aus Transkriptionsfusionsanalysen ließ sich ableiten, dass der Regulator RamB den *pstS*-Promotor bei einem Transfer von phosphathaltigem Glucose-Medium zu phosphatfreiem Glucose-Medium *in vivo* aktiviert, während RamB die Transkription des *pstS*-Promotors bei einem Transfer von phosphathaltigem Acetat-Medium zu phosphatfreiem Acetat-Medium reprimiert.

Außerdem wurde sowohl in Transkriptionsfusionsanalysen als auch in Transkriptomanalysen gezeigt, dass die Phosphatmangelinduktion des *pstSCAB*-Operons von der Kohlenstoffquelle abhängt. Die Gene des Phosphatmangelstimulons wiesen nach dem Transfer von Glucose-Medium auf phosphatfreies Glucose-Medium eine stärkere Induktion auf als nach dem Transfer von Acetat-Medium auf phosphatfreies Acetat-Medium. Die im Vergleich zu phosphatfreiem Acetat-Medium höhere Expression der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS auf phosphatfreiem Glucose-Medium lässt in Verbindung mit einer durch bioinformatische Analysen identifizierten möglichen RamA-Bindestelle vermuten, dass die Expression der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS nach Wachstum auf Glucose durch RamA aktiviert wird.

Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass in *C. glutamicum* über die Kohlenstoffregulatoren RamA, RamB und GlxR eine Verbindung zwischen der Regulation von Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel besteht.

1.	Zusammenfassung.....	
2.	Einleitung	1
2.1.	Phosphorstoffwechsel	1
2.2.	Regulation des Phosphatmangels in Bakterien	4
	Ziel dieser Arbeit	12
3.	Material und Methoden	13
3.1.	Bakterienstämme und Plasmide	13
3.2.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
3.2.1.	Nährmedien	14
	Nährmedien für <i>E. coli</i>	14
	Nährmedien für <i>C. glutamicum</i>	14
3.2.2.	Medienzusätze	15
3.2.3.	Kultivierung von Bakterien	15
3.2.4.	Stammhaltung.....	15
3.2.5.	Anzucht für die Primerextensionsanalyse und die.....	
	Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests	15
3.2.6.	Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen für <i>C. glutamicum</i> WT und	
	die Deletionsmutante $\Delta phoRS$	16
3.2.7.	Anzucht von Kulturen für die mRNA-Degradationsexperimente.....	17
3.3.	Molekulargenetische Methoden	17
3.3.1.	Isolierung genomischer DNA.....	17
3.3.2.	Isolierung von Plasmid-DNA	17
3.3.3.	RNA-Präparation.....	18
3.3.4.	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	18
3.3.5.	Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA.....	18
3.3.6.	Polymerasekettenreaktion	19
3.3.7.	Agarose-Gelelektrophorese	20
	DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung von DNA	20
	RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	20
3.3.8.	Transformation von Bakterien	21
	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	21
	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	21
3.3.9.	Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse	22
3.3.10.	Konstruktion der Transkriptionsfusionen.....	22

Inhaltsverzeichnis

3.4. Biochemische Methoden.....	23
3.4.1. Präparation der Überstände für das Messen der Enzymaktivitäten.....	23
3.4.2. 5'-Nukleotidasetest	23
3.4.3. UDP-Zuckerhydrolasetest	24
3.4.4. Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests.....	24
Proteinbestimmung nach Bradford	25
3.5. DNA-Chip-Technologie.....	25
3.5.1. Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -DNA-Chips	26
3.5.2. Nachbehandlung von DNA-Chips	26
3.5.3. Synthese fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden	27
3.5.4. DNA-Chip-Hybridisierung.....	27
3.5.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.	28
3.5.6. Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten	29
3.5.7. Archivierung von DNA-Chip-Daten	30
3.6. Primerextensionsanalyse	30
3.7. Affinitätschromatographie	31
3.8. MALDI-TOF Massenspektrometrie	32
3.9. Konstruktion des Plasmids pET16b-his- <i>glxR</i> sowie Überproduktion und	
Aufreinigung von GlxR.....	33
3.10. Überproduktion und Aufreinigung von RamB	34
3.11. Gelretardierungstests	34
3.12. Protein-Gelelektrophorese	35
SDS-Gelelektrophorese (Bis-Tris-Gel)	35
Native Gele	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen von <i>C. glutamicum</i> WT und der.....	
Deletionsmutante Δ <i>phoRS</i>	37
4.2. Bestimmung der 5'-Nukleotidaseaktivität und der UDP- Zuckerhydrolaseaktivität..	39
4.3. Bestimmung des Transkriptionsstarts und der mRNA-Spiegel für die Gene	
<i>ushA</i> und <i>nucH</i> in <i>C. glutamicum</i> WT und Δ <i>phoRS</i>	40
4.4. Expression der Transcriptionsfusion <i>pstS'</i> - <i>cat</i> in <i>C. glutamicum</i> WT und der.....	
Deletionsmutante Δ <i>phoRS</i>	41
4.5. Deletionanalyse des <i>pstS</i> -Promotors.....	42
4.6. Identifizierung von Proteinen, die an den <i>pstS</i> Promotor binden	47

4.7.	Interaktion zwischen aufgereinigtem GlxR-Protein und dem <i>pstS</i> -Promotor <i>in vitro</i>	53
4.8.	Interaktion zwischen aufgereinigtem RamB-Protein und dem <i>pstS</i> -Promotor <i>in vitro</i>	57
4.9.	Analyse der Regulation des <i>pstS</i> -Promotors durch RamB <i>in vivo</i>	64
4.10.	Vergleich der Phosphatmangel induzierten Genexpression in <i>C. glutamicum</i> WT auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	67
4.11.	Genomweite Analyse der mRNA-Stabilität in <i>C. glutamicum</i>	70
5.	Diskussion	76
5.1.	Genomweite Analyse der mRNA-Stabilität in <i>C. glutamicum</i>	76
5.2.	Rolle des Zweikomponentensystems PhoRS bei der Regulation der Gene des Phosphorstoffwechsels	77
5.3.	RamB	80
5.4.	GlxR	82
5.5.	Komplexität der Phosphatmangelantwort durch drei weitere Transkriptionsregulatoren CgtR4, NCgl1401 und NCgl2978	84
5.6.	Modell des Phosphatregulationsnetzwerkes in <i>C. glutamicum</i>	86
5.7.	Verbindung zwischen der Regulation des Kohlenstoff- und des Phosphorstoffwechsels	93
6.	Literatur	96
7.	Anhang	110
	Danksagung	119

ABKÜRZUNGEN

∅	Durchmesser / Mittelwert
Ω	Ohm (Widerstand)
Λ	Lambda / Wellenlänge
ε	Extinktionskoeffizient
λ _{EM max}	Wellenlänge maximaler Emission
λ _{EX max}	Wellenlänge maximaler Extinktion
Δ <i>phoRS</i>	Mutante des Wildtypstamms, bei der das Zweikomponentensystem PhoRS deletiert worden ist (Kocan et al. 2006)
Δ <i>ramB</i>	Mutante des Wildtypstamms, bei der der Transkriptionsregulator RamB deletiert worden ist (Gerstmeir et al. 2004)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶) / Wachstumsrate (h ⁻¹)
A	Adenin
5' AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cm	Zentimeter
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
ddH ₂ O	doppelt destiliertes Wasser
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

<i>et al. et alii</i>	(und andere)
F	Farad (elektrische Kapazität)
FMN	Flavinadeninmononukleotid
g	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G3P	L- α -Glycerinphosphat
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazidin-N'-2-ethansulfonsäure
K	Kilo (10 ³)
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kb	Kilobasenpaare
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar (mol/l)
m	milli- (10 ⁻³) / meter
Mb	Megabasenpaare
MeOH	Methanol
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	nano (10 ⁻⁹)
N	Nukleotid (A, C, G oder T)
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, oxidiert / reduziert
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, oxidiert / reduziert
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

Abkürzungen

RT	reverse Transkriptase
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T	Thymin
T	Tonne
TAE	Tris-Acetat/EDAT-Puffer
TC	<i>transport classification</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammoniummethan
U	<i>Unit</i> ; Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UDP-Glu	UDP-Glucose
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt (Spannung)
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
W	Watt (Leistung)
WT	Wildtypstamm ATCC13032
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der Regulation des Phosphorstoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum* charakterisiert. Es war bekannt, dass das Zweikomponentensystem PhoRS an dieser Regulation beteiligt ist, aber nicht essentiell für die Induktion des *pstSCAB*-Operons bei Phosphatmangel ist. Im Mittelpunkt stand daher die Identifizierung und Charakterisierung des/der PhoRS-unabhängigen Regulators/en des *pstSCAB*-Operons.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst überprüft, ob die Gene des Phosphatmangelstimulons einer Kontrolle durch mRNA-Abbau unterliegen. Dafür wurde zum ersten Mal die mRNA-Stabilität in *C. glutamicum* in einem genomweiten Ansatz untersucht. Die mRNA-Stabilität der Gene des Phosphatmangelstimulons entsprach mit einer durchschnittlichen mRNA-Halbwertszeit von 5 min der durchschnittlichen mRNA-Stabilität aller Gene des *C. glutamicum*-Genoms. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation der Phosphatmangelgene im Wesentlichen auf Ebene der Transkription und nicht durch Kontrolle des mRNA-Abbaus erfolgt.

Die bisherigen Untersuchungen zu PhoRS waren auf die kurzfristige Antwort auf Phosphatmangel beschränkt. Die experimentellen Daten dieser Arbeit zeigten, dass PhoRS weder essentiell für das Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen noch für das Wachstum auf den alternativen Phosphorquellen Adenosin-5'-Monophosphat, L- α -Glycerinphosphat und UDP-Glucose ist. Das verzögerte Wachstum nach einem Transfer in Phosphatmangelmedium und die verzögerte Induktion der Gene des Phosphatmangelstimulons in Abwesenheit von PhoRS zeigen allerdings, dass PhoRS wichtig für die schnelle Anpassung an Phosphatmangel ist.

Durch Deletionsanalyse des *pstS*-Promotors aus *C. glutamicum* konnte die Binderegion eingegrenzt werden. Diese befindet sich in einem 35 bp langen Bereich, -217 bis -182 stromaufwärts vom Transkriptionsstart. Mit Hilfe der DNA-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Regulatoren des Acetatstoffwechsels RamB und GlxR sowie der Antwortregulator CgtR4 als an den *pstS*-Promotor bindende Proteine identifiziert. RamB und CgtR4 interagierten sowohl auf Glucose-Medium unter ausreichender Phosphatkonzentration als auch auf Acetat-Medium unter Phosphatmangel mit dem *pstS*-Promotor, während GlxR nur auf Acetat-Medium bei Phosphatmangel an den *pstS*-Promotor band.

In Gelretardierungsexperimenten wurde nachgewiesen, dass gereinigtes GlxR-Protein *in vitro* mit einer hohen Affinität an den *pstS*-Promotor bindet. Die Bindung von GlxR an den *pstS*-Promotor erfolgte dabei nur in Anwesenheit von cAMP. GlxR bindet an eine 255 bp lange Region des *pstS*-Promotors, die sich von -129 bis +126 bezogen auf den Transkriptionsstart erstreckt.

Basierend auf dem kürzlich identifizierten RamB-Bindemotiv, 5'-AA/GAACTTTGCAAA-3', gelang es bei einer genaueren bioinformatischen Analyse der *pstS*-Promotorregion zwei nicht vollständig konservierte RamB-Bindemotive zu identifizieren. In Gelretardierungsexperimenten mit verschiedenen Teilfragmenten des *pstS*-Promotors und durch Mutation der Bindemotive konnte experimentell gezeigt werden, dass beide Bindemotive an der Interaktion von RamB mit dem *pstS*-Promotor beteiligt sind. Aus Transkriptionsfusionsanalysen ließ sich ableiten, dass der Regulator RamB den *pstS*-Promotor bei einem Transfer von phosphathaltigem Glucose-Medium zu phosphatfreiem Glucose-Medium *in vivo* aktiviert, während RamB die Transkription des *pstS*-Promotors bei einem Transfer von phosphathaltigem Acetat-Medium zu phosphatfreiem Acetat-Medium reprimiert.

Außerdem wurde sowohl in Transkriptionsfusionsanalysen als auch in Transkriptomanalysen gezeigt, dass die Phosphatmangelinduktion des *pstSCAB*-Operons von der Kohlenstoffquelle abhängt. Die Gene des Phosphatmangelstimulons wiesen nach dem Transfer von Glucose-Medium auf phosphatfreies Glucose-Medium eine stärkere Induktion auf als nach dem Transfer von Acetat-Medium auf phosphatfreies Acetat-Medium. Die im Vergleich zu phosphatfreiem Acetat-Medium höhere Expression der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS auf phosphatfreiem Glucose-Medium lässt in Verbindung mit einer durch bioinformatische Analysen identifizierten möglichen RamA-Bindestelle vermuten, dass die Expression der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS nach Wachstum auf Glucose durch RamA aktiviert wird.

Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, dass in *C. glutamicum* über die Kohlenstoffregulatoren RamA, RamB und GlxR eine Verbindung zwischen der Regulation von Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel besteht.

2. Einleitung

2.1. Phosphorstoffwechsel

Phosphor ist eine essentielle Komponente aller Zellen. Viele Biomoleküle, z.B. Phospholipide, Organophosphate, komplexe Kohlenhydrate wie Lipopolysaccharide oder Nukleinsäuren enthalten Phosphor. Der Hauptphosphoranteil der Zellen findet sich in den Polymeren RNA, DNA und Polyphosphat. Die zellulären Speicherformen von anorganischem Phosphat (P) sind Pyrophosphat (PP) sowie Polyphosphat (polyP). Da viele Mikroorganismen die Fähigkeit besitzen, große Mengen von Phosphat in Form von Polyphosphat zu speichern, werden sie zur Abwasserklärung eingesetzt. Bei den Polyphosphat akkumulierenden Bakterien konnte keine spezielle Art identifiziert werden, die allein für die Phosphatklärung verantwortlich ist. Es handelt sich vielmehr um eine Population phylogenetisch und taxonomisch verschiedener Mikroorganismen wie wahrscheinlich *Acinetobacter* spp., *Microlunatus phosphovorius*, *Lampropedia* spp. und Mitglieder der *Rhodocyclus*-Gruppe und weitere (de-Bashan and Bashan 2004).

In Bakterien wird Phosphor üblicherweise als anorganisches Orthophosphat über spezifische Aufnahmesysteme in die Zelle aufgenommen. Die Assimilation des aufgenommenen Phosphats findet hauptsächlich über die Reaktionen des Energie- und Kohlenstoffstoffwechsels z.B. mit Hilfe der ATP-Synthase, der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase sowie der Succinyl-CoA-Synthetase statt (Wanner 1996a). Phosphor spielt eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel, da die freie Energie, die bei der Oxidation von Substraten entsteht, benutzt wird, um ATP aus ADP und Phosphat herzustellen. Außerdem werden viele Proteine nach der Translation zur Steuerung ihrer Aktivität phosphoryliert (Wanner 1996a) und viele zelluläre Regulationsprozesse finden in Abhängigkeit von Phosphor statt z.B. Phosphortransfer bei Signalübertragung im Zweikomponentensystem oder bei Serin/Threoninproteinkinasen.

Das sehr gut untersuchte Bakterium *Escherichia coli* ist in der Lage, alle drei Arten von Phosphorverbindungen als Phosphorquelle zu nutzen: anorganisches Phosphat, Organophosphate und Phosphonate. Bei den Organophosphaten (C-O-P-Esterbindung) unterscheidet man transportable und nicht-transportable Organophosphate. Für transportable Organophosphate wie Glycerin-3-Phosphat oder Hexose-6-Phosphat gibt es spezifische Transporter z.B. GlpT sowie UhpT (Wanner 1996a). Bei Organophosphaten, die nicht in die Zelle transportiert werden können, wird außerhalb der Zelle Phosphat z.B. über eine alkalische Phosphatase abgespalten und dann über die Transporter für anorganisches Phosphat PitA oder PstSCAB in die Zelle aufgenommen. Phosphonate (direkte P-C-Bindung) hingegen

wie Aminoethylphosphonat oder Ethylphosphonat werden hingegen über spezielle ABC-Transporter wie z.B. PhnSTUV aufgenommen. Der enthaltene Phosphor wird innerhalb der Zelle als Phosphat abgespalten. In *E. coli* sind drei Phosphattransporter bekannt: PitA, PitB sowie Pst (Rao and Torriani 1990; Webb et al. 1992; Harris et al. 2001; Hoffer et al. 2001). Das konstitutiv exprimierte Phosphataufnahmesystem PitA hat eine niedrige Affinität zu Phosphat, das in Abhängigkeit von Protonen aufgenommen wird (Harris et al. 2001). Das Phosphataufnahmesystem PitB ist ein kryptisches Homolog zu PitA und wird erst durch Mutation gebildet. Der Phosphattransport über PitB funktioniert in ähnlicher Weise wie der über PitA (Harris et al. 2001; Hoffer et al. 2001). Der Phosphattransporter Pst gehört zur Superfamilie der ABC-Transporter (Webb et al. 1992) und ist für die spezifische und hochaffine Aufnahme von Phosphat auf Kosten von ATP zuständig. Pst hat mit einem K_m von $0,2 \mu\text{M}$ eine hohe Affinität zu Phosphat und wird nur bei Phosphatmangel (Rao and Torriani 1990) exprimiert.

Da der Phosphorstoffwechsel eng mit dem Energie- und zentralen Kohlenstoffwechsel verbunden ist, kann nur bei einer ausreichenden Phosphorversorgung ein optimaler Energie- und Kohlenstoffstoffwechsel gewährleistet werden. Da aus letztgenanntem auch die Vorläuferprodukte für die Biosynthese der Aminosäuren stammen, ist das Zusammenspiel zwischen Phosphor- und Kohlenstoffstoffwechsel von besonderem Interesse für den Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum*. 1908 identifizierte Kikunae Ikeda, Professor der Tokio Universität und späterer Gründer der Firma Ajinomoto, Mononatrium-Glutamat als die Hauptgeschmackskomponente der traditionell in der japanischen Küche verwendeten Alge *kon-bu* (*Laminaria japonica*) (Ikeda and Nakagawa 2003). Der von Ikeda als *umami* bezeichnete Geschmack von Mononatrium-Glutamat gilt in der japanischen Kultur neben süß, salzig, sauer und bitter als fünfte Geschmacksqualität. Mononatrium-Glutamat ist heute einer der weltweit gebräuchlichsten Geschmacksverstärker mit einer jährlichen Produktion von etwa 1,5 Millionen Tonnen (Hermann 2003).

Als Mononatrium-Glutamat 1909 von der Firma Ajinomoto erstmals auf den Markt gebracht wurde, erfolgte die Produktion noch durch saure Hydrolyse von Weizen, Soja und anderen pflanzlichen Proteinquellen. Da das Verfahren zu dieser Zeit jedoch äußerst unökonomisch war und die steigende Nachfrage nicht decken konnte, suchte man nach adäquaten Alternativen. Für die Herstellung von L-Glutamat konnte ein Biotin-auxotrophes Bakterium isoliert werden, das bis zu 10 g/l Glutamat akkumulierte (Kinoshita et al. 1957). Dieses Gram-positive, nicht-pathogene Bodenbakterium, *C. glutamicum*, ist unbeweglich, nicht sporulierend, Katalase-positiv, zeigt keine Säurefestigkeit in der Ziehl-Neelsen-Färbung und

zeichnet sich durch eine unregelmäßige, stäbchen- bis keulenförmige Morphologie aus (κορυμή für griechisch Keule) (Abe et al. 1967). Das Genom von *C. glutamicum* weist eine hohe Konzentration der Basen Guanin und Cytosin auf (Kalinowski et al. 2003). Neben der biologischen Produktion von L-Glutamat werden rekombinante *C. glutamicum*-Stämme auch zur Produktion von 6×10^5 Tonnen Lysin pro Jahr verwendet (Sahm et al. 2000). Außerdem ist *C. glutamicum* auch geeignet als Modellorganismus der *Corynebacterineae*, einer Unterordnung der Actinomyceten, zu denen auch die medizinische wichtige Art *Mycobacterium tuberculosis* gehört (Stackebrandt 1997).

C. glutamicum besteht zu 1,5% bis 2% Gewichtsprozent bezogen auf die Zelltrockenmasse aus Phosphor, ein Teil davon ist als Polyphosphat in der Zelle gespeichert (Lambert et al. 2002; Pallerla et al. 2005) und wird in Grana gelagert (Pallerla et al. 2005). Die bevorzugte Phosphorquelle ist Phosphat. Die halbmaximale Wachstumsrate erreicht *C. glutamicum* bei einer Phosphatkonzentration von 0,1 mM (Ishige et al. 2003). *C. glutamicum* kann Pyrophosphat, Polyphosphat, Glycerin-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat, Glucose-6-Phosphat, Glucose-1-Phosphat, AMP, UDP-Glucose und DNA als Phosphorquellen verwerten (Wendisch 2005). Es ist aber nicht wie *E. coli* in der Lage Phosphonate wie Aminophosphonat oder Ethylphosphonat zu nutzen (Wendisch 2005).

In *C. glutamicum* sind drei Phosphattransporter bekannt: PitA, NptA und Pst. Der Phosphattransporter PitA in *C. glutamicum* zeigt eine Sequenzübereinstimmung von 28% mit PitA von *E. coli*, bei dem es sich um einen Transporter mit niedriger Affinität zu Phosphat und einer hohen Transportgeschwindigkeit handelt. Die Phosphataufnahme findet mit Hilfe von bivalenten Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} statt, die essentiell für dessen Funktion sind (van Veen et al. 1994). Der Transport erfolgt zusammen mit einem Proton und erreicht eine Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) von $55 \text{ nmol Phosphat} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg protein})^{-1}$ (Willsky and Malamy 1980). Der K_m liegt zwischen $25 \mu\text{M}$ und $38 \mu\text{M}$ (Tanaka et al. 2003). Die Aufgabe von PitA, das konstitutiv exprimiert wird, liegt in der Phosphataufnahme, wenn dieses im Überschuss vorhanden ist. In *C. glutamicum* wird *pitA* ebenfalls konstitutiv exprimiert (Wendisch 2005) und nicht bei Phosphatmangel induziert (Ishige et al. 2003).

NCgl2649 (*nptA*) kodiert für einen putativen Na^+ -abhängigen Phosphattransporter, der 29% Sequenzidentität zum Homolog von *Vibrio cholerae* zeigt. Dieser hat einen K_m von $300 \mu\text{M}$ für Phosphat, $75 \mu\text{M}$ für Na^+ und zeigte eine Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) für Phosphat von $9 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ (Lebens et al. 2002). In *C. glutamicum* wird das *nptA*-Gen nicht bei Phosphatmangel induziert (Ishige et al. 2003).

Das *pstSCAB*-Operon in *C. glutamicum*, das eine Sequenzidentität von 56% zum Homolog von *E. coli* aufweist, kodiert für einen ATP-getriebenen ABC-Transporter mit hoher Affinität zu Phosphat (Wendisch 2005). Wie bei vielen anderen Bakterien wird das *pstSCAB*-Operon nur unter Phosphatmangelbedingungen induziert.

2.2. Regulation des Phosphatmangels in Bakterien

Unter Phosphatmangel induzieren viele Bakterien die Synthese von Proteinen, um die limitierende Phosphatkonzentration effizienter zu nutzen bzw. alternative Phosphorquellen zugänglich zu machen. Die Regulation der Phosphatmangelantwort wurde besonders gut in *Escherichia coli* (Wanner 1996a) und *Bacillus subtilis* (Hulett 2002) studiert.

In *E. coli* ist das Zweikomponentensystem PhoR (Sensorkinase) und PhoB (Antwortregulator) für die Induktion der Phosphatmangelgene verantwortlich (Wanner and Chang 1987). Unter Phosphatmangelbedingungen phosphoryliert die Histidinkinase PhoR den Antwortregulator PhoB (Makino et al. 1989), der anschließend an die PHO-Box genannte Promotorregion mit der Sequenz CTGTCAT von wenigstens 38 Genen bindet und deren Transkription induziert.

Unter diesen Genen, die das Pho-Regulon bilden (Wanner 1996b), befindet sich das *phoBR*-Operon, das *pstSCAB-phoU*-Operon, das für ein hochaffines Phosphataufnahmesystem und ein Regulationsprotein kodiert; das *ugpBAECQ*-Operon, das für ein ABC-Aufnahmesystem für sn-Glycerin-3-Phosphat und für das Enzym Glycerinphosphoryldiesterphosphodiesterase kodiert; das *phoA-psiF*-Operon, das für eine alkalische Phosphatase und ein Protein unbekannter Funktion kodiert; *phoE*, das für ein anionenspezifisches Porin und *phoH*, das für ein ATP bindendes Protein unbekannter Funktion kodiert (Abb. 1). *E. coli* ist außerdem in der Lage Phosphonate als Phosphorquellen zu nutzen (Wanner 1996a). Die meisten der Gene, die in *E. coli* durch Phosphatmangel induziert werden, insgesamt 21 von 38 Genen, kodieren für Proteine der Aufnahme und des Abbaus von Phosphonaten wie z.B. das *phnCDEFGHIJKLMNOP*-Operon (Wanner 1996a). Dieses kodiert für ein Phosphonat-Aufnahmesystem und Enzyme des C-P-Lyase-Stoffwechselweges des Phosphonatabbaus.

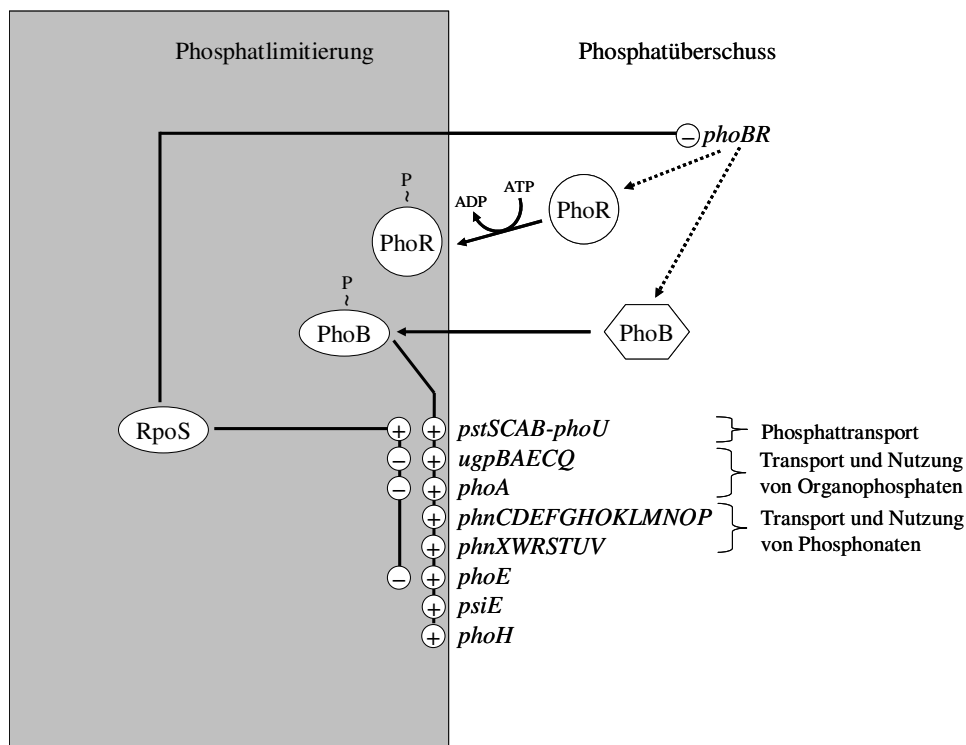


Abb. 1: **Regulationsnetzwerk in *E. coli*.** Bei Phosphatmangel phosphoryliert die Sensorkinase PhoR den Antwortregulator PhoB und phosphoryliertes PhoB aktiviert die Expression seiner Zielgene. Unter Stressbedingungen vermittelt der Sigma-Faktor RpoS der RNA-Polymerase verringerte Transkription von *phoA*, *phoE*, des *phoBR*-Operons und des *ugpBAECQ*-Operons, während das *pstSCAB-phoU*-Operon verstärkt transkribiert wird.

Außerdem vermittelt unter Stressbedingungen auch der Sigmafaktor RpoS (σ^S) der RNA-Polymerase verringerte Transkription von *phoA*, *phoE* und des *ugpBAECQ*-Operons, während das *pstSCAB-phoU*-Operon verstärkt transkribiert wird (Abb. 1 (Taschner et al. 2004)).

Zusammenfassend sieht die Phosphatmangelantwort in *E. coli* so aus, dass *E. coli* zuerst die Phosphataufnahme über ein ATP getriebenes hochaffines Phosphataufnahmesystem induziert, anschließend Phosphat außerhalb der Zelle über Phosphatasen und Esterasen mobilisiert und dann Proteine aktiviert, die für die Aufnahme und den Abbau von Organophosphaten und Phosphonaten essentiell sind.

In *B. subtilis* ist die Phosphatmangelantwort im Vergleich zu *E. coli* komplexer, da sie von drei unterschiedlichen Zweikomponentensystemen abhängt. Sowohl PhoPR (Sun et al. 1996; Birkey et al. 1998), als auch Spo0A, das für das Beenden der Phosphatmangelantwort und die anschließende Initialisierung der Sporulation wichtig ist (Hulett et al. 1994), sowie ResDE, das für die volle Induktion der Gene des Pho-Regulons benötigt wird (Sun et al. 1996), sind beteiligt. Das Pho-Regulon in *B. subtilis* umfasst neben dem *phoPR*-Operon; *phoA* und *phoB* für zwei alkalische Phosphatasen; *phoD* für eine alkalische Phosphatase/Phosphodiesterase mit einer Funktion im Austausch der Teichonsäuren gegen die Teichuronsäuren in der Zellwand; das *pstSCAB1B2*-Operon, das für das hochaffine ATP getriebene Phosphataufnahmesystem kodiert; *glpQ*, das für eine Glycerinphosphoryldiesterphosphodiesterase kodiert und *ydhF*, das für ein Lipoprotein kodiert. In Gegensatz zu *E. coli*, umfasst die Phosphatmangelantwort von *B. subtilis* auch die Induktion des *tuaABCDEFGH*-Operons, das für die Biosynthese von Teichuronsäuren kodiert. Gleichzeitig kommt es zu einer reduzierten Expression der *tagAB*- und *tagDEF*-Operons, die für die Biosynthese von Teichonsäuren kodieren (Hulett et al. 1991; Antelmann et al. 2000; Pragai and Harwood 2002; Pragai et al. 2004). Damit tauscht *B. subtilis* bei Phosphatmangel die in der Zellwand enthaltenen Teichonsäuren gegen die phosphatfreien Teichuronsäuren aus. Neben dem Zweikomponentensystem PhoP-PhoR, Spo0A und ResD-ResE ist auch noch der Regulator AbrB in die Kontrolle des Pho-Regulons involviert (Birkey et al. 1998). Außerdem führt die Phosphatmangelantwort bei *B. subtilis* zur Induktion von Genen der generellen Stressantwort unter Vermittlung durch die Sigmafaktoren der RNA-Polymerase σ^B und σ^M (Hecker and Volker 1998; Price et al. 2001; Minnig et al. 2005).

In dem Antibiotika produzierenden Bakterium *Streptomyces coelicolor* wurde gezeigt, dass die Biosynthese der Antibiotika sowie anderer Sekundärmetabolite durch Phosphat negativ reguliert wird (Martin 1980; Martin 1994). Auffällig dabei ist, dass diese Sekundärmetabolite, z.B. Makrolide, Tetracycline, Anthracycline, Polyetherkomponenten oder Aminoglycoside zu

verschiedenen Biosynthesewegen gehören (Dekleva et al. 1985; Doull and Vining 1990; Hobbs et al. 1992; Lounes et al. 1996). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei geringer Phosphatverfügbarkeit in der Umwelt die Biosynthese von Sekundärmetaboliten ausgelöst wird, um sich einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen zu verschaffen (Vogtli et al. 1994). Möglich ist aber auch, dass die Sekundärmetabolite als biochemische Signale der Kommunikation dienen (Horinouchi and Beppu 1992; Kaiser and Losick 1993), um unter schlechteren Umweltbedingungen das Überleben zu verbessern (Maplestone et al. 1992). Dieser molekulare Mechanismus wird in *S. coelicolor* über das Zweikomponentensystem PhoRP vermittelt (Sola-Landa et al. 2003). Bei Phosphatmangel phosphoryliert die Sensorkinase PhoR den Antwortregulator PhoP. In seiner phosphorylierten Form bindet PhoP an die PHO-Box: GG/TTCAYYYRG/CG und aktiviert die Gene des Pho-Regulons (Sola-Landa et al. 2005). Zum Pho-Regulon gehören *phoRP*; *phoU*, das die Phosphatmangelantwort vermittelt; *pstSCAB*, das für den hochaffine Phosphattransport kodiert; *phoA*, das für eine alkalische Phosphatase kodiert sowie andere Phosphatasegene.

Bei dem mit *C. glutamicum* nah verwandten Aktinomyzeten *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose, steht das *pst*-Operon nicht unter transkriptioneller Kontrolle (Rengarajan et al. 2005). Die Phosphatmangelgene werden sowohl bei ausreichender Phosphatversorgung als auch unter Phosphatmangelbedingungen konstitutiv exprimiert (Rengarajan et al. 2005). Normalerweise sind bakterielle Virulenzfaktoren sehr komplex reguliert (Rengarajan et al. 2005). Bei *M. tuberculosis* ist jedoch der Infektions- und Lebenszyklus ein anderer. Der Lebensraum von *M. tuberculosis* befindet sich in den Phagosomen der Makrophagen der Lunge, deren Milieu leicht sauer und phosphatlimitierend ist (Peirs et al. 2005; Rengarajan et al. 2005). Da *M. tuberculosis* nie außerhalb des menschlichen Körpers überleben muss und für sein kontinuierliches Überleben die Infektion von Mensch zu Mensch benötigt, erscheint die konstitutive Expression von *pst* eine notwendige Anpassung an den Lebensraum, den der Mensch als Wirt vorgibt. Dabei gilt der Transport von Phosphat in einer phosphatlimitierten Umgebung als kritisch für die Infektion (Rengarajan et al. 2005). Die Regulation von *pst* in *M. tuberculosis* wird im Gegensatz zu *E. coli*, *B. subtilis*, *S. coelicolor* und *C. glutamicum* wahrscheinlich auf Proteinebene stattfinden (Rengarajan et al. 2005).

Bei dem eukaryotischen Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* ist die Regulation bei Phosphatmangel deutlich komplexer (Pinson et al. 2004). Unter Phosphatmangelbedingungen wird der Transkriptionsregulator Pho81 induziert. Dieser inhibiert die Aktivität der Pho80-Pho85-Kinase, einer cyclin-cyclin abhängigen Proteinkinase, was zur hypophosphorylierten

und damit aktiven Form von Pho4 führt (Schneider et al. 1994; Ogawa et al. 1995). Pho4 ist im Nukleus lokalisiert und agiert dort als spezifischer Aktivator für die PHO-regulierten Gene, indem es an das Pho4-Motiv CACGTG oder CACGTT bindet (Oshima 1997). Zum Pho-Regulon in *S. cerevisiae* gehören die drei sauren Phosphatasen Pho5, Pho11 und Pho12, die im Periplasma lokalisiert sind, sowie die alkalische Phosphatase Pho8, die in der Vakuole lokalisiert ist. Zum Phosphatmangelstimulon gehören auch zwei Gene für Phosphattransporter, Pho84 und Pho89, Hor2 für eine Glycerinphosphatase und Phm5 für eine putative Polyphosphatase. Außerdem wird durch Phosphatmangel auch der Auf- und Abbau von Polyphosphat, das sich zu mehr als 90% in der Vakuole befindet, über die Polyphosphatkinase Phm1 sowie die Exopolyphosphatase Phm5 reguliert (Ogawa et al. 2000).

C. glutamicum reagiert auf Phosphatmangel, indem es die Expression der Gene des Phosphatmangelstimulons, das mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie (Lange et al. 2003) identifiziert werden konnte, induziert (Ishige et al. 2003; Wendisch 2005). Das Phosphatmangelstimulon enthält die folgenden Gene: das *pstSCAB*-Operon, das einen hochaffinen ABC-Transporter für die Aufnahme von Phosphat kodiert; das *ugpABCE*-Operon, das für ein *sn*-Glycerin-3-Phosphat ABC-Transporter kodiert; *glpQ*, das für das Enzym Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase kodiert; das *pctABCD*-Operon, das für ein ABC-Transportsystem kodiert, das möglicherweise für die Aufnahme einer noch unbekannten phosphorhaltigen Komponente kodiert; *phoH*, das für eine ATPase unbekannter Funktion kodiert; *phnB*, das für ein hypothetische Protein kodiert; *nucH*, das für eine extrazelluläre Nuklease kodiert und *ushA*, das für ein sezerniertes Enzym mit UDP-Zuckerhydrolase und 5'Nukleotidaseaktivität kodiert (Rittmann et al. 2005).

Die zeitaufgelöste Bestimmung der Expression aller Gene von *C. glutamicum* während eines Transfers von phosphathaltigem zu phosphatlimitierendem Medium erlaubte es, die Strategie abzuleiten, mit der *C. glutamicum* auf Phosphatmangel reagiert (Abb. 2). Bei ausreichender Phosphatversorgung nimmt *C. glutamicum*, so wie *E. coli*, Phosphat über ein PitA-ähnliches Transportsystem in die Zelle auf. Bei Phosphatmangel wird als erstes das *pstSCAB*-Operon für die ATP-abhängige Phosphataufnahme, induziert. Danach kommt es zur Induktion des *ugpAEBC*-Operons für die Glycerin-3-Phosphat-Aufnahme und des benachbarten *glpQ*-Gens für eine Glycerinphosphoryldiester-Phosphodiesterase, die in *E. coli* die Nutzung von Glycerin-3-Phosphat und deacylierten Phospholipiden als alternative Phosphorquellen ermöglicht.

Zeitlich verzögert werden in *C. glutamicum* dann Gene zur Mobilisierung von Phosphat aus nicht-transportierbaren Phosphorquellen verstärkt exprimiert, z.B. Gene für eine alkalische Phosphatase (*phoB*) und die 5'-Nukleotidase (*ushA*; (Rittmann et al. 2005)). Außerdem zeigten auch die Gene für ein Zweikomponentensystem während des Transfers von phosphathaltigen in phosphatlimitierendes Medium eine transient erhöhte Expression. Die mRNA-Spiegel waren nur kurze Zeit nach dem Transfer in Phosphatmangelmedium erhöht und erreichten nach 30 min wieder den Ausgangswert (Wendisch 2005).

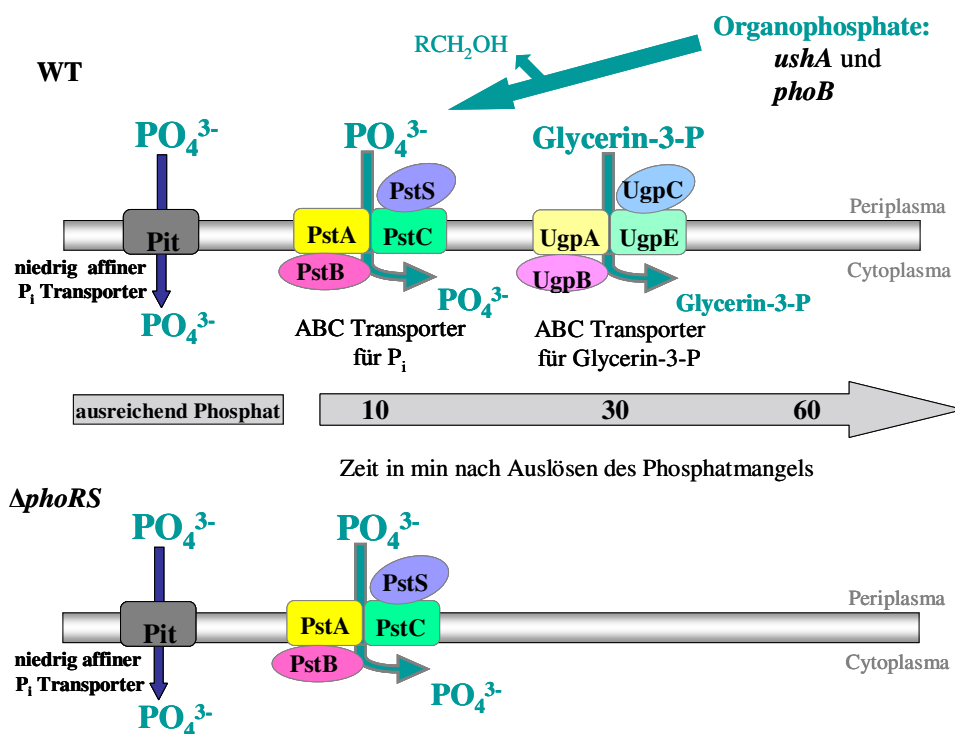


Abb. 2: Phosphatmangelantwort von *C. glutamicum*. Bei ausreichender Phosphatkonzentration wird Phosphat sowohl in *C. glutamicum* WT als auch in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ über den niedrig affinen Transporter PitA aufgenommen. Bei Phosphatmangel wird nach Aktivierung des Zweikomponentensystems PhoRS zuerst das *pstSCAB*-Operon induziert. Dieses kodiert für die hochaffine, ATP-getriebene Aufnahme von Phosphat. Im Anschluss daran kommt es in *C. glutamicum* WT zur Expression des *ugpABCE*-Operons, das für die Aufnahme von Glycerin-3-Phosphat notwendig ist. Nach 60 min unter Phosphatmangelbedingungen werden Gene zur Nutzung von Phosphat aus nicht transportierbaren Phosphorquellen wie *ushA* und *phoB* induziert. In der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ wird im selben Zeitraum nur das *pstSCAB*-Operon aktiviert.

Interessanterweise gehören zum Phosphatmangelstimulon in *C. glutamicum* keine Gene, die in den Polyphosphatstoffwechsel involviert sind.

Bei der Suche nach dem Zweikomponentensystem, das in *C. glutamicum* die Phosphatmangelantwort vermittelt, konnten Gene für 13 Zweikomponenten-Regulationssysteme identifiziert werden. Durch die Analyse der Deletionsmutanten zeigte sich, dass nur eines der 12 nicht-essentiellen Systeme für das Wachstum unter Phosphatmangel wichtig ist (Kocan et al. 2006). Die Mutante wuchs unter Phosphatmangel schlechter als *C. glutamicum* WT, nicht aber bei ausreichender Phosphatversorgung, was darauf hinweist, dass dieses Zweikomponentensystem für die Regulation der Phosphatmangelantwort verantwortlich ist (Kocan et al. 2006). Dieses System wurde Phosphatsensorkinase/Responseregulator PhoRS genannt. Phosphatmangel führt in *C. glutamicum* direkt oder indirekt zur Aktivierung der Sensorkinase PhoS (Abb. 3), wobei das durch die Rezeptordomäne der Sensorkinase PhoS dedektierte Signal noch nicht bekannt ist. Die physikalische Reizübertragung auf die Sensorkinase des für die Regulation der Phosphatmangelantwort verantwortlichen Zweikomponentensystems ist bis jetzt auch bei allen anderen hier vorgestellten Mikroorganismen *E. coli*, *B. subtilis*, *S. coelicolor*, *M. tuberculosis* und *S. cerevisiae* unbekannt. Nach der Detektion wird das Signal durch eine Konformationsänderung in der Rezeptordomäne auf die Kinasedomäne von PhoS weitergeleitet. Die Kinasedomäne von PhoS nutzt anschließend ATP zur Autophosphorylierung an einem konservierten Histidinrest. Im Anschluss daran wird die energiereiche Phosphatgruppe von PhoS auf einen konservierten Aspartatrest der Empfängerdomäne des Antwortregulators PhoR übertragen (Kocan 2005). In Analogie zu *E. coli* und *B. subtilis* (Wanner 1996b) (Hulett 1996) ist davon auszugehen, dass die Phosphorylierung die Konformation von PhoR verändert, was zu dessen Aktivierung führt. Aktiviertes PhoR~P ist nun in der Lage an die Promotoren der Gene des Pho-Regulons wie z.B. *pstSCAB*, *ugp*, *ushA* etc. zu binden und deren Expression zu induzieren. Allerdings konnte in *C. glutamicum* durch bioinformatische Analysen bis jetzt noch kein konserviertes PhoR-Bindemotiv bei den Genen des Pho-Regulons identifiziert werden (Kocan 2005).

Die Charakterisierung der Genexpression der definierten Deletionsmutante $\Delta phoRS$, der die Gene für das Zweikomponentensystem PhoRS fehlen (Kocan et al. 2006), ergab, dass die meisten Gene des Phosphatmangel-Stimulons 60 min nach Auslösen des Phosphatmangels nicht induziert wurden (Abb. 2). Eine Ausnahme bildete das *pstSCAB*-Operon, welches durch Phosphatmangel induziert wurde, allerdings schwächer als in *C. glutamicum* WT. Aus diesen Analysen sowie durch Bestimmung der RNA-Spiegel in Primerextensionanalysen des *pstS*-Gens (Kocan 2005; Kocan et al. 2006) wurde geschlossen, dass die Phosphatmangelinduktion von *pstSCAB* auch in Abwesenheit von PhoRS durch mindestens einen weiteren Regulator gewährleistet werden muss (Kocan 2005; Kocan et al. 2006).

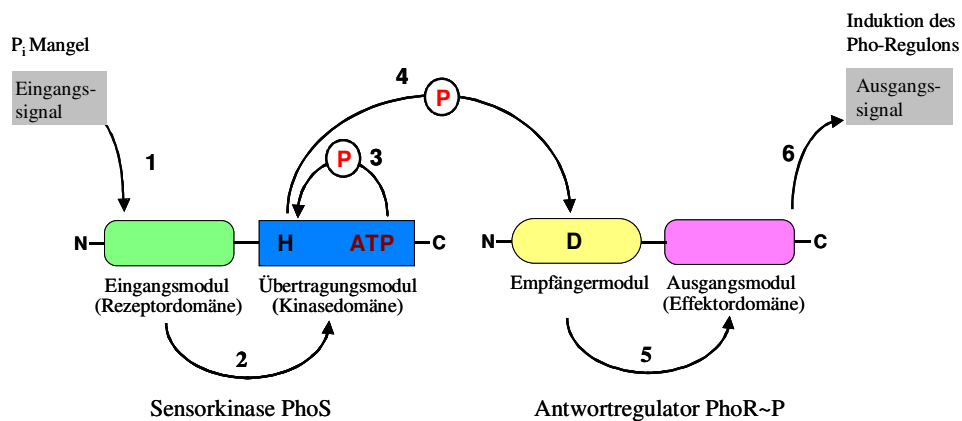


Abb. 3: Modell der Signalübertragung im Zweikomponentensystem PhoRS in *C. glutamicum*. Phosphatmangel ist das direkte oder indirekte Eingangssignal, das von der Rezeptordomäne der Sensorkinase PhoS dedektiert wird (1). Dadurch verändert sich die Konformation der Rezeptordomäne und das Signal wird auf die Kinasedomäne übertragen (2). Diese autophosphoryliert einen konservierten His-Rest (H) (3) und transferriert die energiereiche Phosphatgruppe an den konservierten Asp-Rest (D) des Empfängermoduls des Antwortregulators PhoR (4). Durch Konformationsänderung im Empfängermodul von PhoR gelangt das Signal ins Ausgangsmodul (5). PhoR~P ist auf diese Weise aktiviert und induziert die Gene des Pho-Regulons (6).

Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung und Charakterisierung des/der PhoRS unabhängigen Regulators/en des *pstSCAB*-Operons. Dazu sollten durch die Deletionsanalyse des *pstSCAB*-Operons cis-regulatorische Sequenzen für die PhoR-unabhängige und PhoR-abhängige Regulation identifiziert werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Analysen sollten Sequenzen des *pstSCAB*-Promotors für DNA-Affinitätschromatographieexperimente ausgewählt werden. Mit Hilfe der DNA-Affinitätschromatographie sollten die Regulatoren identifiziert werden, die neben PhoR an der Transkriptionsregulation des *pstSCAB*-Operons beteiligt sind. Die identifizierten Regulatoren sollten im Anschluss biochemisch, genetisch und physiologisch charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Bakterienstämme und Plasmide

Bakterielle Stämme und Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Stämme und Plasmide, die in dieser Arbeit benutzt wurden.

Stamm oder Plasmid	Relevante Charakteristiken	Referenz
ATCC 13032	Wildtyp	(Abe et al. 1967)
DH5 α	<i>F^{thi}-1 endA1 hsdR17(r⁻, m⁻) supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) recA1 gyrA96 relA1</i>	(Hanahan 1985)
Δ phoRS	Deletion des Zweikomponentensystems PhoRS	(Kocan et al. 2006)
Δ ramB	Deletion des Transkriptionsregulator RamB	(Gerstmeir et al. 2004)
pGEM-T	Vektor für Blau-Weiß-Selektion	Promega, WI, USA
pET2	Promotor-Testvektor	(Vasicova et al. 1998)
pET2_ <i>R-1F0</i>	pET2-Vektor mit R-1F0-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R0F0</i>	pET2-Vektor mit R0F0-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R1F0</i>	pET2-Vektor mit R1F0-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R2F0</i>	pET2-Vektor mit R2F0-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R3F0</i>	pET2-Vektor mit R3F0-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R0F1</i>	pET2-Vektor mit R0F1-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R0F2</i>	pET2-Vektor mit R0F2-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET2_ <i>R0F3</i>	pET2-Vektor mit R0F3-Fragment des <i>pstSCAB</i> -Promotors	diese Arbeit
pET16b	Amp ^R ; Vektor für die Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , fügt einen N-terminalen Decahistidin-Affinitätstag an das synthetisierte Protein (pBR322 <i>ori</i> VE.c., <i>PT7</i> , <i>lacI</i>)	Novagen, San Diego, USA
pET16b_ <i>glxR</i>	Amp ^R ; pET16b-His-Tag Derivat für die Überproduktion von GlxR mit einem N-terminalen Histidintag	diese Arbeit
pET16b_ <i>cgtR4</i>	Amp ^R ; pET16b-His-Tag Derivat für die Überproduktion von CgtR4 mit einem N-terminalen Histidintag	diese Arbeit
pET16b_ <i>NCgl1401</i>	Amp ^R ; pET16b-His-Tag Derivat für die Überproduktion von NCgl1401 mit einem N-terminalen Histidintag	diese Arbeit

Stamm oder Plasmid	Relevante Charakteristiken	Referenz
pET29b	Kan ^R ; Vektor für die Überexpression von Genen in <i>E. coli</i> , fügt einen C-terminalen Hexahistidin-Affinitätstag an das synthetisierte Protein (pBR322 <i>ori</i> ^{<i>VE.c.</i>} , <i>PT7</i> , <i>lacI</i>)	Novagen, San Diego, USA
pET29b- <i>ramB</i>	Kan ^R ; pET16b-His-Tag Derivat für die Überproduktion von RamB mit einem N-terminalen Histidintag	(Gerstmeir et al. 2004)
pVWEx1	Kan ^R ; Vektor zur homologen Überexpression von Genen in <i>C. glutamicum</i> (<i>P</i> _{tac} , <i>lacI</i> ^{<i>q</i>})	(Peters-Wendisch et al. 2001)
pVWEx1- <i>glxR</i>	Vektor zur homologen Überexpression von GlxR und einer artifiziellen RBS in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

3.2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg), verwendet. Die Bestandteile für komplexe Nährmedien stammten von den Difco-Laboratories (Detroit, MI, USA).

3.2.1. Nährmedien

Nährmedien für *E. coli*

Zur Kultivierung der *E. coli* Stämme wurde ausschließlich Luria-Bertani-(LB)-Medium verwendet (Sambrook et al. 1989). Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen zur Aufnahme von DNA durch Hitzeschock erfolgte mit SOB-Medium (Hanahan 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in LB-Medium überführt. Auch die Stammhaltung erfolgte in LB-Medium. Zur Selektion rekombinanter Stämme wurden dem Medium gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt.

Nährmedien für *C. glutamicum*

Zur Stammhaltung und DNA-Isolierung wurde LB-Medium verwendet. Als Vollmedium für Vorkulturen wurde BHI-Komplexmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) eingesetzt. Für Kultivierungen wurde das CGXII-Minimalmedium (Keilhauer et al. 1993) mit 40g/l Glucose und 0,03 g/l Protokatechusäure benutzt. Dieses Medium besitzt durch den Zusatz von 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) sehr gute Puffereigenschaften im pH-Bereich um 7,0. Die Herstellung kompetenter Zellen zur Aufnahme von DNA durch Elektroporation erfolgte unter Verwendung von BHIS-Vollmedium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbit) (Tauch et al.

2003). Dieses wurde außerdem zur Regeneration nach der Elektroporation eingesetzt. Die Selektion rekombinanter Stämme wurde durch die Zugabe von Antibiotika durchgeführt.

3.2.2. Medienzusätze

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden dem Medium Antibiotika in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Kanamycin oder Ampicillin 50 µg/ml (unmittelbar nach der Transformation und zur Vermeidung des Plasmidverlusts).

Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme erfolgte mit:

Kanamycin 50 µg/ml (unmittelbar nach der Transformation und zur Vermeidung des Plasmidverlusts).

Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 1,8% (w/v) Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) zugegeben.

3.2.3. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese enthielten jeweils 50 ml Medium. Für Kultivierungen zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium im Reagenzglas eingesetzt. Kulturen im Reagenzglas wurden bei 170 rpm, alle übrigen Kulturen bei 120 rpm inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug 37 °C für *E. coli* und 30 °C für *C. glutamicum* ATCC 13032.

3.2.4. Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 75% (v/v) einer LB-Übernachtskultur und 25% (v/v) sterilem Glycerin bestanden (Sambrook et al. 1989). Diese Dauerkulturen wurden bei -70°C gelagert und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet. Im Fall von *E. coli* wurden diese Stammhaltungsplatten für 18 h bei 37°C bzw. im Fall von *C. glutamicum* für 48 h bei 30°C inkubiert, dann bei 4°C gelagert und nach spätestens 14 Tagen erneuert.

3.2.5. Anzucht für die Primerextensionsanalyse und die Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests

Für die Primerextensionsanalyse von *C. glutamicum* WT ATCC 13032 und der $\Delta phoRS$ Mutante wurde die Kultivierung auf CGXII-Minimalmedium durchgeführt (Keilhauer et al. 1993). Vorkulturen in 5 ml Luria-Bertani (LB) Medium wurden von frischen LB-Agarplatten

(Sahm et al. 2000) angeimpft und bei 30°C sowie 170 rpm in Reagenzgläsern inkubiert. Die geernteten Bakterien wurden benutzt, um Vorkulturen bei einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm (OD_{600}) in 60 ml CGXII-Medium (Keilhauer et al. 1993), einschließlich 0,03 g/l Protokatechusäure mit 40 g/l Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle, anzuimpfen. Die Kulturen wurden bei 30°C und 120 rpm auf einem Rotationsschüttler in Erlmeyerkolben mit Schikanen inkubiert. Nach dem über Nacht Wachstum wurden die Zellen bei 4°C geerntet, mit phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen, und verwendet, um 60 ml CGXII Medium mit einer ausreichenden Phosphatkonzentration (13 mM) bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 anzuimpfen. Die Hauptkulturen wurden bis in die Mitte der exponentiellen Phase (OD_{600} 4 – 5) kultiviert. Ein Aliquot wurde für die RNA-Präparation (0 min) benutzt. Der Rest der Kulturen wurde mit phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und verwendet, um 60 ml CGXII-Minimalmedium mit einer limitierten Phosphatkonzentration (0,065 mM) anzuimpfen. Nach der Phosphatreduktion im Medium wurden die Zellen 90 min kultiviert und danach geerntet. Für die Chloramphenicolacetyltransferase(CAT)-Enzymtests wurden die Kulturen nach der Vorkultivierung wie oben beschrieben mit phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend benutzt, um 60 ml phosphatfreies CGXII-Minimalmedium anzuimpfen. Die Zellen wurden für 10, 30, 60, 90 und 120 min nach der Phosphatreduktion kultiviert und danach geerntet.

3.2.6. Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen für *C. glutamicum* WT und die Deletionsmutante $\Delta phoRS$

C. glutamicum WT und die Deletionsmutante $\Delta phoRS$ wurden für 9 Stunden bei 30°C in 5 ml LB-Medium vorkultiviert. Diese Kulturen wurden verwendet, um 60 ml CGXII-Minimalmedium, das eine ausreichende Phosphatkonzentration (13 mM) enthielt bei einer OD_{600} von 0,6 in 500 ml Schüttelkolben anzuimpfen. Nach 24 Stunden bei 30°C und 120 rpm wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert bei 4°C und einmal mit CGXII-Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle und Phosphat gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 60 ml phosphatfreien CGXII-Minimalmedium kultiviert, um die internen Phosphorspeicher zu verbrauchen (Lambert et al. 2002; Ishige et al. 2003), wobei bei einer OD_{600} von 0,6 gestartet wurde. Nach 24 h bei 30°C und 120 rpm, wurden die Zellen erneut geerntet und gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 10 ml CGXII-Minimalmedium mit vier verschiedenen Phosphorquellen kultiviert: 0,065 mM Phosphat, 1 mM Adenosine 5'-monophosphate (AMP), 1 mM L- α -Glycerinphosphate (G3P) und 1 mM UDP-Glucose (UDP-Glu). Die

Kultivierungsdauer betrug 176 h. Angeimpft wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 in 100 ml Schüttelkolben.

3.2.7. Anzucht von Kulturen für die mRNA-Degradationsexperimente

C. glutamicum WT wurde frisch auf LB-Platten ausgestrichen und nach 24 h auf 5 ml LB-Kulturen überimpft. Diese wurden benutzt, um 60 ml CGXII-Minimalmedium mit 4% (w/v) Glucose sowie 13 mM Phosphat mit einer OD₆₀₀ von 0,6 anzuimpfen. Nach 24 h wurden die Vorkulturen pelletiert und das Pellet mit CGXII-Minimalmedium gewaschen. Das resuspendierte Pellet wurde anschließend für das Animpfen der Hauptkultur (CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose und 13 mM Phosphat) bei einer OD₆₀₀ von 0,6 genutzt. Beim Erreichen der OD₆₀₀ von 4 wurde die Transkription in *C. glutamicum* WT durch Zugabe von 0,25 g/l Rifampicin (Abb. 27) abgestoppt. Das Antibiotikum Rifampicin inhibiert die β -Untereinheit der RNA-Polymerase, so dass keine Transkription mehr stattfindet (Campbell et al. 2001). Auf diese Weise ist es möglich den RNA-Umsatz aller im Organismus vorkommenden Gene zu berechnen und in funktionelle Gruppen einzuteilen, wie das schon für *E. coli* und *B. subtilis* durchgeführt worden ist (Bernstein et al. 2002; Condon 2003; Selinger et al. 2003). Die Kulturen wurden anschließend sofort geerntet (t = 0) oder weiter inkubiert, so dass die Degradation der mRNA über einen bestimmten Zeitraum verfolgt werden konnte. Für *C. glutamicum* wurden die Zeitpunkte 0, 4 min, 8 min, 16 min und 32 min gewählt. Die Ernte sowie die Präparation der RNA erfolgte so wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben.

3.3. Molekulargenetische Methoden

3.3.1. Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA von *C. glutamicum* wurde nach Eikmanns *et al.* (Eikmanns et al. 1994) isoliert. Nach Aufschluss der Zellen (Lysozym- und SDS-Behandlung) und enzymatischer Proteolyse wurden noch verbleibende Peptide sowie die Proteinase K durch Aussalzen mit NaCl entfernt. Nach Zentrifugation (30 min, 5000 g) wurde die genomische DNA durch Ethanolfällung aus dem Überstand isoliert und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1mM EDTA) gelöst.

3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim and Doly 1979) und Silikatadsorption unter Verwendung des *QIAprep Spin Miniprep*

Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5) eluiert. Die Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA mit höherer Reinheit, die zur präparativen Restriktion eingesetzt wurde, wurde mit Hilfe des *QIAFilter Plasmid Purification Kits* (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* nach denselben Protokollen war aufgrund der besonders stabilen Zellwand zur effektiven Lyse der Bakterienzellen ein vorhergehende Behandlung der Zellen mit Lysozym (15 mg/ml) erforderlich.

3.3.3. RNA-Präparation

Aliquots (~25 ml) von exponentiell gewachsenen *C. glutamicum* Kulturen wurden bei einer optischen Dichte von 4-6 bei OD₆₀₀ auf 25 g Eis gegeben, vorgekühlt auf -20°C und sofort nach der Zentrifugation geerntet (5 min, 3500 x g, 4°C) wie es kürzlich für *E. coli* (Wendisch et al. 2001) beschrieben worden ist. Die Zellen wurden in 350 µl of RNeasy RLT-Puffer (QIAGEN, Hilden) resuspendiert und anschließend mechanisch durch 30-sekündige Behandlung im Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) mit 0,5 g 0.1 mm Zirconia/Silica Beads (Roth, Karlsruhe) aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation (2 min, 14500 x g) wurde der Überstand durch das RNeasy System mit DNase Behandlung auf der dazugehörigen Säule aufgearbeitet, wie es im Protokoll des Herstellers für RNA 1 Extraktion (QIAGEN, Hilden) beschrieben ist. Die Quantität und Qualität der extrahierten Gesamt-RNA wurde durch denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese (29) und spektrophotometrisch (bei 260, 280 und 230 nm) im Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000 BeQLab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Die RNA wurde bei -70°C bis zur Benutzung gelagert.

3.3.4. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch im Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000 BeQLab Biotechnologie GmbH) durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit wurde mit Hilfe der Quotienten E260/E280 (Proteinverunreinigung) und E260/E230 (Kohlenhydratverunreinigung) überprüft. Die Werte dieser Quotienten sollten zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989).

3.3.5. Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA

Alle Techniken zur Restriktion, Präzipitation sowie Behandlung mit dem Klenow-Fragment oder alkalischer Phosphatase wurden nach Sambrook *et al.* (Sambrook et al. 1989)

durchgeführt. Für einen analytischen Verdau wurde ein Reaktionsansatz von 10 µl gewählt. Darin wurden 0,5 µg DNA und 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym für eine vollständige Restriktion eingesetzt. Bei einer Restriktion im präparativen Maßstab umfasste der Ansatz 50 µl, und es wurden 1 – 2 µg DNA und 10 – 20 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in Abhängigkeit ihrer Größe in 0,8 – 2%igen TAE- (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,35% (v/v) Essigsäure, pH 8,0)-Agarosegelen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente für weitere Klonierungen benötigt, so wurde die DNA unter Verwendung des *MinElute Gel Extraction Kits* (QIAGEN, Hilden) aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Die PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden und der Polymerase mit einem auf Silikagel-Membran basierendem Verfahren (*PCR-Purification Kit*, QIAGEN, Hilden) gereinigt und in Tris/HCl pH 8,5 oder Wasser eluiert. Zur Modifikation überhängender 3'-Enden wurden diese mit Hilfe des großen Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) zu glatten Enden abgebaut (Sambrook et al. 1989). Um das Religieren linearisierter Vektoren zu vermeiden, sind diese mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) am 5'-Ende dephosphoryliert worden. Ligationen wurden mit Hilfe des *Rapid Ligation Kits* (Roche Diagnostics, Mannheim) für 15 min bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C über Nacht durchgeführt.

3.3.6. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente sowohl der in *in vitro*-Verfielfältigung von DNA-Fragmenten (Saiki et al. 1988; Tindall and Kunkel 1988), als auch der analytischen Überprüfung von Deletionsmutanten. Dabei wurden jeweils zwei synthetische Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Als Matrize wurde üblicherweise chromosomale DNA von *C. glutamicum* eingesetzt. Die Durchführung der PCR erfolgte mittels eines Thermocyclers Gene Amp PCR System 9700 (Perkin & Elmer). Zur Denaturierung der DNA wurde eine Temperatur von 95°C verwendet. Die *annealing*-Temperatur der eingesetzten Primer (Tab. 2) wurde nach folgender Formel, der die Basenpaarzusammensetzung zugrunde liegt, berechnet:

$$T_{annealing} = 2^{\circ}\text{C} (\text{pro AT-Paar}) + 4^{\circ}\text{C} (\text{pro GC-Paar}) - 4^{\circ}\text{C} \quad (\text{Sambrook et al. 1989})$$

Die Polymerisation der DNA fand bei 72°C statt, wobei sich die Elongationszeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments richtet hat. Die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Novagen) ist in der Lage, etwa 1000 Basen pro Minute zu amplifizieren, so dass sich die Polymerisationszeit durch Multiplikation der Länge des erwarteten Fragments

(in kb) mit 1 min errechnen ließ. Soweit nicht anders angegeben, wurden 25 Zyklen durchgeführt. Zur Vervielfältigung fehlerfreier Gensequenzen, die für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde das *Expand High Fidelity* PCR System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) benutzt. Dieses enthält neben der *Taq*-Polymerase auch die *Tgo*-Polymerase aus *Thermococcus gorgonarius*, die durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität in der Lage ist, Sequenzfehler zu korrigieren (Barnes 1994). Im Anschluss an die PCR-Reaktionen wurden 5 µl des Ansatzes entnommen und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Sofern die amplifizierten PCR-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, erfolgte eine Aufreinigung mit dem *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden).

3.3.7. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Agarose-Gelelektrophorese, Isolierung von DNA

Für die Größenselektion von DNA-Fragmenten zur Identifizierung oder Reinigung wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt (Sambrook et al. 1989). Je nach Fragmentgröße wurden 0,8 - 2%ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Letzterer diente auch als Laufpuffer. Die DNA-Probe wurde mit 6 x Ladepuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau in 40% (v/v) Glycerin) versetzt und anschließend auf dem Agarosegel in einer horizontalen Gelapparatur Sub-Cell GT (Gio-Rad, Hercules, USA) aufgetrennt. Zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung wurden die Standards 100 bp DNA Ladder (GIBCO, Karlsruhe), Standard XVI (Roche, Mannheim) sowie *Bst*EII- oder *Hind*III-verdaute DNA des Phagen λ benutzt. Nach Auftrennung bei 75 – 90 V wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 mg/l) gefärbt, überschüssiges Ethidiumbromid mit Wasser entfernt und das Gel unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm mit einem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) fotografiert.

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem *MinElute Gelextraction Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Methode beruht auf der Freisetzung der DNA durch Aufschmelzen der Agarose und selektiver Bindung an eine Matrix, von der die Nukleinsäure anschließend isoliert werden kann.

RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität isolierter RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Sambrook et al. 1989). Dabei wurde MOPS-Puffer (10 x

MOPS-Puffer, Eppendorf, Hamburg) als Laufpuffer und zur Herstellung des Gels (0,25 g Agarose, 2,5 ml 10 x MOPS, 18,25 ml ddH₂O, 4,25 ml Formaldehyd) verwendet. Das eingesetzte Formaldehyd wurde mit dem Ionenaustauscher (AG 501-X8 (D) Resin 20-50mesh, BIORAD) entionisiert. Die RNA-Proben (0,5 µg) wurden vor der Elektrophorese in *RNA Gel Loading Buffer* (Eppendorf) mit 0,7% (v/v) 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung 10 min bei 65°C und dann 5 min auf Eis inkubiert. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit dem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) unter UV-Licht ($\lambda = 312$ nm) fotografiert.

3.3.8. Transformation von Bakterien

Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Steigerung der Kompetenz von *E. coli* wurden Zellen mit Rubidiumchlorid behandelt (Hanahan 1985). Dafür wurden die Zellen in 50 ml SOB-Medium kultiviert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 geerntet. Die weitere Durchführung erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan 1985). Zur Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Durch eine anschließende 20-minütige Inkubation auf Eis sollte die Anlagerung der DNA an die Zellen erreicht werden. Ein kurzer Hitzeschock (42°C für eine Minute) diente der Unterstützung der DNA-Aufnahme in die Zellen. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration für 45 min bei 37°C in 500 µl LB-Medium kultiviert. Diese Zeit ermöglichte sowohl die Regeneration der Zellen als auch die Ausprägung der Resistenz vor dem Ausplattieren auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten.

Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch et al. 2003). Hierzu wurden 50 ml BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbit) mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml dieser Vorkultur in 250 ml BHIS-Medium überimpft (2 l Kolben mit zwei seitlichen Schikanen) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 – 1,75 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen in zwei JA-14 Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (20 min, 6000 g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 20 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,5) und weitere zweimal mit 50 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen, danach in 1 ml eiskaltem 10%igem

(v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung fand bis zur Verwendung bei -70°C statt. Zur Elektroporation wurden 100 µl Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt, luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, BIORAD, München) überführt und mit 0,8 ml 10%igem (v/v) sterilem Glycerin überschichtet. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER (BIORAD, München). Unmittelbar nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in ein steriles Eppendorfgefäß mit 1 ml BHIS-Medium überführt und für 6 min bei 46°C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert wahrscheinlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, so dass bei der Verwendung von heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schafer et al. 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen zur Regeneration für 50 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellsuspension auf antibiotikahaltige BHIS-Platten ausplattiert wurde.

3.3.9. Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzierung klonierter DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger et al. (Sanger et al. 1977). Die nach der Aufreinigung durch das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Hilden) hochreine DNA wurde von der Firma AGOWA (Berlin) sequenziert. Zur Analyse von Restriktionsschnittstellen und offenen Leserahmen wurde das Programm Clon Manager (Version 6; Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA) verwendet. Die Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit bearbeiteten Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme BLASTX, BLASTN und BLASTP (Altschul et al. 1997), mit den am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) zur Verfügung stehenden Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mit der Datenbank des *European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.embl-heidelberg.de>) und mit Hilfe von ERGO (Integrated Genomics, Chicago, USA) durchgeführt.

3.3.10. Konstruktion der Transkriptionsfusionen

Verschiedene Teile der stromaufwärts gelegenen Region des *pstSCAB*-Operons wurden mit den Primern pstsR-1, pstsR0, pstsR1, pstsR2, pstsR3, pstsF0, pstsF1, pstsF2 und pstsF3 amplifiziert. Der amplifizierte vollständige Promotor R-1F0 und die Fragmente R0F0, R0F1, R0F2, R0F3, R1F0, R2F0 und R3F0 (Fig. 5 A) wurden in den pGEM-T-Vector (Promega,

WI, USA) und anschließend in den Promotor-Testvektor pET2 kloniert (Vasicova et al. 1998). Der Promotor und alle Fragmente wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft (AGOWA, Berlin, Deutschland). Der Fusionsvektor pET2_R-1F0 und die verkürzten Promotorfragmente wurden durch Elektroporation sowohl in *C. glutamicum* WT als auch in die $\Delta phoRS$ -Mutante eingeführt. Für die Elektroporation wurden die folgenden Bedingungen angewendet: 25 μ F, 600 Ω und 2,5 kV/cm (BIORAD Gene Pulser Xcell, BIORAD Laboratories, Hercules, Canada). Nach der Elektroporation wurde in die Proben 1 ml BHI/Sorbitol-Medium (van der Rest et al. 1999) pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 6 min bei 46°C inkubiert. Die Regeneration fand für 50 min bei 30°C statt. Die Aktivität des Promotors R-1F0 bzw. der Fragmente wurde als Chloramphenicolacetyltransferase-Aktivität (Abb. 7 und 8, (Netzer et al. 2004)) gemessen. Die Kultivierungen für *C. glutamicum* Wildtyp (pET2_R-1F0, pET2_R0F0, pET2_R1F0, pET2_R2F0, pET2_R3F0, pET2_R0F1, pET2_R0F2 and pET2_R0F3) und die Deletionsmutante $\Delta phoRS$ (pET2_R-1F0, pET2_R0F0, pET2_R1F0, pET2_R2F0, pET2_R3F0, pET2_R0F1, pET2_R0F2 and pET2_R0F3) wurden so durchgeführt wie es am Anfang dieses Kapitels für die Phosphatmangelexperimente beschrieben ist. Die Chloramphenicolacetyltransferase-Aktivitäten wurden auf dieselbe Weise bestimmt wie es in der Literatur und unter Punkt 3.4.4. beschrieben wurde (Vasicova et al. 1998). Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Bradfordtests (BIORAD, München) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard ermittelt.

3.4. Biochemische Methoden

3.4.1. Präparation der Überstände für das Messen der Enzymaktivitäten

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die Zellen von den Medienüberständen durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Die Überstände wurden durch einen 0,2 μ m Sterilfilter (Millipore, Bedford, USA) gegeben und durch Ultrafiltration über Amicon Ultra MW 10.000 membranes (Millipore, Bedford, USA) ca. 50-fach aufkonzentriert. Die Überstände wurden benutzt, um die 5'-Nukleotidaseaktivität und die UDP-Glucoseaktivität zu bestimmen, da das Protein UshA, das beide Enzymaktivitäten zeigt, von *C. glutamicum* WT bei Phosphatmangel sezerniert wird (Rittmann et al. 2005).

3.4.2. 5'-Nukleotidasetest

Die 5'-Nukleotidaseaktivität wurde wie beschrieben (Rittmann et al. 2005) bestimmt, wobei eine Modifikation des Testes nach Edwards *et al.* verwendet wurde (Edwards et al. 1993). Die

Reaktionen von 1 ml enthielten 75 mM Natriumacetat, pH 6,0, 4,5 mM CoCl_2 und 14,5 mM CaCl_2 und wurden durch die Zugabe von 1 mM 5'-AMP gestartet. Danach wurden die Ansätze bei 37°C für 0, 1, 5, 10 und 15 min inkubiert bevor die Reaktion durch die Zugabe von 0,04 N HCl abgestoppt wurde. In der Reaktion wird Phosphat freigesetzt, wodurch sich die Aktivität der 5'-Nukleotidase bestimmen lässt. Dazu wird die abgestoppte Reaktion 5 min auf Eis inkubiert und danach für 5 min bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1% (w/v) Ascorbinsäure, 0,25% (w/v) Ammoniummolybdat und 0,6 N H_2SO_4 . Nach 20 min bei 45°C und zweifacher Verdünnung in Wasser wurde die Absorption bei 820 nm gemessen. Die Phosphatkonzentrationen wurden durch geeignete Standards ermittelt.

3.4.3. UDP-Zuckerhydrolasetest

Die UDP-Zuckerhydrolaseaktivität wurde bei 30°C in einem spektrophotometrischen Test wie kürzlich beschrieben durchgeführt (Edwards et al. 1993). Das Reaktionsvolumen von 1 ml enthielt 35 mM Tris-HCl, pH 8,0, 35 mM MgCl_2 , 3,1 μM Glucose-1,6-bisphosphat, 0,7 mM NADP^+ , Phosphoglucomutase aus Kanneinchenmuskel (1 U/ml) und Glucose-6-Phosphatedehydrogenase (2,5 U/ml) aus *Leuconostoc mesenteroides*. Durch Zugabe von 1,4 mM UDP-Glucose wurde die Reaktion gestartet. In der Reaktion wurde durch die Aktivität der UDP-Zuckerhydrolase Glucose-1-Phosphat gebildet, indem Glucose-6-Phosphat schrittweise in 6-Phosphogluconat mit Hilfe der Enzyme Phosphoglucomutase und Glucose-6-Dehydrogenase konvertiert wurde. Als Nebenprodukt fand die Bildung von NADPH (ϵ 340 nm = 6.3 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) statt, das durch die Extinktion bei 340 nm gemessen werden konnte.

3.4.4. Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests

Für die Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtests (Vasicova et al. 1998) fand die Kultivierung so statt wie unter Punkt 3.2.5. beschrieben. Vor dem Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 30 ml 0,08 M Tris-HCl-Puffer (pH: 7) gewaschen und dann in 1 ml desselben Puffers resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mittels Ultraschall (Ultraschallprozessor UP 2000s, Dr. Hielscher GmbH) aufgeschlossen. Der Aufschluss fand für 9 min auf Eis statt. Im Anschluss daran wurden Zelltrümmer und noch intakte Zellen bei 13000 g und 4°C für 1 h abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde dann der Chloramphenicolacetyltransferase-Enzymtest durchgeführt. Dafür wurden in einer Küvette 100 μl 0,9 M Tris-HCl (pH: 7,8), 100 μl 0,9 M frisch angesetztes Acetyl-Coenzym A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 100 μl frisch angesetztes DTNB (3,6 mg/ml) in 0,3 M Tris/HCl (pH: 7), 10 μl Probe und 590 μl

ddH₂O gemischt. Die Küvette wurde im Photometer (UV-1601PC, Shimadzu) bei 37°C für 5 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Hintergrund gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2,5 mM Chloramphenicol gestartet. Dabei wurde die Promotoraktivität durch das Reportergen, das für die Chloramphenicolacetyltransferase kodiert, gemessen. In der Reaktion kommt es zur Abnahme von Acetyl-Coenzym A und zur Bildung von HS-Coenzym A, da der Acetylrest durch die Chloramphenicolacetyltransferase auf Chloramphenicol übertragen wird. Es können drei Reaktionsprodukte entstehen: 3'-Acetyl-Chloramphenicol, 1'-Acetyl-Chloramphenicol sowie bei hoher Expression der Chloramphenicolacetyltransferase 1,3-Diacetyl-Chloramphenicol. Der Nachweis erfolgt mit dem entstandenen HS-Coenzym A. Die Thiolgruppe des HS-Coenzym A reagiert mit dem Farbstoff DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) unter Spaltung der Disulfidgruppe des DTNB. Es entsteht ein neues Disulfid mit HS-Coenzym A, während ein Molekül TNB (2-Nitro-5-Thiobenzoessäure) freigesetzt wird. TNB ist intensiv gelb gefärbt und wird bei 412 nm im Photometer gemessen. DTNB ist auch als Ellman Reagenz bekannt, wobei der Nachweis Ellman-Reaktion heißt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen im Enzym-Rohextrakt wurde nach der Bradford-Methode (Bradford 1976) mit dem Bradford-Reagenz von Sigma (Taufkirchen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 50 µl Probe mit 1,5 ml Bradford-Reagenz versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und die Extinktion der entstandenen Protein-Brilliantblau G-Komplexe photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin erstellt.

3.5. DNA-Chip-Technologie

In dieser Arbeit wurden DNA-Chips verwendet, die auf PCR-Produkten von *C. glutamicum*-Genen basierten (Lange et al. 2003; Sindelar 2003; Wendisch 2003a). Jeweils zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden wurden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert (Shalon et al. 1996; Zimmer et al. 2000; Wendisch et al. 2001; Rhodius et al. 2002; Khodursky et al. 2003). Die DNA-Chips wurden sowohl für globale Expressionsanalysen zur Untersuchung differentieller Genexpression wie auch für Genomhybridisierungen zum Vergleich der chromosomalen Kopienzahl von Genen eingesetzt. Die verwendete DNA-Chip-Technologie und das Robotersystem zur Herstellung

der DNA-Chips beruhen auf dem an der Stanford-Universität entwickelten System (Shalon et al. 1996).

Detaillierte Protokolle hierzu sind über <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html> im Internet verfügbar.

3.5.1. Herstellung von *C. glutamicum*-DNA-Chips

DNA Microarrays basieren auf PCR-Produkten von *C. glutamicum* Genen, die für die globale Genexpressionsanalyse hergestellt wurden. Dabei wurde so vorgegangen wie in den folgenden Veröffentlichungen angegeben (15, 23, 36, 37). Die Gene wurden in 96 Wellplatten mit genomischer DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 als Matrize mit genspezifischen Primern, die von der Firma Degussa (Frankfurt, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden, amplifiziert. Die Identität und Qualität der PCR-Produkte wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Isopropanol präzipitiert, in 3 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat pH 7.0) resuspendiert und in 384 Wellplatten transferiert (Zimmer et al. 2000; Wendisch et al. 2001; Polen 2002). Die Glasobjektträger (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) wurden mit ethanolischer Natriumhydroxid-Lösung gereinigt, mit 17% (v/v) Poly-L-Lysin beschichtet, mit Wasser gewaschen und getrocknet (Zimmer et al. 2000; Polen 2002). Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte mittels eines computergesteuerten Robotersystems (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) an definierten Positionen auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgetragen (Polen et al. 2003). Um Alterungsprozesse zu verlangsamen, wurden die DNA-Chips anschließend in einem Exsikkator gelagert. Je nach Serie enthielten die DNA-Chips PCR-Produkte für bis zu 3530 der zunächst vorhergesagten 3567 offenen Leserahmen (Sindelar 2003), so dass 2860 der aktuell angenommenen 2994 offenen Leserahmen von *C. glutamicum* (NCBI NC003450) und 284 weitere, putativ kodierende Sequenzen abgedeckt werden konnten (Kalinowski et al. 2003; Wendisch 2003b). Zur Normierung und als Positivkontrolle wurde genomische *C. glutamicum*-DNA an bis zu 196 Positionen aufgebracht. Als Negativkontrolle dienten λ -DNA, genomische *E. coli*-DNA, das *E. coli aceK*-Gen und sechs verschiedene Plasmide (Sindelar 2003).

3.5.2. Nachbehandlung von DNA-Chips

Zur Absättigung freier ϵ -Aminogruppen des Poly-L-Lysins sowie zur Immobilisierung und Denaturierung der DNA wurden die DNA-Chips vor der Hybridisierung

fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden chemisch und thermisch behandelt. Dazu wurden die fertigen DNA-Chips in 1 x SSC Atmosphäre rehydratisiert, anschließend bei 100°C für 2 – 3 sec getrocknet, um gleichmäßigere und größere Hybridisierungssignale erzielen zu können. Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (650 µJ; Stratalinker, Stratgene, La Jolla, USA) kovalent an die Poly-L-Lysin-Beschichtung gebunden (Shalon et al. 1996; Polen 2002). Freie ε-Aminogruppen von Poly-L-Lysin-Molekülen wurden durch die Derivatisierung mit 180 mM Bernsteinsäureanhydrid blockiert, um eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonden zu verhindern (Shalon et al. 1996; Polen 2002). Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurden die DNA-Chips für 1,5 min in 95°C heißem Wasser inkubiert und die Einzelstränge anschließend durch Inkubation in kaltem Ethanol fixiert (Shalon et al. 1996; Polen et al. 2003). Nach Trocknung durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurden die DNA-Chips bis zur Hybridisierung in einem Exsikkator gelagert.

3.5.3. Synthese fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden

Zum Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden von äquivalenten Mengen (25 µg) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) mit 500 ng Zufalls-Hexamerprimern (Invitrogen, Karlsruhe), wobei 3 nmol der fluoreszenzmarkierten dUTP-Analoga FluoroLink Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Ex max}} 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM max}} 570 \text{ nm}$ /grünfluoreszierend oder $\lambda_{\text{Ex max}} 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM max}} 670 \text{ nm}$ /rotfluoreszierend; Amersham Pharmacia, Freiburg) zugesetzt wurden (Wendisch et al. 2001; Polen 2002; Khodursky et al. 2003). Nach Hydrolyse der RNA in 25 mM NaOH (10 min, 70°C), wurde die Sonde mit HCl neutralisiert und mit Hilfe von Microcon YM-30 Säulen (Millipore, Schwalbach) nicht unter Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide eingeeengt (Khodursky et al. 2003; Polen et al. 2003). Die bei einem dritten Reinigungsschritt mit den Microcon-Säulen vereinigten fluoreszenzmarkierten Sonden wurden direkt zur DNA-Chip-Hybridisierung eingesetzt.

3.5.4. DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde je eine Cy3- und Cy5-markierte Sonde gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Den vereinigten Sonden wurden 2 µg poly(A) als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz zugefügt. Der Sondenmix wurde in 3 x SSC mit 30 mM HEPES (pH 7,0 = zur Sicherung stringenter Hybridisierungsbedingungen und 0,3% (w/v) SDS zur Verringerung der

Oberflächenspannung aufgenommen. Die Hybridisierung erfolgte nach der Denaturierung für 2 min bei 100°C und Abkühlen bei Raumtemperatur (10 min) für 8 – 16 h bei 65°C (Zimmer et al. 2000).

3.5.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Hybridisierungssignale auf dem DNA-Chip gemessen, welche direkt mit der Menge gebundener, fluoreszenzmarkierter Signale korreliert. Nach der Hybridisierung und dem stringenten Waschen des DNA-Chips wurden hierzu orts aufgelöste Fluoreszenzintensitäten mit dem GenePix 4000A Laserscanner (Axon Inc., Union City, Kalifornien, USA) gemessen und als 16-bit-TIFF-Dateien elektronisch gespeichert (Software GenePix Pro 4.1, Axon Inc.). Die Anregung von Cy3-dUTP wurde mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 532 nm (Messung der Emission bei 570 nm), die von Cy5-dUTP mit 635 nm (Emission bei 670 nm) durchgeführt. Die Lichtemission wurde geräteintern mit lichtempfindlichen Kathoden registriert. Dabei wurde das Bild in Bildpunkte unterteilt, die jeweils einer Fläche von $10\ \mu\text{m}^2$ auf dem DNA-Chips entsprachen. Die Fluorogramme wurden quantitativ mit der GenePix-Software analysiert, wobei der Quotient der Mediane als Maß für das Verhältnis der roten zur grünen Fluoreszenz diente.

Zur Berechnung des Quotienten der Mediane wird vor der Bildung des Cy5/Cy3-Fluoreszenzverhältnisses die Hintergrundfluoreszenz ($I_{B\lambda 2}$ und $I_{B\lambda 1}$, Abb. 4C, I = Intensität) von der Signalfluoreszenz ($I_{P\lambda 2}$ und $I_{P\lambda 1}$, Abb. 4C) bei der entsprechenden Wellenlänge subtrahiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgt wie schematisch in Abb. 4B dargestellt. Die Bildpunkte des inneren Kreises bilden das Hybridisierungssignal, die lokale Hintergrundfluoreszenz wird vom zweifachen Radius des Hybridisierungssignals gebildet (schwarzer Kreis), wobei die Bereiche, die auf dem Hybridisierungssignal des nächsten Spots liegen, aus der Berechnung der Hintergrundfluoreszenz ausgeschlossen werden.

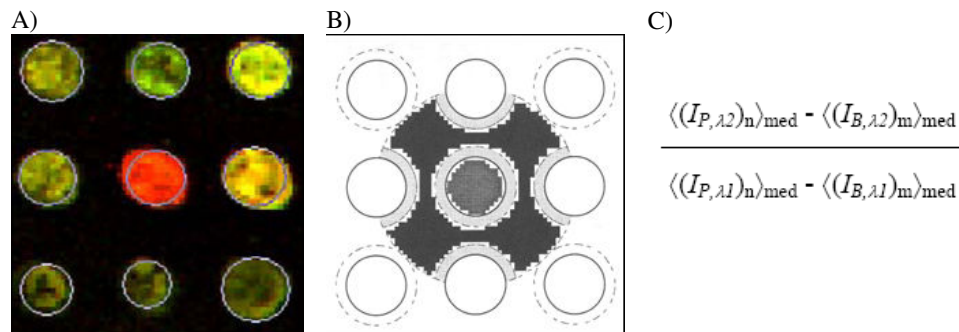


Abb. 4: Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen auf einem DNA-Chip mit der Software GenePix Pro 4.1. A) Ausschnitt aus einem Fluorogramm mit identifizierten Hybridisierungssignalen (Polen 2002) B) Schematische Quantifizierung der Hybridisierungssignal-Fluoreszenz (Handbuch zur GenePix 4.1 Software) C) Berechnung des Quotienten der Mediane eines Hybridisierungssignals (Handbuch zur GenePix 4.1 Software)

3.5.6. Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten

Um Unterschiede der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, zum Beispiel bei Einbau und Stabilität, ausgleichen zu können, wurden die erhaltenen Fluoreszenzverhältnisse durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor so normiert, dass der durchschnittliche Quotient der Mediane genomischer DNA von *C. glutamicum* den Wert 1 ergab (Zimmer et al. 2000; Wendisch et al. 2001; Khodursky et al. 2003). Um nur zuverlässige Hybridisierungssignale für die Normierung zu verwenden, wurden ausschließlich solche Signale berücksichtigt, deren Fluoreszenzintensität für wenigstens eine Wellenlänge mindestens dreifach über dem Hintergrund lag ($\text{Signal-/Rausch-Verhältnis} \geq 3$) und die optisch deutlich zu erkennen waren. Zu schwache Signale ($\text{Signal-/Rausch-Verhältnis} \leq 3$) wurden als nicht quantifizierbar angesehen. Um statistisch abgesicherte Aussagen treffen zu können, wurden die Experimente mehrfach wiederholt. Für statistische Analysen wurden p -Werte aus einem t -Test nach Student (einseitiger Test heteroskedastisch; TTest-Tabellenfunktion, Excel 2000, Microsoft, Refmond, USA) aus den logarithmierten mRNA-Spiegeln der Wiederholungsexperimente und den relativen Fluoreszenzverhältnissen der genomischen DNA von *C. glutamicum* als Kontrollgruppe berechnet. Bei einem p -Wert $\leq 0,05$ wurde die Veränderung des mRNA-Spiegels als signifikant erachtet (Lehnen et al. 2002; Polen 2002; Polen et al. 2003). Soweit nicht anders angegeben, wurden bei der Analyse von Genexpressionsveränderungen nach Genen mit signifikant im Durchschnitt mindestens zweifach verändertem relativem mRNA-Spiegel gesucht.

3.5.7. Archivierung von DNA-Chip-Daten

Zur Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten wurde die für das Computer-Betriebssystem Linux frei erhältliche relationale Datenbank MySQL (MySQL AB Company, Uppsala, Schweden, <http://www.mysql.com>) verwendet. Alle relevanten Daten wurden mit Hilfe einer von Tino Polen selbst entwickelten Software (Polen and Wendisch 2004) erfasst und zentral auf einem Linux-Server in einer MySQL-Datenbank hinterlegt, so dass sie über das institutsinterne Computernetzwerk für weitere Analysen zur Verfügung stehen.

3.6. Primerextensionsanalyse

Die nicht-radioaktive Primerextensionsanalyse wurde mit IRD800-markierten Oligonukleotiden (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) durchgeführt (Engels et al. 2004). Für die Primerextensionanalyse von *ushA* wurde ein mittels PCR amplifiziertes Produkt hergestellt, für das die Primer *ushA* 80 prext, *ushA1* und *ushA2* eingesetzt wurden. Für *nucH* wurde das PCR-Produkt über die Primer *nucH* 90 prext, *nucH1* and *nucH2* generiert. Für die Reaktion wurden 25 µg Gesamt-RNA mit 2 pmol markierten Oligonukleotiden und 2 µl 5x Annealingpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 1.25 M KCl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Die Reaktion wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und dann langsam auf (0.5°C/2 min) 42°C in einem Thermocycler abgekühlt. Für die Reverse Transkription wurden 23 µl Wasser mit 10 µl 5x reversem Transkriptionspuffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 125 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 µl 100 mM DTT, 1 µl Deoxyribonukleotide (25 mM ATP, CTP, GTP and TTP), 0,5 µl Actinomycin D (5 mg/ml in Ethanol) und 0,5 µl SuperScript II RNase H-Reverse Transkriptase (200 units/µl; Life Technologies, Bethesda, U.S.A.) gemischt. Die vorbereitete Mischung wurde der RNA sofort nach der Bindung der Primer (Annealing Step) hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 120 µl RNase A Reaktionsmix gestoppt (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 µg/ml sonifizierte Lachssperm DNA, 200 µg/ml RNase A, frisch hinzugegeben). Die Stoppreaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA über Nacht nach Zugabe von 17 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 380 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in 2 µl Wasser und 2 µl Formamidladebuffer (Epicentre Technologies Corp., Madison, U.S.A.) gelöst. Davon wurde 1 µl auf ein denaturierendes 4.6% (w/v) Long Ranger (Biozym, Hamburg) Sequenziergel (Trennlänge 42 cm) aufgetragen. Die Auftrennung fand in einem Long Read IR DNA Sequencer (Licor Inc., Lincoln, U.S.A.) statt. Die Länge des Reaktionsproduktes wurde dadurch bestimmt, dass vier Spuren der Sequenzierreaktion neben

das Reaktionsprodukt auf das Sequenziergel aufgetragen wurden. Dabei wurden dieselben Oligonukleotide benutzt, die auch für die reverse Transkription des Primerextensionsproduktes eingesetzt wurden.

3.7. Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von DNA-bindenden Proteinen wurden durchgeführt wie kürzlich beschrieben (Gabrielsen et al. 1989). Dazu wurden der vollständige Promotor R-1F0 bzw. die Fragmente R0F0 und R2F0 mittels PCR und genomischer DNA von *C. glutamicum* hergestellt. Als Oligonukleotide wurden pstsR0, pstsR-1, pstsR2 und pstsF0bio eingesetzt. Der Primer pstsF0bio wurde vorher an Biotin über einen TEG-Linker (Operon, Köln, Germany) gekoppelt. Auf diese Weise war es möglich den Promotor R-1F0 sowie die Fragmente R0F0 und R2F0 an die Dynabeads® zu binden. Dynabeads® Streptavidin (Dyna, Oslo, Norway) sind uniforme, supramagnetische „Kugeln“, an den aufgereinigtes Streptavidin (Dyna, Oslo, Norway) kovalent gebunden ist. Streptavidin ist ein Protein, das Biotin mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-15}$) bindet. Nicht eingebaute Oligonukleotide wurden über das *Quiaquick PCR Purificationkit* (QIAGEN, Hilden) entfernt. 100 pmol des Biotin markierten PCR Produkts wurden an 5 mg Dynabeads Streptavidin (Dyna, Oslo, Norway) gekoppelt. Nicht eingebaute DNA wurde über magnetische Trennung, wie es im Protokoll des Herstellers beschrieben ist, entfernt. Die mit dem jeweiligen PCR-Produkt hergestellten Dynabeads wurden bei 4°C gelagert. Direkt vor der Inkubation mit den Rohextrakten (s. u.) von *C. glutamicum*, wurden die mit den PCR-Produkten beladenen Dynabeads mit 300 µl Bindepuffer (20 mM Tris-HCl, pH: 7,5, 1 mM EDTA, 10% [v/v] Glycerin, 0,01% [v/v] Triton X-100, 100 mM NaCl and 1mM Dithiothreitol) für 2 min äquilibriert.

Für die Gewinnung der Rohextrakte wurden *C. glutamicum* Kulturen (1 l) auf CGXII-Minimalmedium je nach Experiment mit 40 g/l Glucose oder 20 g/l Acetat bzw. mit 13 mM Phosphat oder ohne Phosphat angezogen, bei einer OD_{600} von 4 geerntet, mit 1 Volumen TN-Puffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) gewaschen und in 6 ml TGED-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1 mM Dithiothreitol, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 10% [v/v] Glycerin, 10 µM Phenylmethylsulfonylfluorid) resuspendiert. Das resuspendierte Pellet (ca. 10 ml) wurde in sieben Zyklen durch eine Frenchpress (SIM-Aminc Spectronic Instrument) aufgeschlossen. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch Zentrifugationschritte für 10 min bei 8000 g und anschließend für 60 min bei 18000 g, jeweils bei 4°C, entfernt.

Nach den Zentrifugationen wurde der Rohextrakt (ca. 6 ml) zusammen mit 500 µg genomischer DNA von *C. glutamicum* sowie den mit dem jeweiligen PCR-Produkt beladenen

Dynabeads für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Dabei wurde gerade soviel geschüttelt, dass sich die paramagnetischen Beads nicht absetzten (150 rpm). Anschließend wurde die Reaktion schrittweise in Mikrozentrifugengefäße transferiert. Danach wurde einmal mit 1 ml TGED-Puffer, zweimal mit 1 ml TGED-Puffer einschließlich 400 µg chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und zum Schluss erneut mit 1 ml TGED-Puffer gewaschen. Die Proteine, die an die immobilisierten PCR-Produkte gebunden hatten, wurden durch zweimaliges Waschen der Dynabeads mit 350 µl Elutionpuffer (TGED-Puffer mit 2 M NaCl) eluiert. Die Eluate wurden vereinigt, aufkonzentriert und mit Hilfe von Microcon 3 Microconcentrators entsalzt (Millipore, Bedford, USA). Danach konnten sie auf ein 10%iges SDS-Gel (NuPAGE) (Sambrook et al. 1989) aufgetragen werden. Die Auftrennung erfolgte mit der vertikalen Gelapparatur BIORAD Model 1000/500 Power Supply (BIORAD, München) bei 200 V und 40 A für ca. 4 h. Danach wurde das Gel mit einer kollidalen Coomassiefärbelösung (Novex, Frankfurt/Main) gefärbt und analysiert. Als Proteinstandard wurde der *Seebblue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt.

3.8. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analyse (Fountoulakis and Langen 1997; Nouwens et al. 2000; Schaffer et al. 2001). Dazu wurden die Banden mit einem Skalpell aus den SDS-Gelen geschnitten, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, zweimal für je 15 min in 30% (v/v) Acetonitril in 0,1 M NH_4HCO_3 gewaschen und für 20 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Gelstücke für 30 min in 2 µl 3 mM Tris-HCl pH 8,8 mit 10 ng/µl Trypsin (Promega, Mannheim) inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 3 mM Tris-HCl pH 8,8 hinzugefügt und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution der tryptisch gespaltenen Peptide aus der Gelmatrix erfolgte durch Inkubation mit 9 µl Wasser für 15 min, gefolgt von der Zugabe von 7,5 µl 30% (v/v) Acetonitril in 0,1% (w/v) Trifluoressigsäure und weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden entweder bis zur Messung bei -20 °C gelagert oder direkt zur Massenspektrometrie eingesetzt.

Zur MALDI-TOF-MS Analyse wurden 0,5 µl Probe in 0,5 µl Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäure in 50% (v/v) Acetonitril und 0,25% (w/v) Trifluoressigsäure) auf einer Probenplatte kokristallisiert (Mortz et al. 1994). Die Kalibrierung, Messung und Auswertung erfolgte erfolgte wie von Schaffer *et al.* (Schaffer et al. 2001) beschrieben.

3.9. Konstruktion des Plasmids pET16b-his-*glxR* sowie Überproduktion und Aufreinigung von GlxR

Für die Überproduktion und Aufreinigung von GlxR mit einem N-terminalen His-Tag wurde die codierende Region von *glxR* mit den Oligonukleotiden *glxR*forward und *glxR*reverse amplifiziert. Mit Hilfe des Primers *glxR*forward wurde eine NdeI-Restriktionsschnittstelle einschließlich des Startcodons und mit Hilfe des Primers *glxR*reverse wurde eine BamHI-Restriktionsschnittstelle nach dem Stoppcodon eingeführt. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt in den Expressionsvektor pET16b kloniert, was das resultierende Plasmid pET16b-*glxR* ergab. Dieses wurde durch Sequenzierung auf seine Richtigkeit überprüft (AGOWA, Berlin, Deutschland). Das GlxR-Protein, das durch dieses Plasmid kodiert wird, enthält 10 zusätzliche Aminosäuren (HHHHHHHHHH) am Carboxylende und eine Faktor Xa Restriktionsschnittstelle. Auf diese Weise ist es möglich, den His-Tag nach der Aufreinigung durch Faktor-Xa-Verdau (Novagen, San Diego, USA) abzuspalten.

Das GlxR-Fusionsprotein wurde überexprimiert und aufgereinigt wie kürzlich beschrieben (Gerstmeir et al. 2004; Wennerhold et al. 2005). Dabei wurden *E. coli* B121 (DE3)-Zellen, die mit dem Plasmid pET16b-*glxR* transformiert wurden, bei 30°C in 500 ml LB mit 50 µg/ml Kanamycin angezogen. Beim Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 wurde 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactoside (IPTG) hinzugefügt. Nach einer Kultivierungsdauer von vier Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die aufgetauten Zellen in 10 ml TNGI5-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.9, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 5 mM Imidazol), der 1 mM Diisopropylfluorophosphat und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach in sechs Zyklen mit Hilfe der French Press (SLM Amino, Spectronic Instruments, Rochester, NY) bei 207 Megapascal aufgeschlossen. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 5000 x g, 4°C) entfernt. Im Anschluss daran wurde der zellfreie Extrakt für 1 h, bei 150000 g und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Proteinaufreinigung des Polyhistidin-markierten Proteins GlxR erfolgte über separate 15-ml-Polypropylen-Säulen, die nach Herstellerangaben präpariert wurden (Janknecht et al. 1991). Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer (TNIx-Puffer: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, x mM Imidazol, pH 7,9) äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt auf die Säule gegeben. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 20 ml TNI20-Puffer und 10 ml TNI50-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 6 x 1 ml TNI400-Puffer eluiert. Proteine, die immer noch an Ni²⁺ gebunden waren, wurden durch Entfernen der Ni²⁺-Ionen mit 10 ml Strip-Puffer (20 mM Tris-HCl, 500

mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7,9) entfernt. Die Säule wurde nun entweder bis zum nächsten Gebrauch bei 4°C gelagert oder mit 5 ml 100 mM NiSO₄ für einen neuen Reinigungsschritt vorbereitet. Die eluierten Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 50 µl des Eluats mit jeweils 200 µl Coomassie Plus Protein-Assay-Reagenz (Pierce) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung war ein Maß für den Proteingehalt. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden vereinigt. Anschließend wurde der Elutionspuffer über PD10-Säulen gegen den BS-Puffer (100 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5) ausgetauscht. Von 250 ml Kultur konnten ca. 4 mg reines GlxR aufgereinigt werden. Danach konnte der His-Tag durch Faktor-Xa-Verdau über Nacht proteolytisch abgespalten und mittels Xa-Agarose (Novagen, San Diego, USA) entfernt werden. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

3.10. Überproduktion und Aufreinigung von RamB

Das RamB-Fusionsprotein wurde hergestellt und aufgereinigt wie in der Literatur beschrieben (Gerstmeir et al. 2004; Wennerhold et al. 2005). Das Plasmid pET29b-*his-ramB* wurde in *E. coli* B121 (DE3) transformiert. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C in 500 ml LB mit 50 µg/ml Kanamycin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert, bevor die Zugabe von 1 mM Isopropyl β-D-Thiogalactoside (IPTG) erfolgte. Vier Stunden nach der Induktion mit IPTG, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei – 20°C gelagert. Der Zellaufschluss wurde so durchgeführt wie unter Punkt 3.9. beschrieben. Die Proteinaufreinigung des Polyhistidin-markierten Proteins RamB erfolgte über separate 15-ml-Polypropylen-Säulen, die nach Herstellerangaben präpariert wurden (Janknecht et al. 1991). Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer (TNIx-Puffer: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, x mM Imidazol, pH 7,9) äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt auf die Säule gegeben. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 20 ml TNI20-Puffer und 10 ml TNI50-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 6 x 1 ml TNI200-Puffer eluiert. Die Fraktionen, die das RamB-Protein enthielten, wurden vereinigt, um danach über PD10-Säulen den Elutionspuffer gegen den BS-Puffer (100 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5) auszutauschen. Von 250 ml Kulturvolumen konnten ca. 5 mg RamB aufgereinigt werden.

3.11. Gelretardierungstests

Die Gelretardierungstests mit RamB wurden so durchgeführt wie kürzlich in der Literatur beschrieben (Wennerhold et al. 2005). Das überexprimierte und aufgereinigte RamB-Protein

(0 – 6 μM) wurde mit dem wahrscheinlichen Zielpromotor *pstS* (R-1F0) und den Fragmenten dieses Promotors (R0F0, R1F0, R2F0, R3F0, R4F0, R0F2, R0F3, R1F3, R2F2, R-1F4, F3cR1c, F3mR1c, F3cR1m and F3mR1m (124-bp – 507-bp, Endkonzentrationen 61 nM – 15 nM) in einem Gesamtvolumen von 20 μl gemischt. Der Bindepuffer für die Reaktion enthielt 100 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 und 1 mM EDTA, pH 7,5. Als Negativkontrolle wurden verschiedene andere Promotorfragmente (NCgl0430, *acn*, R3F0 und *dtxR*) in einer Konzentration von 40 nM eingesetzt, an die RamB nicht bindet. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Proben auf einem 10% nativen Polyacrylamidgel bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Elektrophorese fand bei 170 V in 1x TBE-Puffer (89 mM Trisbase, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) in der horizontalen Gelapparatur Powerpac 300 (BIORAD, München) statt. Im Anschluss daran wurden die Gele mit Sybr Green I (Sigma, Rödermark) gefärbt und fotografiert, wie es im Protokoll des Herstellers beschrieben ist.

Die Gelretardierungstests für GlxR mit dem *pstS*-Promotor wurden ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt. Diese enthielten 100 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, pH 7.5, 15 nM des vollständigen *pstS*-Promotors (507 bp), das aufgereinigte GlxR-Protein in Konzentrationen von 0 bis 3,04 μM sowie als Negativkontrolle die Promotorfragmente NCgl0430, NCgl1646, NCgl1127, NCgl1120 oder NCgl0665 (185-bp, 41 nM). Außerdem wurde die Reaktion ohne cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), mit 0,2 mM cAMP, sowie mit 0,2 mM 5'AMP und 0,2 mM cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) durchgeführt (Kim et al. 2004; Letek et al. 2006). Die Reaktion wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf ein 10% natives Polyacrylamidgel geladen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und 170 V durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE (89 mM Trisbase, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) eingesetzt.

Alle PCR-Produkte, die für die Gelretardierungstests benutzt wurden, sind über das *PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt und in EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert worden.

3.12. Protein-Gelelektrophorese

SDS-Gelelektrophorese (Bis-Tris-Gel)

Für die Trennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen wurde die Protein-Gelelektrophorese eingesetzt (Fling and Gregerson 1986). Je nach Fragmentgröße wurden 10 - 12%ige (w/v) Bis/Tris-SDS-Gele (NuPAGE, Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer (NuPAGE

MOPS SDS Runningbuffer, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Auftrennung wurde die Proteinprobe vorher mit 6 M Trichloressigsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefällt, 30 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 4°C und 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 0,5 ml Aceton gewaschen und erneut bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl ddH₂O resuspendiert. Die Proteinprobe wurde mit 7,5 µl Probenpuffer (NuPAGE, *Sample buffer*, Invitrogen, Karlsruhe) und 3 µl Reduktionsreagenz (NuPAGE Antioxidant) gemischt und im Anschluss daran für 10 min bei 70°C denaturiert. Die Gelelektrophorese fand in einer Biorad-Gelapparatur (BIORAD, Model 1000/500 Power Supply, BIORAD, München) bei 200 V und 40 A statt. Als Proteinstandard wurde der *Seebblue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Nach der Auftrennung wurde das SDS-Gel für 30 min gewässert und für 60 min in einer kollidalen Coomassiefärbelösung (Novex, Frankfurt/Main) gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde durch Waschen in ddH₂O entfernt.

Native Gele

Für die nativen Gele wurden 10%ige Polyacrylamidgele hergestellt. Dafür wurden pro Gel 1,22 ml 40% Acrylamid (Amershan), 0,33 ml 2% Bisacrylamid (Amershan) 0,25 ml 10 x TBE (100 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, pH: 7,5) und 2,9 ml H₂O gemischt. Die Polymerisation des Gels wurde durch 50 µl APS und 5 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) ausgelöst. Mit Hilfe des Gelgießsystems von BIORAD (Miniprotean 3 cell, 0,75 mm, BIORAD, München) wurden die Gele anschließend gegossen. Die Gelelektrophorese fand in der Gelapparatur Powerpac 3000 (BIORAD, München) für ca. 1 h bei 170 V statt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Im Anschluss daran wurden die Gele mit Sybr Green I (Sigma, Rödermark) gefärbt und fotografiert, wie es im Protokoll des Herstellers beschrieben ist.

4. Ergebnisse

4.1. Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen von *C. glutamicum* WT und der Deletionsmutante $\Delta phoRS$

Das Zweikomponentensystem PhoRS von *C. glutamicum* ist, wie kürzlich gezeigt wurde (Kocan et al. 2006), in die Aktivierung der durch Phosphatmangel induzierbaren Gene involviert. Alle Gene, die zum Phosphatmangelstimulon gehören (Ishige et al. 2003), waren in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ eine Stunde nach einem Wechsel von phosphatreichen in phosphatlimitiertes Medium nicht mehr induzierbar, bis auf das *pstSCAB*-Operon. Dieses wurde allerdings schwächer induziert als in *C. glutamicum* WT (Kocan et al. 2006). Die bisherigen Untersuchungen zu PhoRS waren jedoch auf die kurzfristige Antwort auf Phosphatmangel beschränkt. Deshalb war es wichtig, der Frage nachzugehen, ob PhoRS für das Wachstum auf alternativen Phosphorquellen essentiell ist und ob die Deletionsmutante $\Delta phoRS$ in der Lage ist, alternative Phosphorquellen zu nutzen. Die partielle Induktion des *pstSCAB*-Operons 60 min nach Auslösen der Phosphatlimitierung könnte bedeuten, dass PhoRS entweder für die Geschwindigkeit oder aber für die Stärke der Phosphatmangelantwort wesentlich ist. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Wachstumssexperimente durchgeführt und über einen längeren Zeitraum verfolgt. Das Ziel der Wachstumsexperimente war es, die Anpassung der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ nach Auslösen des Phosphatmangels zeitlich länger zu charakterisieren.

Deshalb wurde das Wachstum von $\Delta phoRS$ auf 0,065 mM Phosphat oder 1 mM alternativer Phosphorquelle nach 24 h Kultivierung ohne jegliches Phosphat verfolgt. *C. glutamicum* WT und die Mutante $\Delta phoRS$ wurden für 24 h in phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose vorkultiviert, damit die internen Phosphorspeicher wie z.B. Polyphosphat aufgebraucht wurden (Lambert et al. 2002; Ishige et al. 2003). Die vorkultivierten Zellen wurden in 10 ml CGXII-Minimalmedium mit Glucose angeimpft, das als Phosphorquellen entweder eine limitierte Phosphatkonzentration von 0,065 mM oder 1 mM Adenosin-5'-Monophosphat (AMP), 1 mM L- α -Glycerinphosphat (G3P) und 1 mM UDP-Glucose (UDP-Glu) enthielt. Da die Phosphatkonzentration, die *C. glutamicum* WT eine halbmaximale Wachstumsrate (Monodkonstante) erlaubt, mit 0,1 mM berechnet wurde (Ishige et al. 2003), wurde die Konzentration von 0,065 mM als limitierende Phosphatkonzentration gewählt.

C. glutamicum WT konnte nach 24 h Phosphatmangel alle getesteten Phosphorquellen nutzen (Tab. 2). Wie erwartet, erreichte *C. glutamicum* WT bei der limitierten Phosphatkonzentration von 0,065 mM eine Verdopplungszeit von 0.14 h^{-1} und erreichte eine End-OD₆₀₀ von 2. Auf Adenosin-5'-Monophosphat und UDP-Glucose wuchs *C. glutamicum* WT langsamer als auf 0,065 mM Phosphat und L- α -Glycerinphosphat und zeigte lag-Phasen von 11 h und 39 h (Tab. 2). Dies spricht dafür, dass die Induktion von Enzymen, die dem Transport und der Verwertung von AMP und UDP-Glucose dienen, langsamer erfolgt als die für Phosphat und L- α -Glycerinphosphat. Rittmann *et al.* zeigten, dass für die Verwertung von AMP und UDP-Glucose das Gen *ushA* induziert werden muss (Rittmann et al. 2005), das für eine 5'-Nukleotidase und UDP-Zuckerhydrolase kodiert.

Tab. 2: Wachstum auf verschiedenen Phosphorquellen von *C. glutamicum* WT und der Deletionsmutante $\Delta phoRS$

<i>C. glutamicum</i> Stamm	Phosphorquelle (0,065 mM Phosphat oder 1 mM)	gebildete Biomasse [g/l] nach 176 h	Dauer der lag-Phase [h]	$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$	UDP-Glucose Hydrolaseaktivität [mU/ml] im Überstand
WT	0,065 Mm Phosphat	2	0	0,14	27
WT	5'AMP	9	11	0,08	6
WT	G3P	11	0	0,16	9
WT	UDP-Glucose	9	39	0,06	6
$\Delta phoRS$	0,065 Mm Phosphat	1	6	0,07	39
$\Delta phoRS$	5'AMP	7	34	0,08	12
$\Delta phoRS$	G3P	9	9	0,11	13
$\Delta phoRS$	UDP-Glucose	8	63	0,09	3,1

Wie kürzlich gezeigt (Kocan et al. 2006), wuchs *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ langsamer unter Phosphat limitierenden Bedingungen als *C. glutamicum* WT (Tab. 2). Tabelle 2 zeigt außerdem, dass *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ auch auf Adenosin-5'-Monophosphat, L- α -Glycerinphosphat und UDP-Glucose als einziger Phosphorquelle wachsen kann, jedoch im Vergleich zu *C. glutamicum* WT mit längeren lag-Phasen, mit verringerter Wachstumsrate und verringerter Biomassebildung. Die experimentellen Daten zeigen, dass das Zweikomponentensystem PhoRS wichtig für die schnelle Anpassung an Phosphatmangel ist. Es ist jedoch weder essentiell für das Wachstum unter limitierenden Phosphatbedingungen

noch für das Wachstum auf den alternativen Phosphorquellen Adenosin-5'-Monophosphat, L- α -Glycerinphosphat und UDP-Glucose. Weil die Anpassung von *C. glutamicum* an Phosphatmangel bzw. an die Nutzung alternativer Phosphorquellen in Abwesenheit von PhoRS zwar weniger effizient, aber dennoch möglich ist, scheinen andere Regulatoren die Gene der Phosphatmangelantwort in Abwesenheit von PhoRS zu induzieren und damit ein Wachstum bei niedrigen Phosphatkonzentrationen sowie auf Organophosphaten zu ermöglichen.

4.2. Bestimmung der 5'-Nukleotidaseaktivität und der UDP-Zuckerhydrolaseaktivität

Für die Nutzung der Organophosphate 5'-AMP und UDP-Glucose als Phosphorquellen ist die Aktivität der UDP-Zuckerhydrolase/5'-Nukleotidase essentiell (Rittmann et al. 2005), die entweder die hydrolytische Abspaltung von UDP-Zucker zu UMP und Zucker-1-Phosphat katalysiert und/oder 5'-Desoxyribonukleotide in Desoxyribonukleoside und Phosphat hydrolysiert (Rittmann et al. 2005; Wendisch 2005). Da *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ in der Lage ist mit verlängerten lag-Phasen auf 5'-AMP und UDP-Glucose zu wachsen, wurde untersucht, ob diese Mutante die 5'-Nukleotidase/UDP-Zuckerhydrolase ins Medium sekretiert. Dazu wurden die Enzymaktivitäten der 5'-Nukleotidase und der UDP-Zuckerhydrolase bestimmt. Sowohl *C. glutamicum* WT als auch die Mutante $\Delta phoRS$ wurden in phosphatfreiem Medium vorkultiviert, um die internen Phosphorspeicher aufzubrauchen (Lambert et al. 2002; Ishige et al. 2003). Schon in den Überständen dieser Vorkulturen konnte UDP-Zuckerhydrolaseaktivität und 5'-Nukleotidaseaktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach Kultivierung für 176 h in CGXII-Minimalmedium mit limitierter Phosphatkonzentration von 0,065 mM, 1 mM Adenosine 5'-Monophosphat, 1 mM L- α -Glycerinphosphat (G3P) und 1 mM UDP-Glucose (UDP-Glu) zeigten *C. glutamicum* WT und die Mutante $\Delta phoRS$ UDP-Zuckerhydrolaseaktivität in den Überständen auf allen Phosphorquellen (Tab. 2). Interessanterweise zeigte die Mutante $\Delta phoRS$ höhere UDP-Zuckerhydrolaseaktivitäten auf allen vier Phosphorquellen als *C. glutamicum* WT (Tab. 2).

Der Nachweis der 5'-Nukleotidasaktivität und der UDP-Zuckerhydrolaseaktivität bestätigen, dass das zum Phosphatmangelstimulon gehörende Gen *ushA* in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ bei Phosphatmangel induziert wird, und damit unter verlängerten Phosphatmangelbedingungen bzw. auf alternativen Phosphorquellen unabhängig von PhoRS reguliert wird. Allerdings zeigte die Deletionsmutante $\Delta phoRS$ eine längere lag-Phase nach

dem Transfer in Medium mit geringer Phosphatkonzentration bzw. mit alternativen Phosphorquellen und damit einen Wachstumsnachteil gegenüber *C. glutamicum* WT.

4.3. Bestimmung des Transkriptionsstarts und der mRNA-Spiegel für die Gene *ushA* und *nucH* in *C. glutamicum* WT und $\Delta phoRS$

Da die Enzymaktivitäten von UshA in *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ nachgewiesen werden konnten (s. Kap. 4.2.), wurde überprüft, ob die Regulation von *ushA* auf RNA-Ebene stattfindet und damit eine echte Induktion vorliegt. Mit Hilfe der Methode der Primerextension kann sowohl die Frage der Regulation geklärt als auch der Transkriptionsstart des jeweiligen Gens bestimmt werden.

Außerdem wurde die Primerextension auch für das Gen *nucH* durchgeführt, das für eine Nuklease kodiert. Für NucH wurde ein Signalpeptid und eine C-terminale Transmembranhelix vorhergesagt, was dafür spricht, dass es sich um ein Membranprotein handelt (Wendisch 2005). Wahrscheinlich hat NucH die Funktion, extrazelluläre Nukleinsäuren in Nukleosidmonophosphate zu spalten, die wiederum Substrate für UshA darstellen. Die RNA-Spiegel der Gene *ushA* und *nucH* waren in *C. glutamicum* WT nach Auslösen von Phosphatmangel stark erhöht. Beide Gene, *ushA* und *nucH*, waren unter den 25 Genen, die erhöhte mRNA-Spiegel nach Auslösen des Phosphatmangels im Vergleich zum Wachstum unter ausreichender Phosphatkonzentration zeigten (Ishige et al. 2003). Während das *ushA*-Gen von *C. glutamicum* bei Phosphatmangel induziert wird, gehört das *ushA* *E. coli* Homolog nicht zu den Genen des Phosphatmangelstimulons dieses Bakteriums (Wanner 1996b).

Um zu überprüfen, ob *ushA* und *nucH* unter Phosphatmangelbedingungen in *C. glutamicum* WT und $\Delta phoRS$ auf RNA-Ebene reguliert werden, wurden Primerextensionsanalysen von *C. glutamicum* WT und der Mutante $\Delta phoRS$ vor und nach Auslösen des Phosphatmangels durchgeführt. Die Primerextensionsprodukte konnten für beide Gene 90 min nach Auslösen des Phosphatmangels nur in *C. glutamicum* WT und nicht in *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ (Abb. 5A und B) nachgewiesen werden. Außerdem konnten durch die Primerextensionsanalysen die Transkriptionsstarts der Gene *ushA* und *nucH* bestimmt werden. Für *ushA* konnte als Transkriptionsstart das Cytosin 60 bp vor dem Translationsstart, vor dem sich die Ribosomenbindestelle befindet, nachgewiesen werden (Abb. 5A). Der Transkriptionsstart für *nucH* ist das Thymin 33 bp vor dem Translationsstart, vor dem sich die Ribosomenbindestelle befindet (Abb. 5B). Die Promotoren der Gene *ushA* und *nucH* enthalten eine konservierte -10-Region, allerdings fehlt ihnen eine konservierte -35-Region,

was sich als typisch für die Promotoren von *C. glutamicum* erwiesen hat (Patek et al. 2003a; Patek et al. 2003b).

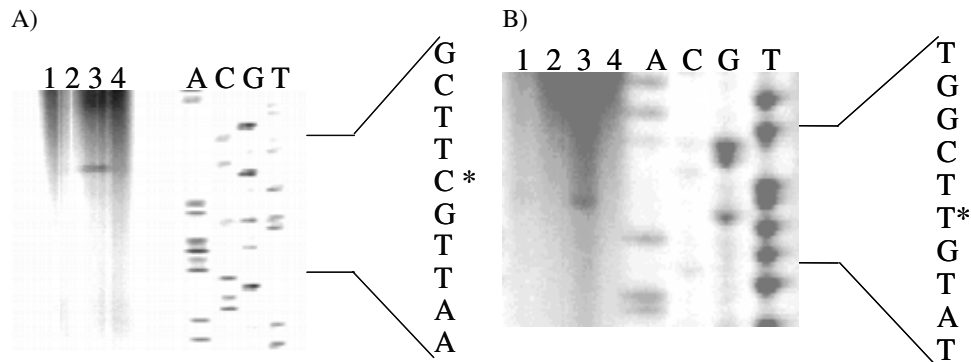


Abb. 5: Expressionsanalyse und Bestimmung des Transkriptionsstarts A) des *ushA*-Gens von *C. glutamicum* und B) des *nucH*-Gens von *C. glutamicum*. Für die Primerextensionsanalyse wurden 20 µg Gesamt-RNA von *C. glutamicum* Δ *phoRS* für 0 min (Spur 1) und 90 min (Spur 2) in phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium isoliert. Für *C. glutamicum* WT wurden ebenfalls 20 µg Gesamt-RNA für 0 min (Spur 3) und 90 min (Spur 4) nach Auslösen des Phosphatmangels benutzt. Der Transkriptionsstart ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die korrespondierende Sequenzierreaktion (Spuren A, C, G und T) wurde durch dieselben IRD-800 markierten Oligonukleotide generiert, die auch für die Primerextensionsanalyse eingesetzt wurden. Als Template-DNA für die Sequenzierreaktion wurden die PCR-Produkte eingesetzt, in der sich der mutmaßliche Transkriptionsstart befindet.

Die Gene *ushA* und *nucH* werden nur in *C. glutamicum* WT und nicht in der Deletionsmutante Δ *phoRS* bis 90 min nach Auslösen des Phosphatmangels exprimiert, d.h. sie werden in diesem frühen Zeitraum nur durch das Zweikomponentensystem PhoRS (Ishige et al. 2003; Kocan et al. 2006) und nicht durch den zweiten unbekannten Regulator induziert. Damit bestätigt sich, dass das Zweikomponentensystem PhoRS in *C. glutamicum* wichtig für eine schnelle und unmittelbare Anpassung bei Phosphatmangel ist.

4.4. Expression der Transcriptionsfusion *pstS*'-'*cat* in *C. glutamicum* WT und der Deletionsmutante Δ *phoRS*

In Abwesenheit von PhoRS zeigte das *pstSCAB*-Operon den stärksten Effekt nach Auslösen des Phosphatmangels. Die Expression des *pstSCAB*-Operon konnte sowohl in den Transkriptomanalysen zwischen *C. glutamicum* WT und Δ *phoRS* unter Phosphatmangelbedingungen als auch durch Primerextension in *C. glutamicum* Δ *phoRS* nachgewiesen werden (Kocan et al. 2006). Deshalb wurde der *pstS*-Promotor für die Deletionsanalyse ausgewählt. Dabei galt es zu klären, ob es im *pstS*-Promotor Regionen gibt,

die wichtig für die PhoRS-abhängige Kontrolle sind und ob es Regionen gibt, die eine PhoRS-unabhängige Regulation erlauben.

Eine Transkriptionsfusion zwischen dem *pstS*-Promotor und dem promotorlosen Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Gen wurde mit Hilfe des Vektors pET2 konstruiert (Vasicova et al. 1998). Das resultierende Plasmid pET2_*R-1F0* wurde sowohl in *C. glutamicum* WT als auch in die Deletionsmutante Δ *phoRS* transferiert. Wie kürzlich bei der *pstS-cat* Transkriptionsfusion gezeigt (Ishige et al. 2003) war die Expression in *C. glutamicum* WT durch Phosphatmangel induzierbar (Abb. 9). Die Expression der Transkriptionsfusion *pstS*'-'*cat* (R-1F0) in Δ *phoRS* war ebenfalls durch Phosphatmangel induzierbar (Abb. 9). Allerdings zeigte die Mutante Δ *phoRS* eine langsamere Kinetik und erreichte eine zwei- bis dreifach geringere Aktivität als *C. glutamicum* WT (Abb. 9).

Dieses Ergebnis stimmt mit der verringerten Induktion des *pstSCAB*-Operons in der Deletionsmutante Δ *phoRS* in den Transkriptomanalysen und in der Primerextensionsanalyse (Kocan et al. 2006) sowie in den Wachstumsexperimenten, die in Kap. 4.1. beschrieben wurden, überein. Durch die Expressionsanalyse der Transkriptionsfusion *pstS*'-'*cat* (R-1F0) bestätigt sich, dass das Zweikomponentensystem PhoRS nur für die unmittelbare Phosphatmangelantwort in *C. glutamicum* benötigt wird. Die Induktion des *pstSCAB*-Operons und der Transkriptionsfusion *pstS*'-'*cat* (R-1F0) erfordert in *C. glutamicum* Δ *phoRS* damit ein weiteres PhoRS unabhängiges Regulationssystem.

4.5. Deletionsanalyse des *pstS*-Promotors

Um cis-regulatorische Sequenzen des *pstSCAB*-Operons zu identifizieren, wurde eine Deletionsanalyse der *pstS*-Promotorregion durchgeführt. Die Transkriptionsstärke des vollständigen Promotors sowie verschiedener verkürzter Promotor-Teilfragmente wurde in *C. glutamicum* WT und in der Δ *phoRS*-Mutante getestet, um für die PhoR-abhängige bzw. PhoR-unabhängige Transkriptionsregulation wichtige Bindestellen zu identifizieren.

Dafür wurde der vollständige *pstS*-Promotor (R-1F0) sowie die Promotor-Teilfragmente R0F0, R0F1, R0F2, R0F3, R1F0, R2F0 und R3F0 (Abb. 6) in den Promotor-Testvektor pET2 vor ein promotorloses Chloramphenicolacetyltransferase-(CAT)-Gen (Vasicova et al. 1998) kloniert. Bei den Fragmenten R0F0, R1F0, R2F0 und R3F0 wurde die 5'-Region immer weiter verkürzt, während bei den Fragmenten R0F1, R0F2 und R0F3 (Abb. 6) die 3'-Region immer weiter verkürzt wurde. Die resultierenden Plasmide pET2_*R-1F0*, pET2_*R0F0*, pET2_*R1F0*, pET2_*R2F0*, pET2_*R3F0*, pET2_*R0F1*, pET2_*R0F2* und pET2_*R0F3* wurden sowohl in *C. glutamicum* WT als auch in die Δ *phoRS*-Mutante transferiert. Die auf diese

Weise erhaltenen *C. glutamicum*-Stämme mit den verschiedenen Promotor-Testvektoren wurden von CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose und ausreichender Phosphatkonzentration in phosphatfreies CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose transferriert. Die Expression der Transkriptionsfusionen wurde 0 und 90 min nach dem Wechsel in das phosphatfreie Medium bestimmt.

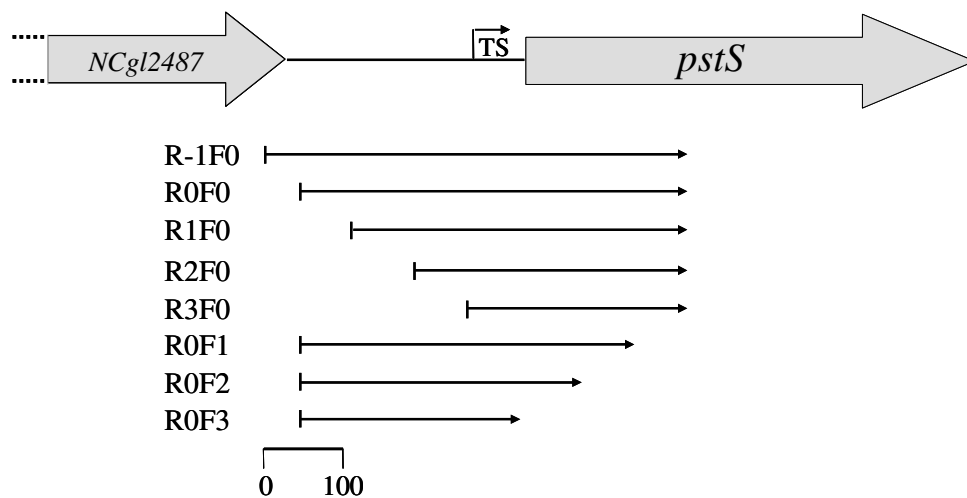


Abb. 6: Übersicht über die *pstS*-Promotorregion im Genom von *C. glutamicum* und die für die Deletionsanalyse des *pstS*-Promotors benutzten Teilfragmente. Der Transkriptionsstart ist als TS angezeigt.

Die Expression aller Promotor-Teilfragmente, außer der des R0F3-Fragmentes, wurden sowohl in *C. glutamicum* WT als auch in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ beobachtet (Abb. 7 und 8). Die fehlende Expression im R3F0-Fragment ist durch die Deletion essentieller Promotorregionen zu erklären, da der experimentell bestimmte Transkriptionsstart (Kocan et al. 2006) sowie die -10-Region der RNA-Polymerase-Bindestelle fehlen (Patek et al. 2003a; Patek et al. 2003b). Für das Fragment R3F0 konnte eine im Vergleich zum vollständigen Promotor reduzierte Expression vor und 90 min nach dem Wechsel in phosphatfreies Medium festgestellt werden (Abb. 7 und 8). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass im Fragment R0F3 Sequenzen fehlen, die für eine starke Promotoraktivität notwendig sind. Allerdings enthält dieses Fragment noch die für die Induktion bei Phosphatmangel wesentlichen Sequenzen. Die Expression aller aktiven Transkriptionsfusionen, d.h. mit Ausnahme des inaktiven Fragments R3F0, waren durch Phosphatmangel in *C. glutamicum* WT und $\Delta phoRS$ induzierbar (Abb. 7 und 8). Daraus lässt sich schließen, dass in diesen Fragmenten *cis*-regulatorische Sequenzen für die Phosphatmangelinduktion vorhanden sind.

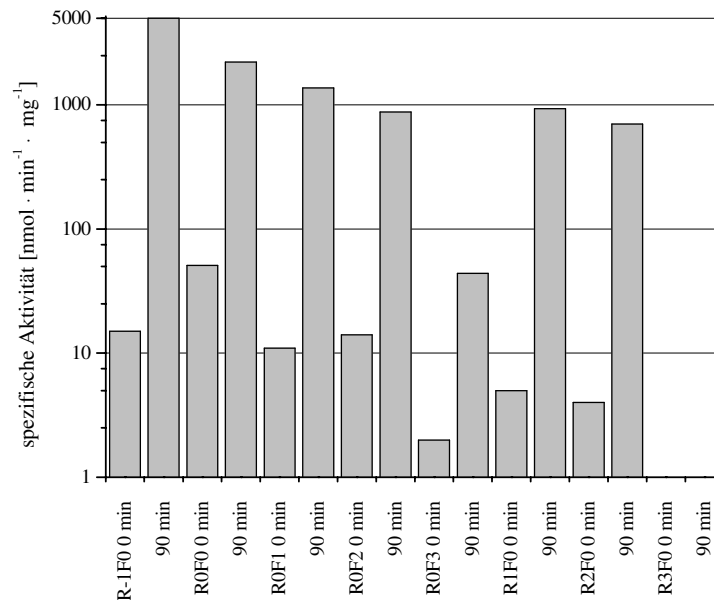


Abb. 7: Expression der verschiedenen *pstS'*-*cat*-Promotorfusionen in *C. glutamicum* WT: Die Expressionsniveaus wurden 0 und 90 min nach Auslösen des Phosphatmangels als spezifische Aktivität der Chloramphenicolacetyltransferase gemessen. Abkürzungen für die getesteten Promotorfragmente sind in Abb. 6 beschrieben.

Es fiel auf, dass die *pstS'*-*cat*-Fusion in *C. glutamicum* WT eine ca. dreifach höhere Expression aufwies als in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$, während die Expression der anderen Fragmente in beiden Stämmen vergleichbar war (Abb. 7 und 8). Weiterhin entsprach die Expression des vollständigen Promotors in *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ der Expression des um 35 bp verkürzten Promotorteilfragmentes R0F0 in *C. glutamicum* WT. Diese Befunde sprechen dafür, dass die 35 bp-Region, die nur im vollständigen Promotor jedoch in keinem der Promotorteilfragmente vorkommt, die für die Aktivierung durch PhoR wichtigen cis-regulatorischen Sequenzen enthält (Abb. 10).

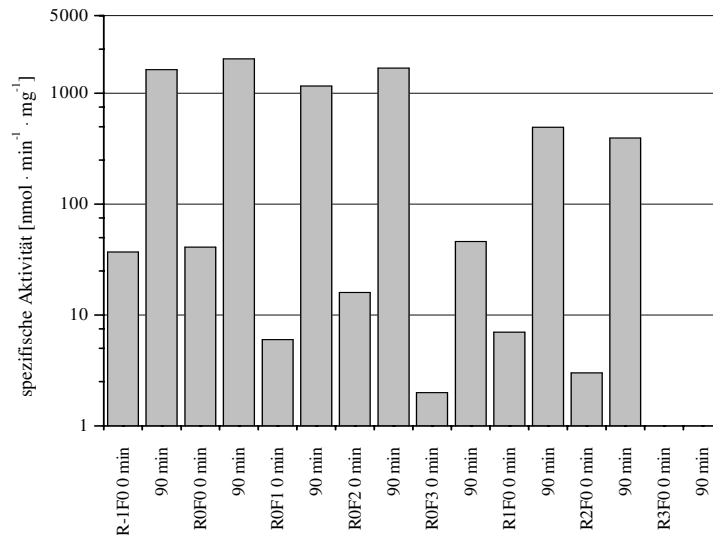


Abb. 8: Expression der verschiedenen *pstS'*-*cat*-Promotorfusionen in *C. glutamicum* $\Delta phoRS$: Die Expressionsniveaus wurden 0 und 90 min nach Auslösen des Phosphatmangels als spezifische Aktivität der Chloramphenicolacetyltransferase gemessen. Abkürzungen für die getesteten Promotorfragmente sind in Abb. 6 beschrieben.

Um zu ermitteln, ob die Induktion des *pstS*-Promotors in Abwesenheit von PhoR zeitlich verzögert oder generell geringer als in Anwesenheit von PhoR ausfällt, wurden die Messungen zeitlich aufgelöst zu den Zeitpunkten 0, 10, 30, 60, 90 und 120 min nach Auslösen des Phosphatmangels durchgeführt (Abb. 9). Zu allen Zeitpunkten 30 bis 120 min nach Auslösen des Phosphatmangels war die Expression des vollständigen *pstS*-Promotors (R-1F0) in *C. glutamicum* WT 2 – 2,8-fach höher (10, 30, 60, 90 und 120 min) als in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ (Abb. 9). Die höchste Expression zeigte der vollständige *pstS*-Promotor (R-1F0) in *C. glutamicum* WT nach 120 min. Diese Daten stimmen auch sehr gut mit den Ergebnissen der Transkriptomvergleiche zwischen *C. glutamicum* WT und $\Delta phoRS$ überein. Hier konnte gezeigt werden, dass in *C. glutamicum* WT die RNA-Spiegel der Gene des *pstSCAB*-Operons etwa 2 – 5-fach höher waren als in *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ (Ishige et al. 2003; Kocan et al. 2006).

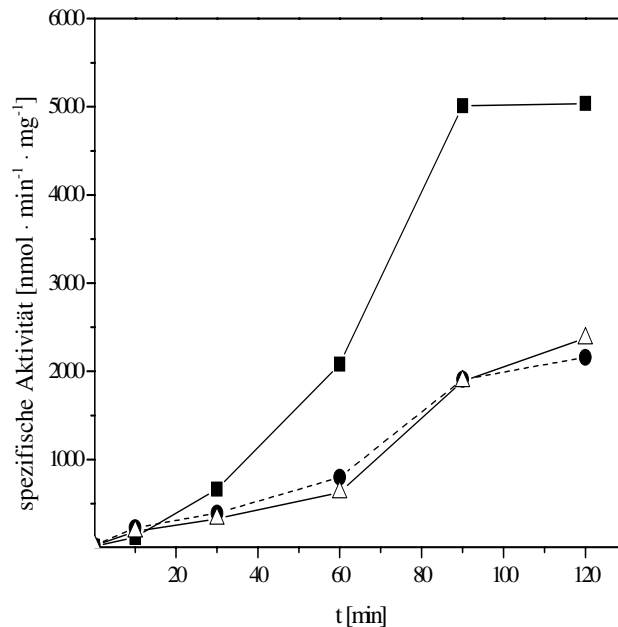


Abb. 9: Expression der Transkriptionsfusionen der *pstS*-Promotorfragmente in *C. glutamicum* WT und $\Delta phoRS$ nach Phosphatlimitierung. Der vollständige *pstS*-Promotor R-1F0 in *C. glutamicum* WT ist durch das Quadrat, das Promotorfragment R0F0 in *C. glutamicum* WT durch einen Kreis und der *pstS*-Promotor R-1F0 in der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ durch ein offenes Dreieck dargestellt. Abkürzungen für die getesteten Promotorfragmente sind in Abb. 6 beschrieben.

Die Analyse der Expression des vollständigen *pstS*-Promotors und der verkürzten Teilpromotoren führte neben der Identifizierung der PhoR-Binderegion und eines minimal aktiven Promotorfragments (Abb. 10) zu der Erkenntnis, dass in Abwesenheit von PhoR eine nur dreifach schwächere Phosphatmangelinduktion zu beobachten war. Der oder die unbekannten zusätzlichen Transkriptionsregulatoren ermöglichen also eine 50 - 100-fache Induktion der Expression des *pstS*-Promotors bei Phosphatmangelinduktion.

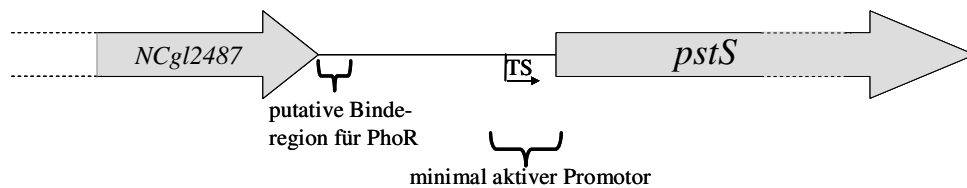


Abb. 10: Beschreibung der putativen Binderegion für PhoR und des minimal aktiven Promotors.

4.6. Identifizierung von Proteinen, die an den *pstS* Promotor binden

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, wurde neben dem Zweikomponentensystem PhoRS ein oder mehrere weitere Regulationssysteme für die Transkriptionskontrolle des *pstSCAB*-Operons gefordert.

Für die Identifizierung des/der unbekannten Regulatoren wurde bei der Planung der Versuche davon ausgegangen, dass es sich sowohl um einen transkriptionellen Repressor als auch um einen transkriptionellen Aktivator handeln könnte. Für die DNA-Affinitätschromatographie wurde das Fragment R2F0 ausgewählt, das in der Deletionsanalyse des *pstS*-Promotors zu den Teilfragmenten gehörte, die bei Phosphatmangel in Abwesenheit von PhoR bis zu 100-fach induziert wurden. Das Promotorfragment R2F0 wurde an magnetisches Trägermaterial immobilisiert und mit Rohextrakten der Deletionsmutante $\Delta phoRS$ nach Wachstum unter ausreichender Phosphatversorgung inkubiert. Bei diesem Versuchsaufbau wurde angenommen, daß es sich bei dem PhoRS-unabhängigen Regulator um einen Repressor (Madan Babu and Teichmann 2003) handelt, der nur bindet, wenn Phosphat im Überschuss im Medium vorhanden ist.

Die Eluate enthielten eine Reihe von Proteinen, die an die DNA des Promotofragments R2F0 *in vitro* gebunden haben (Abb. 11). Zur Identifizierung dieser Proteine wurden diese aus dem Gel isoliert und mit Trypsin behandelt. Anschließend wurden die tryptisch verdauten Peptidfragmente mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Neben Proteinen, die DNA ohne Sequenzspezifität binden, wie z.B. Gyrase, Topoisomerase oder DNA-Polymerase wurde der Transkriptionsregulator RamB als an den *pstS*-Promotor bindendes Protein identifiziert (Abb. 11).

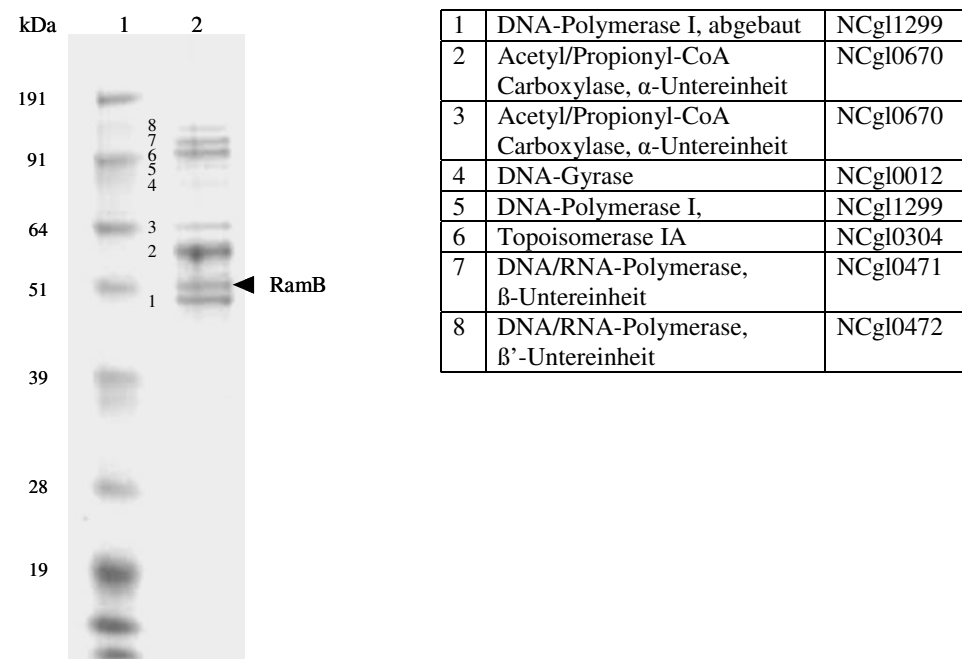


Abb. 11: Coomassie gefärbtes SDS-Gel von Proteinen, die über DNA-Affinitätschromatographie mit dem *pstS*-Promotorfragment R0F2 angereichert wurden. Es wurden Rohextrakte von *C. glutamicum* Δ *phoRS* nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose und unter ausreichender Phosphatkonzentration verwendet. Spur 1: Proteinstandard *Seebue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe). Spur 2: Eluat der DNA-Affinitätschromatographie. Die Proteinbande in Spur 2, in der RamB durch MALDI-TOF MS identifiziert werden konnte, ist durch einen Pfeil markiert. Die übrigen durch MALDI-TOF MS identifizierten Proteine sind nummeriert und in der abgebildeten Tabelle dargestellt.

Um auszuschließen, dass RamB unspezifisch an den *pstS*-Promotor bindet, wurden die Proteinfraktionen der Waschschrte analysiert. Dabei konnte RamB nicht nachgewiesen werden, sondern nur das Enzym Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase (Abb. 12), was für eine spezifische Bindung von RamB spricht. Bei RamB handelt es sich um den Regulator des Acetatmetabolismus B. Gerstmeir *et al.* charakterisierten RamB als Repressor der Gene der Acetatverwertung und konnten ein konserviertes RamB-Bindemotif (AA/GAACTTTGCAAA) identifizieren, das in den Promotorregionen einer Reihe weiterer Gene nachgewiesen werden konnte (Gerstmeir et al. 2004). Diese Gene gehören hauptsächlich zum zentralen Kohlenstoffstoffwechsel und bilden das Acetatstimulon (Gerstmeir et al. 2003; Gerstmeir et al. 2004). Der Nachweis der Bindung von RamB an den Promotor des *pstSCAB*-Operons, der nicht zum Acetatstimulon gehört, spricht für eine Verbindung zwischen Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel.

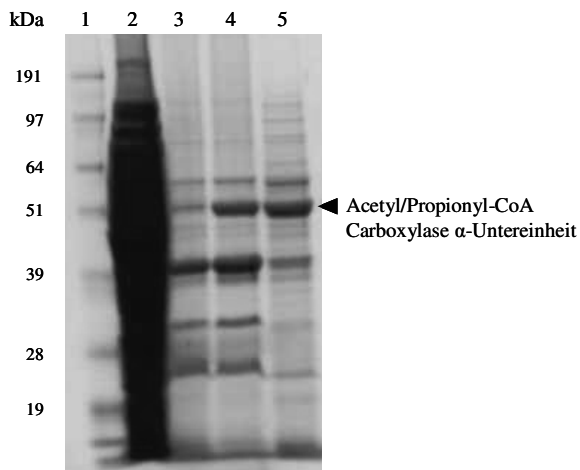


Abb. 12: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Waschfraktionen, die über DNA-Affinitätschromatographie mit dem *pstS*-Promotor R0F2 angereichert wurden. Es wurden Rohextrakte von *C. glutamicum* Δ *phoRS* nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose und unter ausreichender Phosphatkonzentration verwendet. Spur 1: Proteinstandard *Seeblue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe). Spur 2 - 5: Waschschriffe. Die Analyse der Waschschriffe der Spuren 3 – 5 diente dem Nachweis, ob RamB spezifisch an den *pstS*-Promotor bindet und sich nicht in den Waschschriffen findet. In der entsprechenden Bande, markiert durch einen Pfeil, konnte nur das Enzym Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase durch MALDI-TOF MS identifiziert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob RamB auch bei Kultivierung auf Acetat an den *pstS*-Promotor bindet, und ob unter diesen Bedingungen auch PhoR an den *pstS*-Promotor bindet, wurden einerseits Rohextrakten von *C. glutamicum* WT nach 120 min Phosphatmangel eingesetzt, andererseits wurde der vollständige Promotor R-1F0 benutzt, da in den Transkriptionsfusionen gezeigt werden konnte, dass PhoR nur an den vollständigen Promotor (R-1F0) bindet. In diesem Experiment konnte nach tryptischen Verdau und MALDI-TOF Massenspektrometrie der Transkriptionsregulator PhoR isoliert werden (Abb. 13). Neben dem Phosphorregulator PhoR binden bei Wachstum von *C. glutamicum* WT auf Acetatminimalmedium unter Phosphatmangelbedingungen auch die Acetatregulatoren RamB und GlxR an den *pstS*-Promotor. Der Transkriptionsregulator GlxR ist ein Repressor und reprimiert in Anwesenheit von cAMP das Glyoxylatbypassgen *aceB* (Reinscheid et al. 1994b). In Gelretardierungsexperimenten konnte eine Bindung an den Promotor der Malatsynthase (*aceB*) nachgewiesen werden (Kim et al. 2004). Außerdem gehören zu den Zielgenen von GlxR auch die Promotoren der Gluconatkinase (*gntK*) und Gluconatpermease (*gntP*). Auch für diese konnte die Interaktion zwischen GlxR und *gntK* sowie *gntP* nur in Anwesenheit von cAMP gezeigt werden (Letek et al. 2006).

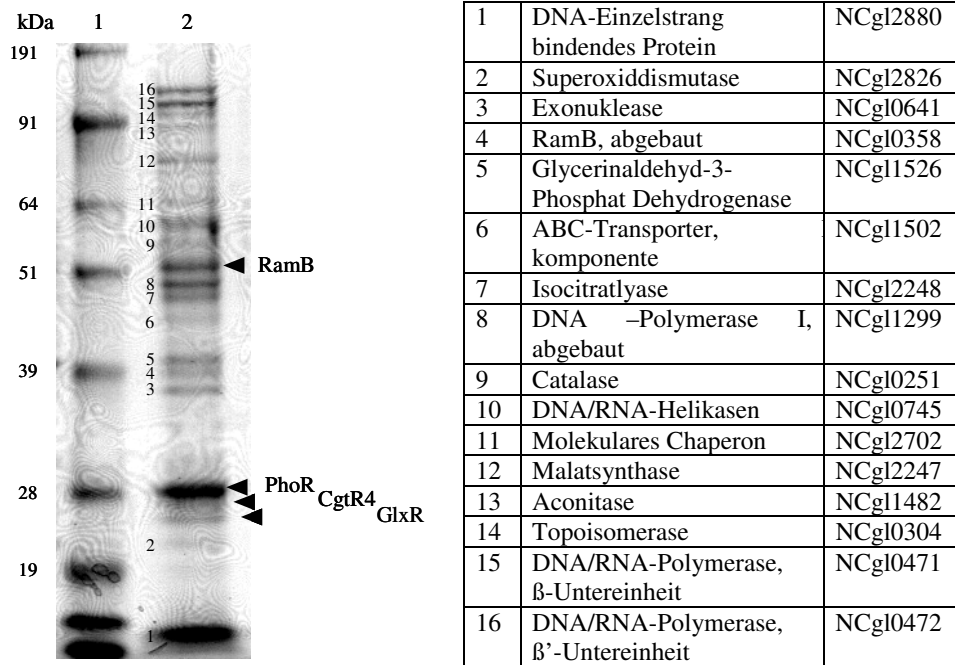


Abb. 13: Coomassie gefärbtes SDS-Gel von Proteinen, die über DNA-Affinitätschromatographie mit dem *pstS*-Promotor R-1F0 angereichert wurden. Es wurden Rohextrakte von *C. glutamicum* WT nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium unter Phosphatmangelbedingungen und 20 g/l Acetat verwendet. Spur 1: Proteinstandard *Seebblue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe). Spur 2: Eluat der DNA-Affinitätschromatographie. Die Proteinbanden in Spur 2, in denen GlxR, CgtR4, PhoR und RamB durch MALDI-TOF MS identifiziert werden konnten, sind durch einen Pfeil markiert. Die übrigen durch MALDI-TOF MS identifizierten Proteine sind nummeriert und in der abgebildeten Tabelle dargestellt.

Darüber hinaus konnte CgtR4 als an den *pstS*-Promotor bindendes Regulatorprotein identifiziert werden. CgtR4 ist der Antwortregulator des Zweikomponentensystem CgtSR4, von dem Mirja Wessel in ihrer Doktorarbeit zeigen konnte, dass es die Phosphatmangelgene *pstSCAB*, *ugpABCE* und *glpQ* induziert (Wessel 2004). Allerdings konnte kein Zielgen von CgtR4 durch Gelretardierungsexperimente identifiziert werden und es blieb offen, ob CgtR4 diese Gene direkt oder indirekt reguliert. Die hier gezeigte Interaktion von CgtR4 mit dem *pstS*-Promotor ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass CgtR4 tatsächlich *in vivo* an der Regulation der Phosphatmangelgene beteiligt ist. CgtR4 könnte dabei eine Rolle als genereller Stressregulator einnehmen, analog der Funktion von RpoS in *E. coli* (Loewen et al. 1998; Weber et al. 2005) oder σ^B in *B. subtilis* (Hecker and Volker 1998; Price et al. 2001). Die Bindung von CgtR4 an den vollständigen *pstS*-Promotor (R-1F0) konnte auch in einem Parallelexperiment mit Rohextrakten von *C. glutamicum* WT, die unter ausreichender

Phosphatkonzentration (13 mM) und 40 g/l Glucose kultiviert wurden, identifiziert werden (Abb. 14). Während PhoR bei Phosphatüberschuss nicht an den Promotor band, interagierten in diesem Experiment die Transkriptionsregulatoren CgtR4, NCgl1401 und NCgl2978 mit dem *pstS*-Promotor (Abb. 14). Das Gen für den Transkriptionsregulator NCgl1401 liegt unmittelbar neben den Genen für den ABC-Transporter *pctABCD*, der für die Aufnahme einer unbekannten Phosphorkomponente kodiert und dessen Expression durch Phosphatmangel induziert wird (Ishige et al. 2003). Deshalb ist es möglich, dass NCgl1401 für die Regulation dieses Transporters notwendig ist.

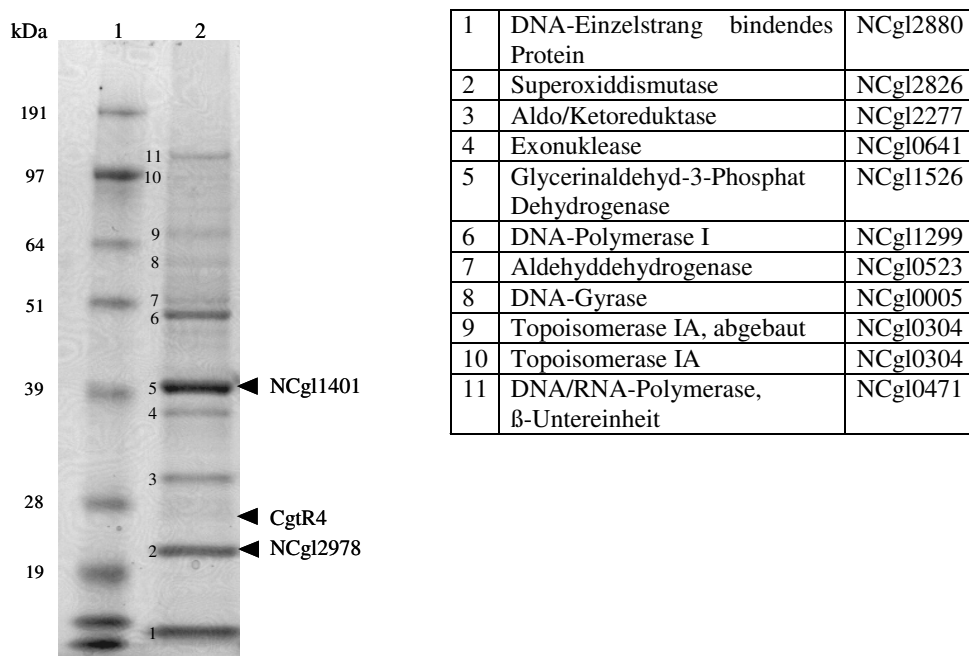


Abb. 14: Coomassie gefärbtes SDS-Gel von Proteinen, die über DNA-Affinitätschromatographie mit dem *pstS*-Promotor R-1F0 angereichert wurden. Es wurden Rohextrakte aus *C. glutamicum* WT nach Kultivierung in CGXII-Minimalmedium unter ausreichender Phosphatkonzentration und 40 g/l Glucose verwendet. Spur 1: Proteinstandard *Seebblue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe). Spur 2: Eluat der DNA-Affinitätschromatographie. Die Proteinbanden in Spur 2, in der CgtR4 und NCgl1401 durch MALDI-TOF MS identifiziert werden konnten, sind durch einen Pfeil markiert. Die übrigen durch MALDI-TOF MS identifizierten Proteine sind nummeriert und in der abgebildeten Tabelle dargestellt.

Der Transkriptionsregulator NCgl2978 gehört zur Familie der AlgH-Regulatoren, die in *Pseudomonas aeruginosa* die Synthese der Succinyl-CoA-Synthetase sowie der Nukleosiddiphosphatase kontrollieren (Shankar et al. 1995; Cowley et al. 2005). Das Gen für NCgl2978 befindet sich innerhalb eines Operons neben den Genen *brnF-2* und *brnE-2* (Kennerknecht 2003), die eine hohe Sequenzidentität zu *brnF-1* und *brnE-1* aufweisen und

für den Isoleucinexporter BrnFE kodieren (Kennerknecht et al. 2002). Die Funktion des paralogen Systems BrnFE-2 ist bisher noch ungeklärt, es wird jedoch vermutet, dass sie wahrscheinlich für den Transport von kleinen, hydrophoben Substraten notwendig sind (Kennerknecht 2003). Ob die Transkriptionsregulatoren NCgl1401 oder NCgl2978 wichtig für die Phosphatverwertung sind und an den *pstS*-Promotor binden, muss in der Zukunft durch weitere Experimente geklärt werden.

In einem weiteren Experiment mit dem um 35 bp verkürzten Promotor R0F0, dem die putative PhoR-Bindestelle fehlt, sowie Rohextrakten von *C. glutamicum* WT, angezogen unter Phosphatmangel, konnte PhoR nicht isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente und die Transkriptions-Fusionsanalysen legen den Schluss nahe, dass PhoR in der 35 bp langen Region bindet, in denen sich R-1F0 und R0F0 unterscheiden.

Mit Hilfe der Technik der Affinitätschromatographie konnten insgesamt sechs Transkriptionsregulatoren isoliert werden, die an den *pstS*-Promotor binden: PhoR, RamB, CgtR4, GlxR, NCgl1401 und NCgl2978 (Abb. 15). PhoR interagierte dabei nur unter Phosphatmangelbedingungen mit dem vollständigen *pstS*-Promotor (R-1F0), nicht aber mit einem 35 bp kürzeren Fragment (R0F0). Der Acetatregulator RamB interagiert mit dem *pstS*-Promotor sowohl auf Glucose-Minimalmedium unter ausreichender Phosphatkonzentration als auch auf Acetat-Minimalmedium unter Phosphatmangel. In gleicher Weise verhielt sich CgtR4, während GlxR nur auf Acetat-Minimalmedium bei Phosphatmangel an den *pstS*-Promotor band. Die Transkriptionsregulatoren NCgl1401 und NCgl2978 hingegen gingen nur nach Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatkonzentration mit dem vollständigen *pstS*-Promotor (R-1F0) eine Interaktion ein.

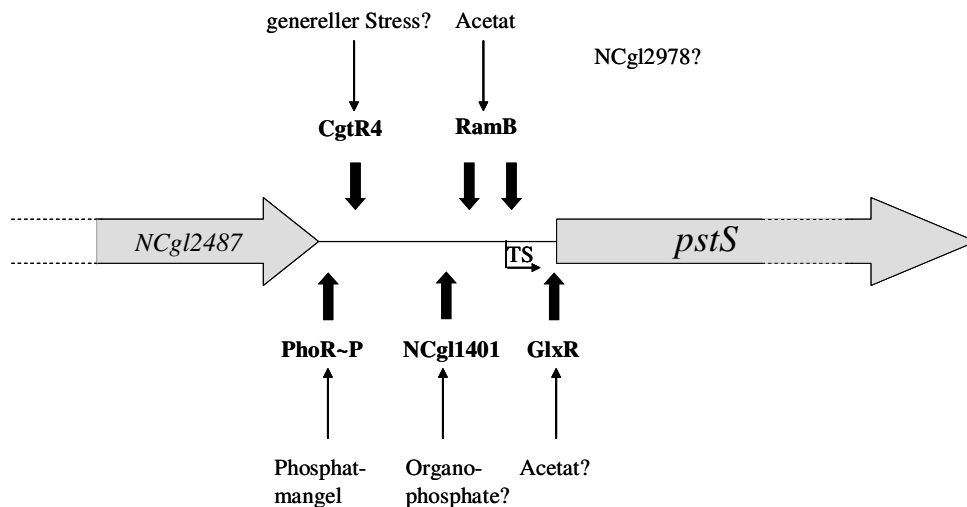


Abb. 15: Modell der Regulation des *pstS*-Promotors durch sechs verschiedene Transkriptionsregulatoren und deren möglichen Stimuli.

4.7. Interaktion zwischen aufgereinigtem GlxR-Protein und dem *pstS*-Promotor *in vitro*

In den DNA-Affinitätsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsregulator GlxR *in vitro* mit dem *pstS*-Promotor interagiert. Bisher gab es keine Hinweise auf eine Verknüpfung der Regulation des Phosphor- und Kohlenstoffstoffwechsels. Der Transkriptionsfaktor GlxR wurde durch die Repression mit *lacZYA*, das mit dem Promotor der Malatsynthase fusioniert wurde, isoliert und gehört zur Familie der cAMP-Rezeptorproteine (crp) (Kim et al. 2004). *C. glutamicum* GlxR war in der Lage, eine *E. coli crp* Deletionsmutante in trans zu komplementieren (Kim et al. 2004). In Gelretardierungsexperimenten konnte festgestellt werden, dass *C. glutamicum* GlxR an den *aceB*-Promotor bindet und die Expression dieses Gens reprimiert (Kim et al. 2004). Das Gen *aceB* kodiert für das Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus Malatsynthase (Reinscheid et al. 1994b). Außerdem bindet GlxR auch an die Promotoren der Gene *gntP* und *gntK*, die für die Gluconatpermease und die Gluconatkinase kodieren, und für die Verwertung von Gluconat essentiell sind (Letek et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass GlxR nur in Gegenwart von cAMP an die Promotoren von *aceB*, *gntP* und *gntK* bindet (Kim et al. 2004; Letek et al. 2006). GlxR könnte als cAMP-abhängiger Transkriptionsregulator in *C. glutamicum* eine ähnlich zentrale Funktion zukommen wie CcpA (catabolite control protein A) in *B. subtilis* oder CRP (cAMP receptor protein) in *E. coli*, welche Gene des Kohlenstoffabbaus wie das Laktose-Operon oder das Arabinose-Operon regulieren (Epstein et al. 1975; Gaston et al.

1990; Reznikoff 1992; Hueck and Hillen 1995; Tobisch et al. 1999; Stulke and Hillen 2000; Moreno et al. 2001; Gosset et al. 2004; Lorca et al. 2005), wobei nur CRP für seine Funktion cAMP als Effektor benötigt (Ren et al. 1990). Sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* ist eine Verknüpfung der Regulation des Phosphor- und Kohlenstoffstoffwechsels bekannt. In *E. coli* reprimiert cAMP-CRP die Transkription zweier Gene des Phosphatmangelstimulons, *psiE* und das *ugp*-Operon (Kasahara et al. 1991; Kim et al. 2000). In *B. subtilis* konnte kürzlich gezeigt werden, dass CcpA die Gene für das zentrale Kontrollsystem des Phosphorstoffwechsels, das Zweikomponentensystem PhoRP, reprimiert (Choi and Saier 2005; Puri-Taneja et al. 2006), Allerdings konnte bisher jedoch weder in *E. coli* noch in *B. subtilis* gezeigt werden, dass CRP oder CcpA das *pstSCAB*-Operon reguliert.

Um zu bestimmen, ob GlxR aus *C. glutamicum* den *pstS*-Promotor direkt reguliert und ob für die Interaktion cAMP benötigt wird, wurde die Protein-DNA-Interaktion zwischen GlxR und dem *pstS*-Promotor *in vitro* charakterisiert. Dazu wurde das mit einer N-terminalen His-Tag-Markierung versehene GlxR in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert und anschließend durch Affinitätschromatographie homogen aufgereinigt (Abb. 16). Nach der Aufreinigung über Nickel-NTA-Säulen wurde die His-Tag-Markierung durch Proteolyse mit Faktor Xa abgespalten.

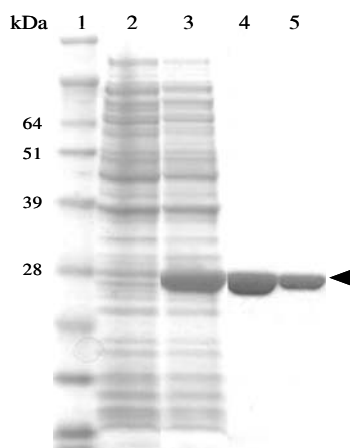


Abb. 16: Aufreinigung von GlxR, das durch den Pfeil markiert ist. In Spur 1 befindet sich der Proteinstandard *Seebblue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe). In Spur 2 ist der Zellaufschluss vor der Induktion mit IPTG zu sehen. In Spur 3 ist überexprimiertes GlxR 4 h nach Induktion mit IPTG zu sehen. In Spur 4 sieht man aufgereinigtes GlxR nach Elution mit Imidazol von einer Nickelchelataffinitätssäule und in Spur 5 aufgereinigtes GlxR nach Umpuffern in den BS-Puffer und Verdau mit Faktor Xa. Die Proteine wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassieblau gefärbt.

Zum Nachweis der Protein-DNA-Interaktion wurden Gelretardierungsexperimente durchgeführt. Die Gelretardierungstests zeigten, dass GlxR an den vollständigen *pstS*-Promotor R-1F0 mit einer hohen Affinität bindet, d.h. schon bei 20-fach molaren Überschuss des Proteins (Abb. 17). Die Bindung von GlxR an den *pstS*-Promotor erfolgte dabei nur in Anwesenheit von 0,2 mM cAMP. Jedoch bildete auch das als Negativkontrolle verwendete Promotor-DNA-Fragment NCgl0430 einen Komplex mit GlxR, wenn auch mit einer mindestens zehnfach niedrigeren Affinität als der *pstS*-Promotor. Dies wurde auch bei verschiedenen anderen Negativkontrollen (NCgl1646, NCgl1127, NCgl1120 und NCgl0665) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dennoch kann die Interaktion zwischen GlxR und dem *pstS*-Promotor als spezifisch angesehen werden, da sie nur in Gegenwart von 0,2 mM cAMP stattfindet. Die Beobachtung, dass GlxR nur in Abhängigkeit von cAMP aktiv ist, wurde bei *C. glutamicum* kürzlich auch schon für die Gene *aceB*, *gntP* und *gntK* gezeigt (Kim et al. 2004; Letek et al. 2006).

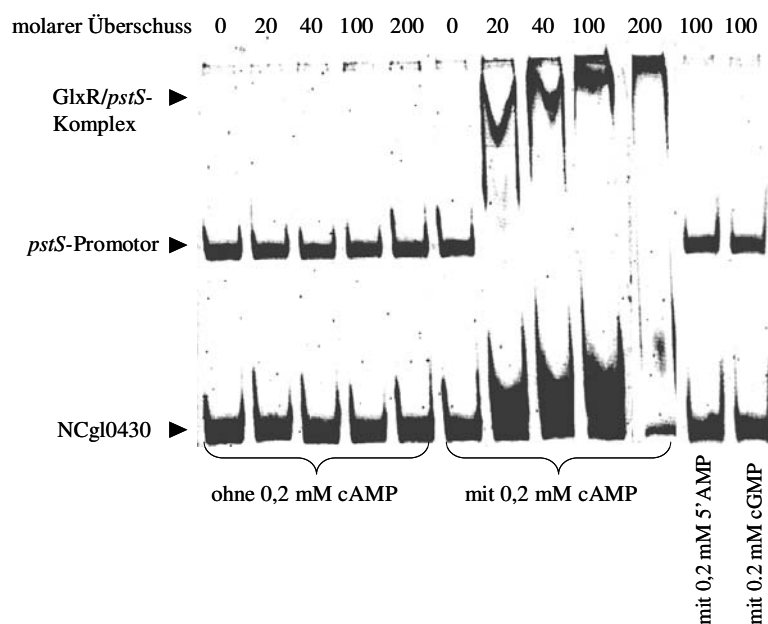


Abb. 17: Gelretardierungstests mit GlxR und dem *pstS*-Promotor. Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem GlxR (20 – 200-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507-bp Fragment) in Abhängigkeit von 0,2 mM cAMP. Die Gelretardierung erfolgt nicht mit 0,2 mM 5'AMP oder 0,2 mM cGMP. Als Negativkontrolle wurde ein 185 bp langes Fragment des Promotors NCgl0430 (41 nM) eingesetzt. Dieses zeigte aber auch eine Bindung an GlxR.

GlxR-homologe Transkriptionsregulatoren aus z.B. *M. tuberculosis* (Rickman et al. 2005), *E. coli* (Adhya and Garges 1990; Botsford and Harman 1992) und *S. coelicolor* (Derouaux et al. 2004) binden ihre Zielgene ebenfalls nur in Anwesenheit von cAMP oder cGMP. Für die Bindung von GlxR aus *C. glutamicum* an den *pstS*-Promotor konnte jedoch gezeigt werden, dass in *C. glutamicum* cAMP weder durch 0,2 mM cGMP noch durch 0,2 mM 5' AMP ersetzt werden konnte (Abb. 17).

Zur Lokalisierung der GlxR-Bindestelle wurden verschiedene Teilfragmente des *pstS*-Promotors in den Gelretardierungsexperimenten benutzt. Alle eingesetzten Fragmente waren in der Lage, mit GlxR zu interagieren (Abb. 18). Dabei fiel jedoch auf, dass die Bindung an die Teilfragmente des *pstS*-Promotors mit zunehmender Verkürzung der 5'-Region (R1 bis R4), abnimmt (Abb. 18). Daraus lässt sich schließen, dass in der 5'-Region, die insgesamt 232 bp lang ist und sich von -126 bp bis 106 bp bezogen auf den Transkriptionsstart (Kocan et al. 2006) erstreckt, wahrscheinlich ein Bindemotiv für GlxR liegt. Die Lokalisierung der GlxR-Bindestelle in dieser Region lässt keine Rückschlüsse auf eine aktivierende oder reprimierende Funktion von GlxR zu.

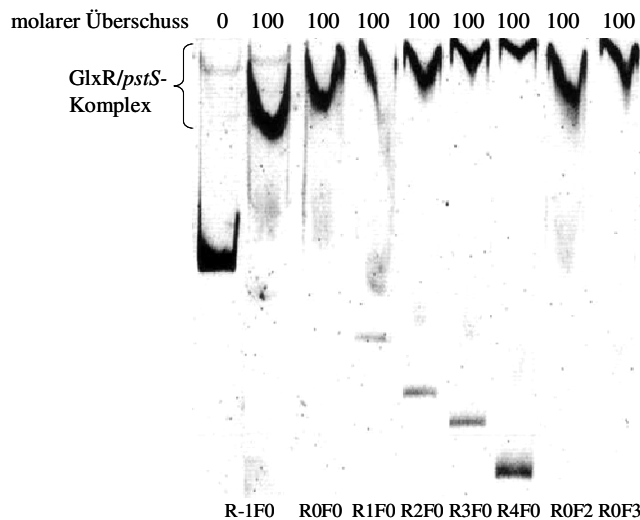


Abb. 18: Gelretardierungstests mit GlxR und dem *pstS*-Promotor. Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem GlxR (100-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507-bp Fragment) oder die Fragmente R0F0, R1F0, R2F0, R3F0, R4F0, R0F2 und R0F3. (15 nM, 507-bp Fragment) in Abhängigkeit von 0,2 mM cAMP. Mit zunehmender Verkürzung der 5'-Region (R1 bis R4) nimmt die Interaktion zwischen GlxR und den Teilfragmenten des *pstS*-Promotors ab. Es wurde keine Negativkontrolle eingesetzt.

4.8. Interaktion zwischen aufgereinigtem RamB-Protein und dem *pstS*-Promotor *in vitro*

RamB interagiert mit dem *pstS*-Promotor sowohl bei Wachstum auf Glucose als auch bei Wachstum auf Acetat (Abb. 11 und 13). Als konserviertes RamB-Bindemotiv konnte durch Gerstmeir *et al.* die Sequenz 5'-AA/GAACTTTGCAAA-3' identifiziert werden (Gerstmeir *et al.* 2004). Eine bioinformatische Analyse identifizierte diese oder sehr ähnliche Sequenzen in den Promotorregionen einer Anzahl von Genen, die hauptsächlich für Enzyme des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels kodieren und zum Acetatstimulon gehören (Gerstmeir *et al.* 2003; Gerstmeir *et al.* 2004).

Ein RamB-Bindemotiv innerhalb der *pstS*-Promotorregion wurde in diesen Analysen nicht identifiziert (Gerstmeir *et al.* 2004). Bei einer genaueren bioinformatischen Analyse der *pstS*-Promotorregion (Abb. 19) gelang es jedoch zwei nicht vollständig konservierte RamB-Bindemotive zu identifizieren: die Sequenz 5'-AGAA_TTTGCCGA-3' (-74 to -88) wurde als Bindemotiv A bezeichnet und weist 10 identische Basenpaare zum 13 bp-Motiv auf. Die reverse komplementäre Sequenz 5'-ACGACTT_AAAAA-3' (+2 to -9) wurde als Bindemotiv B bezeichnet und zeigte 8 bp-Übereinstimmungen zum konservierten Bindemotiv (Abb. 19).

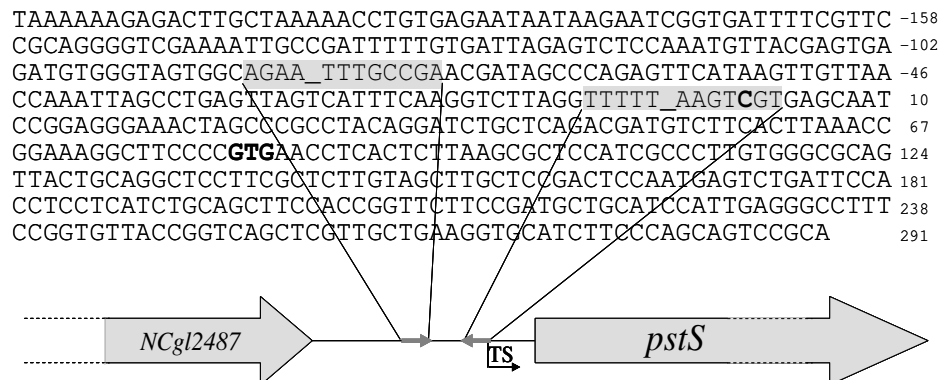


Abb. 19: Identifizierung von zwei RamB-Bindemotiven im *pstS*-Promotor. Das Bindemotiv A befindet sich von -74 bis -88, während das Bindemotiv B von -9 bis +4 relativ zum Transkriptionsstart (Kocan *et al.* 2006) zu finden ist (TS). Das Bindemotiv A zeigt eine direkte Übereinstimmung in 10 von 13 bp (grau markiert) ausgehend vom hochkonservierten 13 bp Motiv (Gerstmeir *et al.* 2004). Das Bindemotiv B zeigt die Übereinstimmung in entgegengesetzter Richtung in 8 (grau markiert) von 13 bp (Gerstmeir *et al.* 2004). Die Pfeile zeigen die Lokalisation der zwei RamB-Bindemotive im *pstS*-Promotor an. Der Transkriptionsstart ist durch C (fett) und der Translationsstart durch GTG (fett) dargestellt.

Um zu überprüfen, ob RamB den *pstS*-Promotor direkt reguliert, wurde die Bindung von RamB an den *pstS*-Promotor durch Gelretardierungstests analysiert. Für dieses Experiment

wurde RamB, das mit einem N-terminalen His-Tag in den Überexpressionsvektor pET29b kloniert worden war, im *E. coli* BL21(DE3)-Stamm überexprimiert und über Nickelaffinitätschromatographie homogen aufgereinigt (Abb. 20).

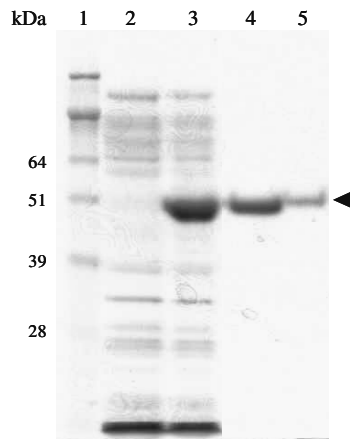


Abb. 20: Aufreinigung von RamB, das durch den Pfeil markiert ist. In Spur 1 befindet sich der Proteinstandard *Seebue II prestained Standard* (Invitrogen, Karlsruhe). In Spur 2 ist der Zellaufschluss vor der Induktion mit IPTG zu sehen. In Spur 3 ist überexprimiertes RamB 4 h nach Induktion mit IPTG zu sehen. In Spur 4 sieht man aufgereinigtes RamB nach Elution mit Imidazol von einer Nickelchelataffinitätssäule und in Spur 5 aufgereinigtes RamB nach Umpuffern in den BS-Puffer. Die Proteine wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassieblau gefärbt.

Die Gelretardierungsexperimente zeigten, dass RamB *in vitro* mit einer hohen Affinität an den vollständigen *pstS*-Promotor (R-1F0) bindet, wobei die eingesetzte Negativkontrolle NCgl0430 keinen Komplex mit RamB bildete (Abb. 21). Die *pstS*-RamB-Komplexbildung konnte bei einem 50-fachen molaren Überschuss von RamB beobachtet werden (Abb. 21). Da RamB zu den instabilen Proteinen gehört und seine Aktivität sehr schnell verliert (Halbwertszeit 3 Tage), was sich auch anhand der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms Protparam voraussagen lässt (www.expasy.org/cgi-bin/protparam) (Gasteiger 2005), wurde in jedem Gelretardierungsexperiment als Aktivitätskontrolle auch die Interaktion zwischen dem vollständigen Promotor R-1F0 und RamB getestet.

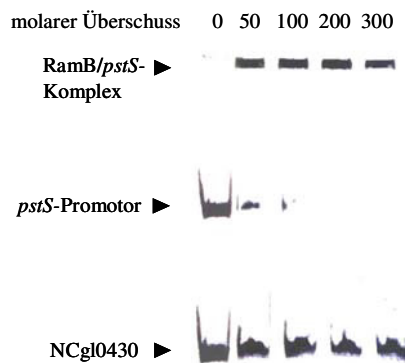


Abb. 21: Gelretardierungstests mit RamB und der *pstS*-Promotorregion. A) Das aufgereinigte RamB-Protein wurde in verschiedenen Konzentrationen (50 – 300-facher molarer Überschuss) mit 15 nM des vollständigen *pstS*-Promotors (R-1F0) inkubiert. Dieses Promotorfragment ist 507 bp lang und erstreckt sich von -216 bis +290, bezogen auf den Transkriptionsstart. In dieser Region sind zwei mögliche RamB-Bindemotive (AA/GAACTTTGCAAA) enthalten. Als Negativkontrolle wurde ein 185 bp langes Fragment des Promotors von NCgl0430 (41 nM) benutzt.

Bei den Gelretardierungstests mit 14 verschiedenen Teilfragmenten des *pstS*-Promotors (Abb. 22A) konnte gezeigt werden, dass RamB an zwei Sequenzen des *pstS*-Promotors bindet, die sehr gut mit den bioinformatisch vorhergesagten übereinstimmen (Abb. 19 und 22A und B). Die Interaktion von RamB mit Fragmenten, die beide putative Bindemotive enthielten (R-1F0, R0F0, R1F0, R0F2, R0F3, R1F3 und R1cF3c, Abb. 22A, B, 23A, 24) war stärker als die Bindung von RamB an die Fragmente, die nur ein Bindemotiv enthielten (R2F0, R2F2 und R-1F4, Abb. 22A, B, 23B und C). Zwischen dem Fragment R3F0 und RamB konnte keine Komplexbildung beobachtet werden (Abb. 22A und B), da diesem Fragment beide Bindemotive fehlen. Deshalb wurde dieses Fragment in den folgenden Gelretardierungsexperimenten als Negativkontrolle eingesetzt.

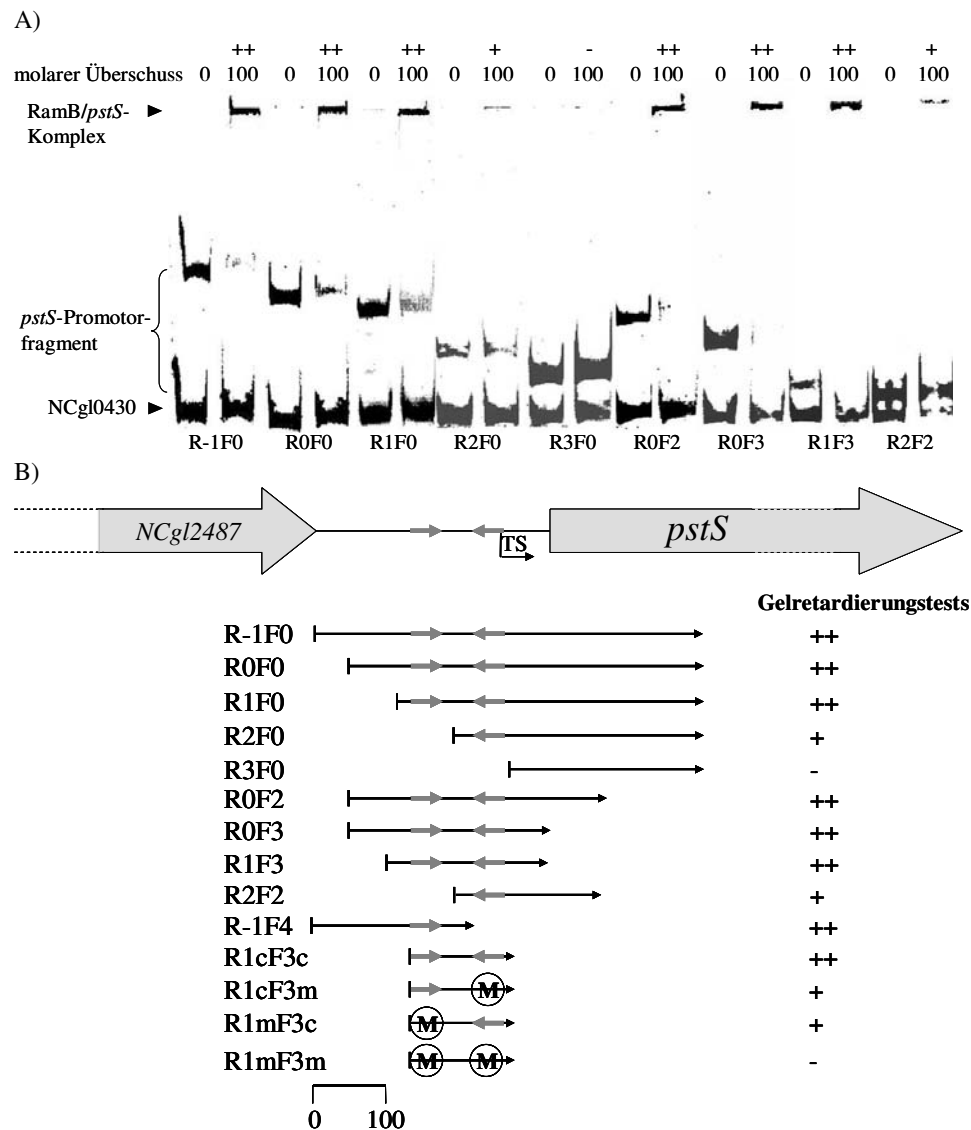


Abb. 22: A) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (100-facher molarer Überschuss) an verschiedene Fragmente des *pstS*-Promotors (124 bp - 507 bp, Endkonzentrationen 61 nM - 15 nM). Über dem Gel ist angegeben, ob RamB an das Fragment genauso gut gebunden hat wie an den vollständigen Promotor R-1F0 (++), schlechter als an R-1F0 (+) oder überhaupt nicht (-). Die DNA-Protein-Mischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie auf einem 10%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Sybr Green I gefärbt wurde. B) Darstellung der DNA-Fragmente, die benutzt wurden, um die Bindung von RamB an den *pstS*-Promotor durch Gelretardierungstests nachzuweisen. Die Pfeile markieren zwei mögliche RamB-Bindemotive. Auf der rechten Seite ist gezeigt, ob RamB an das Fragment genauso gut gebunden hat wie an den vollständigen Promotor R-1F0 (++), schlechter als an R-1F0 (+) oder überhaupt nicht (-). Der Transkriptionsstart ist mit TS angegeben. M zeigt ein mutiertes RamB-Bindemotiv an.

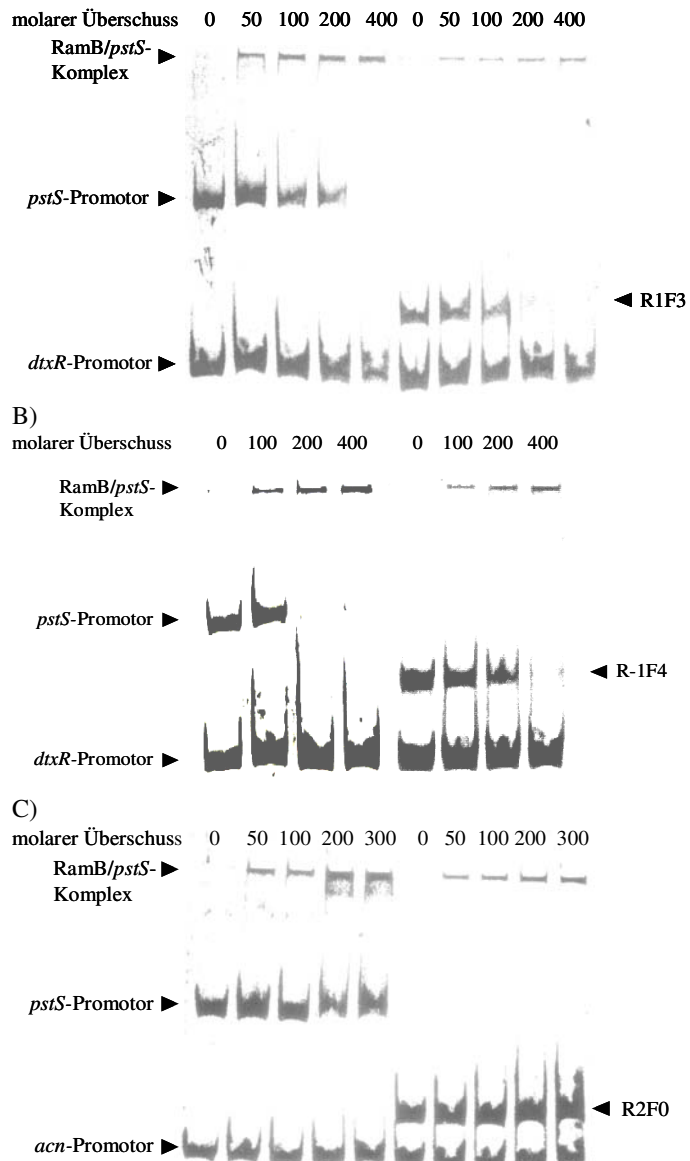


Abb. 23: Gelretardierungstests mit RamB und dem *pstS*-Promotor. A) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (50 – 400-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507 bp Fragment) und an das Fragment R1F3 (35 nM, 213 bp Fragment). B) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (100 – 400-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507 bp Fragment) und an das Fragment R-1F4 (33 nM, 230 bp Fragment). C) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (50 – 300-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507 bp Fragment) und an das Fragment R2F0 (21 nM, 324 bp Fragment). Das 122 bp lange *dtxR*-Promotorfragment (62 nM) und das 101 bp lange *acn*-Promotorfragment (50 nM) diente als Negativkontrolle.

Das kürzeste Fragment, das eine starke Bindung von RamB ermöglichte und beide Bindemotive enthielt war R1cF3c (Abb. 22B und 24). In dieses Fragment R1cF3c des *pstS*-Promotors, das beide putativen Bindemotive innerhalb einer 124 bp langen Sequenz enthält, wurden entweder Mutationen in das RamB-Bindemotiv A (R1mF3c, AGAAGGAGCCGA anstatt AGAATTTGCCGA), oder in das RamB-Bindemotiv B (R1cF3m, GCGGGAGTAAAAA anstatt TCAGACTTAAAAA), oder in beide RamB-Bindemotive (R1mF3m) eingeführt. Dabei wurden genau die Mutationen des konservierten Bindemotivs eingeführt, die bei Gerstmeir *et al.* zum Verlust der Bindung von RamB an den *aceA*- und *aceB*-Promotor führten (Gerstmeir et al. 2004). Die Gelretardierungsexperimente mit aufgereinigtem RamB zeigten, dass das Fragment R1mF3m, in dem beide Bindestellen mutiert sind, nicht mehr von RamB gebunden wurde (Abb. 22B, 24 und 25C), während die Fragmente R1cF3m sowie R1mF3c, in denen jeweils ein Bindemotiv mutiert worden ist, eine verringerte Interaktion mit RamB zeigten (Abb. 22B, 24, 25A und B).

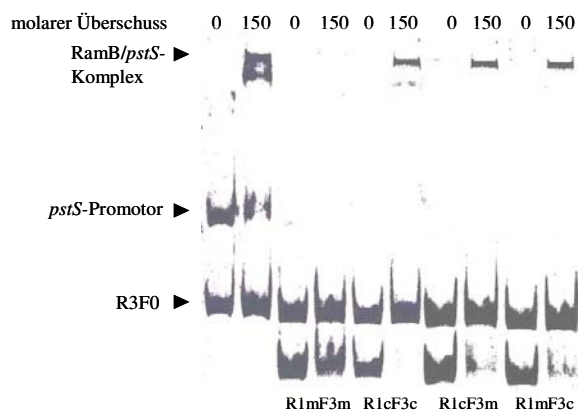


Abb. 24: Gelretardierungstests mit RamB und dem *pstS*-Promotor. Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (150-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507 bp Fragment) und an die Fragmente R1mF3m (61 nM, 124 bp Fragment), R1cF3m, R1mF3c und R1cF3c.

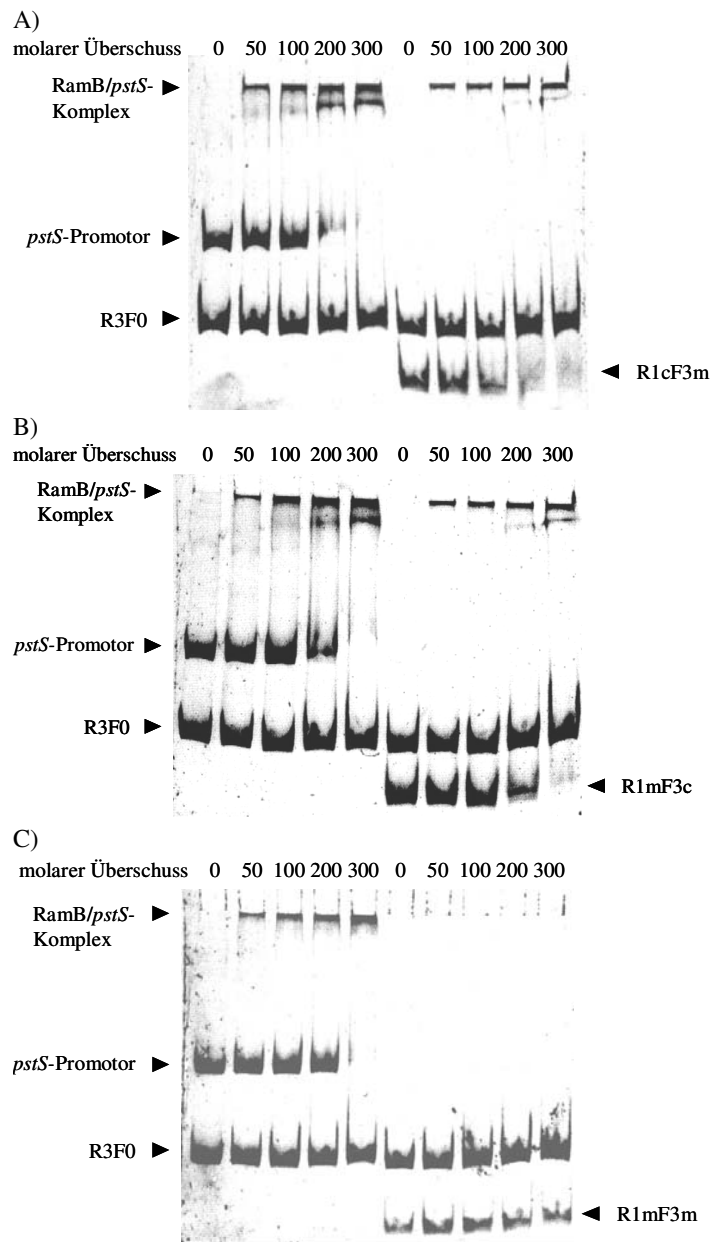


Abb. 25: Gelretardierungstests mit RamB und dem *pstS*-Promotor. A) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (50 - 300-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507 bp Fragment) und an das Fragment R1cF3m (61 nM, 124 bp Fragment). B) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (50 - 300-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM 507 bp Fragment) und an das Fragment R1mF3c (61 nM, 124 bp Fragment). C) Das Gel zeigt die Bindung von aufgereinigtem RamB (50 - 300-facher molarer Überschuss) an den *pstS*-Promotor (15 nM, 507 bp Fragment) und an das Fragment R1mF3m (61 nM, 124 bp Fragment). Ein 267 bp langes Fragment R3F0 (30 nM) aus der *pstS*-Promotorregion wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Somit zeigte sich bei den Gelretardierungstests mit RamB und den Fragmenten mit einem Bindemotiv, dass sowohl Bindemotiv A als auch Bindemotiv B für die Bindung von RamB ausreichen (Abb. 22B). Jedoch fiel die Interaktion zwischen RamB und dem Fragment mit nur einem Bindemotiv schwächer aus als mit einem Fragment, in dem beide Motive enthalten sind. Diese Ergebnisse wurden auch durch die Experimente mit den Fragmenten, bei denen eines der Bindemotive eine Mutation aufwies, bestätigt (Abb. 22B). Die Fragmente R1cF3m mit der Mutation im Bindemotiv B und das Fragment R1mF3c mit den Mutationen im Bindemotiv A waren beide in der Lage, eine Komplexbildung mit RamB einzugehen. Allerdings war die Interaktion schwächer als beim Kontrollfragment R1cF3c, in dem beide Motive intakt vorkamen (Abb. 22B). Nur an das Fragment R1mF3m konnte RamB nicht mehr binden, da in diesem Fragment Mutationen in beide Motive eingeführt wurden (Abb. 22B).

4.9. Analyse der Regulation des *pstS*-Promotors durch RamB *in vivo*

Um die Rolle von RamB für die Transkriptionsregulation des *pstS*-Promotors *in vivo* zu bestimmen, wurden Transkriptionsfusionsanalysen durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pET2_*R0F0* in die Deletionsmutante $\Delta ramB$ eingebracht und die Expression der *pstS*'-'*cat*-Transkriptionsfusion in dem erhaltenen Stamm $\Delta ramB$ (pET2_*R0F0*) und im Kontrollstamm *C. glutamicum* WT(pET2_*R0F0*) verglichen. Dabei wurde die Expression der Transkriptionsfusion pET2_*R0F0* in *C. glutamicum* WT und pET2_*R0F0* $\Delta ramB$ sowohl zeitabhängig vor und nach Auslösen des Phosphatmangels als auch auf verschiedenen Kohlenstoffquellen quantifiziert. Das Fragment R0F0 wurde deshalb ausgewählt, da die PhoR-Bindestelle fehlt und so eine Beeinflussung durch die PhoR-Kontrolle ausgeschlossen werden konnte. Für die Kultivierung wurde die Kultur entweder auf 40 g/l Glucose oder 20 g/l Acetat bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 4 angezogen und anschließend auf phosphatfreies CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose oder 20 g/l Acetat überimpft und zu den Zeitpunkten 10, 30, 60, 90 und 120 min geerntet.

Bei der Analyse der Promotoraktivität in diesen Proben zeigte sich in *C. glutamicum* WT eine signifikant, etwa zehnfach niedrigere Aktivität für pET2_*R0F0* auf 20 g/l Acetat im Vergleich zur Kultivierung auf 40 g/l Glucose (Tab. 3 und Abb. 26). Dies war der erste Hinweis darauf, dass die *pstS*-Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle reguliert wird. Die Deletionsmutante $\Delta ramB$ wies eine verzögerte und etwa 1,5-fach geringere Induktion des *pstS*-Promotors unter Phosphatmangelbedingungen auf Glucose-Minimalmedium auf (Abb. 26 und Tab. 3).

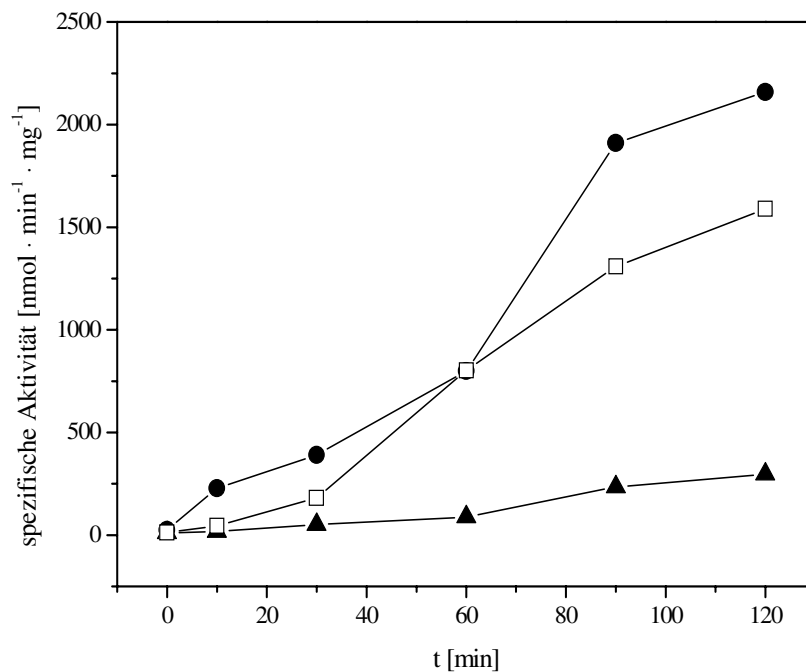


Abb. 26: Expression der R0F0-Transkriptionsfusion in *C. glutamicum* WT und $\Delta ramB$ nach Phosphatlimitierung in CGXII-Minimalmedium sowohl auf 40 g/l Glucose als auch auf 20 g/l Acetat. Das Promotorfragment R0F0 in *C. glutamicum* WT, angezogen auf CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose und unter Phosphatmangelbedingungen, ist durch einen Kreis dargestellt. Das Promotorfragment R0F0 in *C. glutamicum* WT angezogen auf CGXII-Minimalmedium mit 20 g/l Acetat und unter Phosphatmangelbedingungen, ist durch ein Dreieck dargestellt. Das Promotorfragment R0F0 in der Mutante $\Delta ramB$, angezogen auf CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose und unter Phosphatmangelbedingungen, ist durch ein offenes Quadrat dargestellt.

Im Gegensatz dazu war die Expression des *pstS*-Promotors auf 20 g/l Acetat in der Deletionsmutante $\Delta ramB$ 2-fach höher als in *C. glutamicum* WT (Tab. 3). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der Regulator RamB den *pstS*-Promotor bei einem Transfer von phosphathaltigem Glucose-Minimalmedium zu phosphatfreiem Glucose-Minimalmedium aktiviert. Bei einem Transfer von phosphathaltigem Acetat-Minimalmedium zu phosphatfreiem Acetat-Minimalmedium reprimiert dagegen RamB die Transkription des *pstS*-Promotors.

Tab. 3: Expression der *pstS*'-*cat*-Promotorfusion in *C. glutamicum* WT und $\Delta ramB$

Stamm	4 % (w/v) Glucose		2 % (w/v) Acetat	
	spezifische Aktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]		spezifische Aktivität [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	
	+Phosphat	-Phosphat	+Phosphat	-Phosphat
WT	0.02	2.1	0.01	0.22
$\Delta ramB$	0.02	1.23	0.01	0.42

Die Inkubation auf phosphatfreiem CGXII-Minimalmedium erfolgte für 90 min. Es wurden mindestens drei Bestimmungen von zwei unabhängigen Kultivierungen durchgeführt. Die errechneten Durchschnittswerte wiesen eine Standardabweichung von < 15 % auf.

Dieses Ergebnis stimmt auch sehr gut mit den Ergebnissen aus den Experimenten der Affinitätschromatographie überein, da RamB mit dem *pstS*-Promotor sowohl auf 40 g/l Glucose als auch auf 20 g/l Acetat interagierte (Abb. 11 und 13). Außerdem bindet RamB an zwei Bindestellen, von denen eine die für Aktivatoren typische Anordnung gegenüber dem Transkriptionsstart und die andere eine für Repressoren typische Anordnung aufweist.

4.10. Vergleich der Phosphatmangel induzierten Genexpression in *C. glutamicum* WT auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Phosphatmangelinduktion des *pstSCAB*-Operons von der Kohlenstoffquelle abhängt, wurden mit Hilfe von DNA-Microarrays das Transkriptom von *C. glutamicum* WT 90 min nach Auslösen des Phosphatmangels auf Glucose- bzw. Acetat-Minimalmedium verglichen.

Tab. 4: Gene, deren mRNA-Spiegel in *C. glutamicum* WT auf 40 g/l Glucose nach 90 min Phosphatmangel im Vergleich zu *C. glutamicum* WT auf 20 g/l Acetat nach 90 min Phosphatmangel mindestens 2-fach erhöht war

NCgl	Gen	Beschreibung	WT 4% Glucose/ WT 2% Acetat
0358	<i>ramB</i>	Regulator des Acetatmetabolismus	3,5
0678	<i>ptsR1</i>	Acetyl-CoA-Carboxylase	11,3
1400	<i>psiB</i>	wahrscheinlich alkalische Phosphatase	4,2
1030	<i>phnB1</i>	PhnB1 ähnliches Protein	2,3
1403	<i>pctC</i>	ABC-Transporter, Permease	5,2
1330	<i>ugpE</i>	G3P ABC Transporter, Permease	2,1
1329	<i>ugpA</i>	G3P ABC Transporter, Permease	31,2
2503	<i>nucH</i>	Nuklease	5,4
2483	<i>pstB</i>	Phosphat-ABC Transporter, ATP bindendes Protein	2,0
2959		putative sezernierte Phosphoesterase	4,3
0064	<i>phoH1</i>	unter Phosphatmangel induzierbares Protein, ATPase verwandt	5,2
0322	<i>ushA</i>	UDP-Zuckerhydrolase/5'Nukleotidase	2,4

12 Gene zeigten 90 min nach dem Transfer von Glucose-Minimalmedium auf phosphatfreies Glucose-Minimalmedium eine stärkere Induktion als nach dem Transfer von Acetat-Minimalmedium auf phosphatfreies Acetat-Minimalmedium (Tab.4). Wie erwartet ist darunter das Gen für RamB, den Regulator des Acetatmetabolismus, der für seine Zielgene auf Glucose als Repressor agiert. Weiterhin sind auch die Gene des Phosphatmangelstimulons

psiB, *phnB*, *pctC*, *ugpE*, *ugpA*, *nucH*, *pstB*, *phoH1* und *ushA* auf Glucose nach 90 min Phosphatmangel mindestens 2-fach stärker induziert als auf Acetat-Medium (Tab. 4).

Tab. 5: Gene, deren mRNA-Spiegel in *C. glutamicum* WT auf 40 g/l Glucose nach 90 min Phosphatmangel im Vergleich zu *C. glutamicum* WT auf 20 g/l Acetat nach 90 min Phosphatmangel mindestens 2-fach erniedrigt war

NCgl	Gen	Beschreibung	WT 4% Glucose/ WT 2% Acetat
2657	<i>pta</i>	Phosphatacetyltransferase	0,27
0795	<i>gltA</i>	Citratsynthase	0,46
1482	<i>acn</i>	Aconitase	0,34
2765	<i>pck</i>	Phosphoenolpyruvatkinase	0,22
2248	<i>aceA</i>	Isocitratlyase	0,01
2247	<i>aceB</i>	Malatsynthase	0,05
2112	<i>ctaE</i>	Cytochrom-C-Oxydase III	0,47
2518	<i>phoS</i>	Phosphatsensorkinase	0,47
2517	<i>phoR</i>	Phosphatantwortregulator	0,33

9 Gene wiesen 90 min nach dem Transfer in phosphatfreies Glucose-Minimalmedium eine schwächere Induktion auf als beim Transfer in phosphatfreies Acetat-Minimalmedium (Tab. 5). Wie zu erwarten, sind darunter hauptsächlich die Gene des RamB-Regulons (NCgl 2657, *gltA*, *acn*, *pck*, *aceA*, *aceB* und *ctaE*) (Gerstmeir et al. 2004). Überraschenderweise wurden aber auch die Gene des Zweikomponentensystem PhoRS beim Transfer in phosphatfreies Acetat-Minimalmedium verstärkt exprimiert. Bei einer eingehenden bioinformatischen Analyse der Promotorregion der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS wurde jedoch keine RamB-Bindestelle identifiziert. Allerdings findet sich eine Bindestelle für den Regulator des Acetatstoffwechsels A (RamA) mit der Sequenz A/C/TG₄₆T/C, der auf Acetat die Expression der Gene Acetatkinase, Phosphotransacetylase, Isocitratlyase und Malatsynthase aktiviert (Cramer et al. 2006).

Das Bindemotiv im *phoS*-Promotor ist als Tandemrepeat mit der Sequenz TGGTGGGT und TGGGGCGT zweimal vorhanden und ist durch 7 Nukleotide, anstatt durch 4 – 5 Nukleotide, voneinander getrennt (Abb. 27). Damit weicht es durch eine Base vom hochkonservierten Bindemotiv ab. Außerdem befindet sich ein einzelnes RamA-Bindemotiv mit der Sequenz ACCCCA vor dem Translationsstart, das ebenfalls für die Interaktion mit RamA ausreichen könnte (Ermer, Cramer & Eikmanns, unveröffentlicht). Es lässt sich also vermuten, dass die Expression der Gene des Zweikomponentensystems PhoS-PhoR auf Glucose durch RamA reprimiert wird.

```

CCTACCTGCGCCGCAAGGTGGACACCCAGGATCCGCAGCTAATTCAGACTGTTCTGTTGGCGTT
GGATATGTTCTGCGCACCCACGCTAGCTAAATTCTCCTATGGAAAATCCTTATGTTGCTGCG
CTCGATGACGAAAACCAAGAAGTCGGCGTAAAAAAGAAGCAGAAAAAGAACCTGAAATAGG
TCCCATCAGAGCTGCCGGACGAGCCATACCGCTGCGCACCCGCATCATTTTGATCGTGGTGG
GTATCGCCGGGCTTGGTTTGCTGGTCAACGCGATTGCTGTCTCCAGCCTCATGCGTGAAGTT
TCCTATACCCGCATGGATCAAGAGCTAGAGACCTCGATGGGGACGTGGGCGCATAACGTTGA
GCTGTTTAAATTCGATGGCGTCCGCCAAGGGCCACCCAGCGATTATTATGTGGCCAAGGTTT
TTCCTGATGGATCCAGCATCATCTTCAACGATGCACAATCGGCACCCGATCTAGCTGAAACC
ACCATCGGTACTGGTCCACACACTGTGGATGCTGCTAGCGGTTCTGCCTCCAACACTCCGTG
GCGTGTGATGGCGGAAAAGAACGGTGACATTATCACCGTGGTGGGTAAAAGCATGGGGCGTG
AAACAAACCTGCTGTACCGATTGGTGATGGTGCAGATGATCATCGGCGCGCTGATTCTGGTT
GCTATTTTGATTACTTCACTCTTCCTAGTCAGACGCTCGTTGCGGCCGTTGAGAGAAGTTGA
AGAGACCGCCACCAGGATTGCGGGCGGTGATTTGGATCGACGTGTCCGCGAGTGGCCAATGA
CCACAGAAGTCGGACAGCTGTGCAATGCCCTCAATATCATGTTGGAGCAGCTCCAAGCCTCA
ATTCTGACCGCCAGCAAAAAGAAGCTCAGATGCGCCGATTCTGTTGGCGATGCCTCCACGA
GCTCCGCACACCACTGACCTCTGTGAAGGGCTTCACCGAGCTGTATTCATCAGGTGCAACAG
ATGATGCCAACTGGGTTCATGTCCAAGATCGGTGGCGAAGCCCAACGCATGAGTGTGCTTGTG
GAAGACCTCCTGTCACTGACGCGTGCCGAAGGCCAGCAAATGGAGAAGCACCGCGTTGACGT
GCTGGAACCTCGCCTTGGCAGTACGCGGATCCATGCGAGCAGCCTGGCCAGATCGCACAGTCA
ATGTATCCAACAAAGCTGAGTCCATTCCGTTGTCAAAGGCGACCCAACTCGCCTCCACCAA
GTGCTTACCAACCTGGTTGCCAACGGAATAAACACGGCGGACCGGACGCGGAAGTCAGCAT
TGAGATCAACACCGATGGACAAAACGTGAGGATTCTCGTGGCAGACAACGGTGTGCGGAATGT
CTGAAGAAGATGCTCAGCATATCTTCGAGCGTTTCTACCGCGCCGATTCTCCCGCTCACGC
GCATCCGGCGGATCGGGCCTCGGCCTTGCGATCACGAAATCCCTGGTTCGAAGGCCACGGCGG
CACAGTCACCGTCGACAGCGTGCAAGGCGAAGGCACGGTGTTACGATCACCTTGCCGGCGG
TTTCTTAA

```

Abb. 27: Identifizierung von zwei RamA-Bindemotiven im *phoS*-Promotor. Beide Bindemotive befinden sich in einem Tandemrepeat (grau markiert) und unterscheiden sich durch eine Base vom hochkonservierten Bindemotiv A/C/TG_{4,6}T/C und sind anstatt durch 4 – 5 durch 7 Nukleotide voneinander getrennt. Außerdem befindet sich ein einzelnes RamA-Bindemotiv vor dem Translationsstart, der durch ATG (fett) dargestellt ist.

4.11. Genomweiter Analyse der mRNA-Stabilität in *C. glutamicum*

In Bakterien erfolgt die genetische Regulation im Wesentlichen durch Kontrolle der Initiation der Transkription (Stulke 2002; Hambræus et al. 2003). Neben der Transkriptionsregulation findet sich in Bakterien auch Attenuation, mRNA-Abbau, Translationskontrolle sowie verschiedene Arten der posttranslationalen Kontrolle als Mechanismen der genetischen Regulation (Belasco and Higgins 1988; Alifano et al. 1994; Ibba and Soll 1999; Henkin and Yanofsky 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von DNA-Microarrays effizient und genomweit mRNA-Halbwertszeiten bestimmt werden können (Bernstein et al. 2002; Hambræus et al. 2003; Selinger et al. 2003). Da bis jetzt noch nichts über den mRNA-Abbau in *C. glutamicum* bekannt war und, um der Frage nachzugehen, ob Gene des Phosphatmangelstimulons einer Kontrolle durch mRNA-Abbau unterliegen, wurden die mRNA-Halbwertszeiten in *C. glutamicum* bestimmt. Dafür wurde *C. glutamicum* WT in CGXII-Minimalmedium auf 40 g/l Glucose bis zu einer OD₆₀₀ von 4 kultiviert. Anschließend wurde der Kultur 0,25 g/l Rifampicin, gelöst in Methanol, zugefügt, um die Transkription zu stoppen. Das Antibiotikum Rifampicin inhibiert die RNA-Polymerase durch Bindung an deren β -Untereinheit, so dass keine Transkription mehr stattfindet (Campbell et al. 2001). Die mRNA-Stabilität kann anschließend durch Bestimmung der mRNA-Spiegel zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe von Rifampicin in Hybridisierungsexperimenten mit DNA-Chips bestimmt werden.

Anhand eines Wachstumsexperimentes mit verschiedenen Rifampicinkonzentrationen zeigte sich, dass jede getestete Konzentration die Transkription inhibiert (Abb. 28), was zu einem Wachstumsstopp der betreffenden Kultur führte. Im Anschluss daran wurde die Konzentration von 0,25 mg/ml Rifampicin für die mRNA-Degradationsexperimente gewählt, da mit dieser Konzentration auch schon die mRNA-Abbauxperimente in *B. subtilis* durchgeführt worden sind (Hambraeus et al. 2003). Nach der Zugabe von 0,25 g/l Rifampicin wurden Aliquots zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 16 und 32 min entnommen. Im Anschluss daran erfolgte die RNA-Präparation, Fluoreszenzmarkierung der RNA durch reverse Transkriptase und Hybridisierung an gesamtgenomischen *C. glutamicum*-Chips.

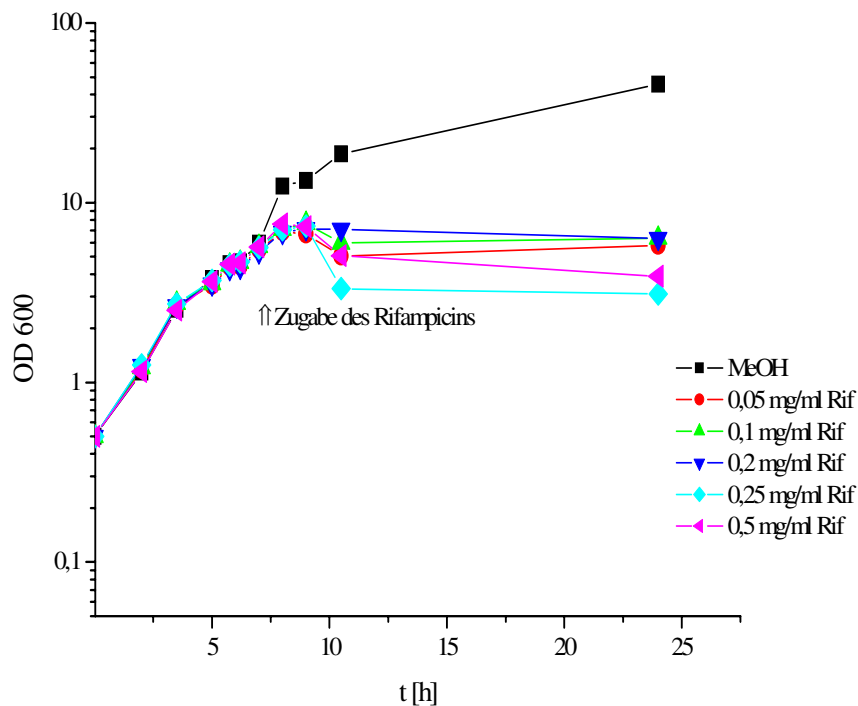


Abb. 28: Anzucht von *C. glutamicum* WT in CGXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glucose, ausreichender Phosphatkonzentration und verschiedenen Rifampicinkonzentrationen, um die geeignete Rifampicinkonzentration zu ermitteln, die die Transkription in *C. glutamicum* inhibiert. Die Zugabe des Rifampicins (Rif) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 4 nach 5 h und 45 min. Rifampicin ist in Methanol (MeOH) löslich. Aus diesem Grund wurde eine Kultur mit dem entsprechenden Lösungsvolumen Methanol kultiviert. Diese zeigte ein normales Wachstum. Anhand dieses Wachstumsexperimentes wurden 0,25 g/l Rifampicin für die mRNA-Abbauxperimente gewählt.

Zunächst wurde die durchschnittliche Halbwertszeit der Gesamt-mRNA aller Gene in *C. glutamicum* WT bestimmt. Dazu wurde die Anzahl der in den Hybridisierungsexperimenten nachweisbaren Transkripte gegen die Zeit nach Zugabe von 0,25 g/l Rifampicin aufgetragen. Die auf diese Weise bestimmte durchschnittliche mRNA-Halbwertszeit beträgt in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium 5 min (Abb. 29) und entspricht damit den durchschnittlichen Halbwertszeiten, die für *E. coli* (5,7 min) und *B. subtilis* (5 min) beim Wachstum auf Minimalmedium beschrieben wurden (Bernstein et al. 2002; Hambræus et al. 2003).

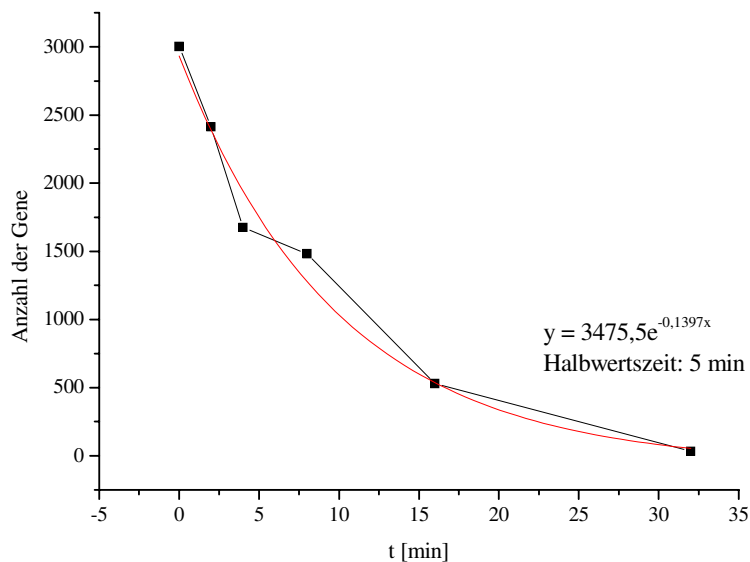


Abb. 29: Bestimmung der durchschnittlichen mRNA-Stabilität der Gene des *C. glutamicum* Genoms. Aufgetragen wurde die Anzahl in den Hybridisierungsexperimenten nachweisbaren Transkripte gegen die Zeit nach Zugabe von 0,25 g/l Rifampicin. Die mRNA aller Gene zeigt eine durchschnittlichen Halbwertszeit von 5 min.

In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Gene unterschiedlicher Funktionsgruppen unterschiedliche Halbwertszeiten aufwiesen, z.B. lange Halbwertszeiten für Gene von Transportproteinen ($> 6,3$ min) (Bernstein et al. 2002). Die mRNA der Gene für ribosomale Proteine zeigte in *C. glutamicum* mit $13 \pm 0,4$ min eine überdurchschnittliche lange Halbwertszeit (Abb. 30). Auch in *B. subtilis* konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA von Genen für ribosomale Proteine besonders stabil ist (Condon 2003).

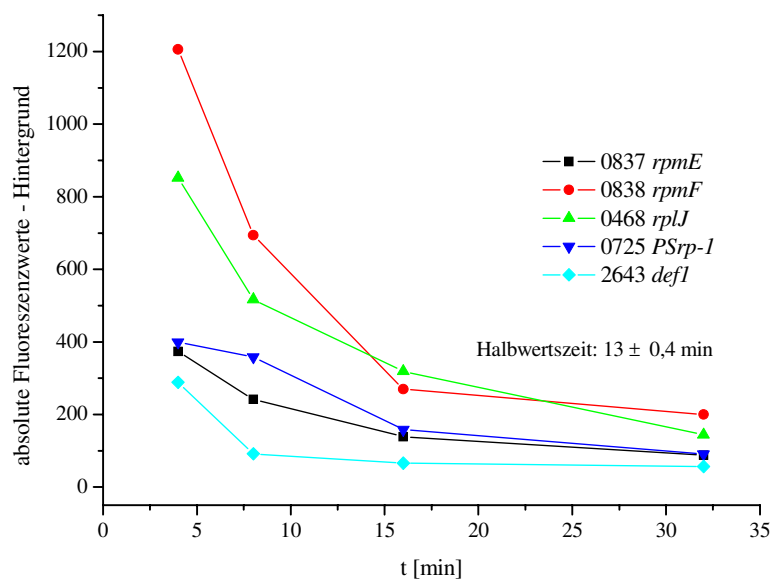


Abb. 30: Stabilität der mRNA ribosomaler Proteine. Die mRNA dieser Gene ist mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von $13 \pm 0,4$ min sehr stabil. In der Legende sind die NCgl-Nummern der entsprechenden Gene und die Gennamen angegeben.

Wie in *E. coli* (Bernstein et al. 2002) entsprach die mRNA-Halbwertszeit der Gene des Tricarbonsäure-Zyklus in *C. glutamicum* mit $6 \text{ min} \pm 1,4 \text{ min}$ der durchschnittlichen Halbwertszeit aller Gene (Abb. 31).

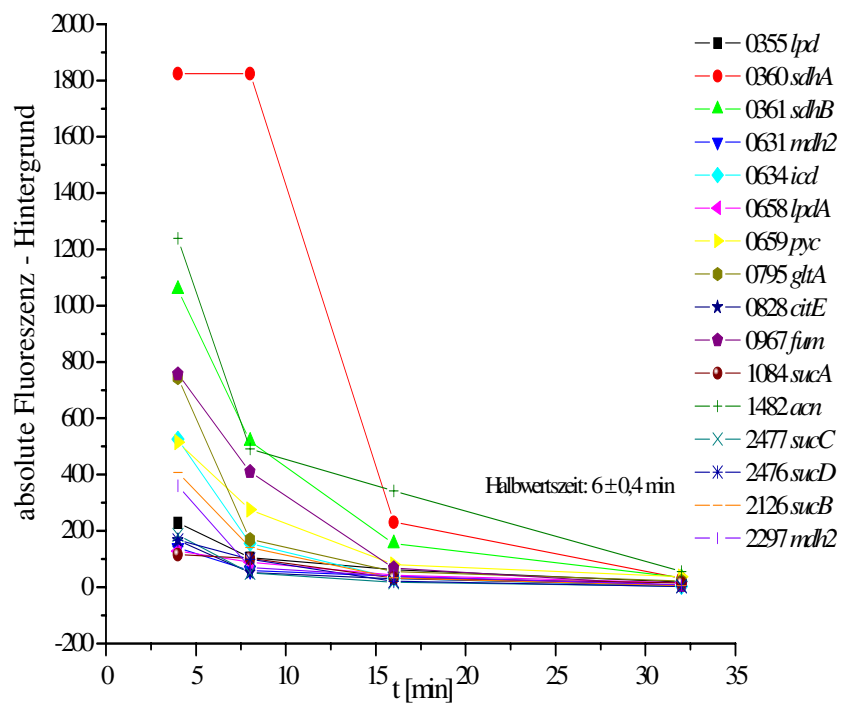


Abb. 31: Stabilität der mRNA der Enzyme des Tricarbonsäure-Zyklus. Die mRNA dieser Gene entspricht mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 6 min dem Durchschnitt aller Gene. In der Legende sind die NCgl-Nummern der entsprechenden Gene und die Gennamen angegeben.

Die mRNA der Gene des Phosphatmangelstimulons (Abb. 32) wies eine Halbwertszeit von $5,5 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ auf. Die mRNA-Halbwertszeiten für die einzelnen Gene des *pstSCAB*-Operons waren, wie für ein Operon erwartet, mit 6,2 min (*pstS*), 6,3 min (*pstC*), 5,4 min (*pstA*), und 6,1 min (*pstB*), sehr ähnlich. Es zeigten sich für das *pstSCAB*-Operon und die weiteren Gene des Phosphatmangelstimulons keine Abweichungen von der durchschnittlichen Halbwertszeit. Die mRNA-Stabilität der Gene des Phosphatmangelstimulons sollte allerdings bei Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen und besonders beim Transfer von Phosphatüberschuss in Phosphat-Mangelmedium erneut überprüft werden. Es besteht die Möglichkeit, dass bei Induktion der Phosphatmangelantwort nicht nur die Transkriptionskontrolle sondern auch der mRNA-Abbau verringert wird.

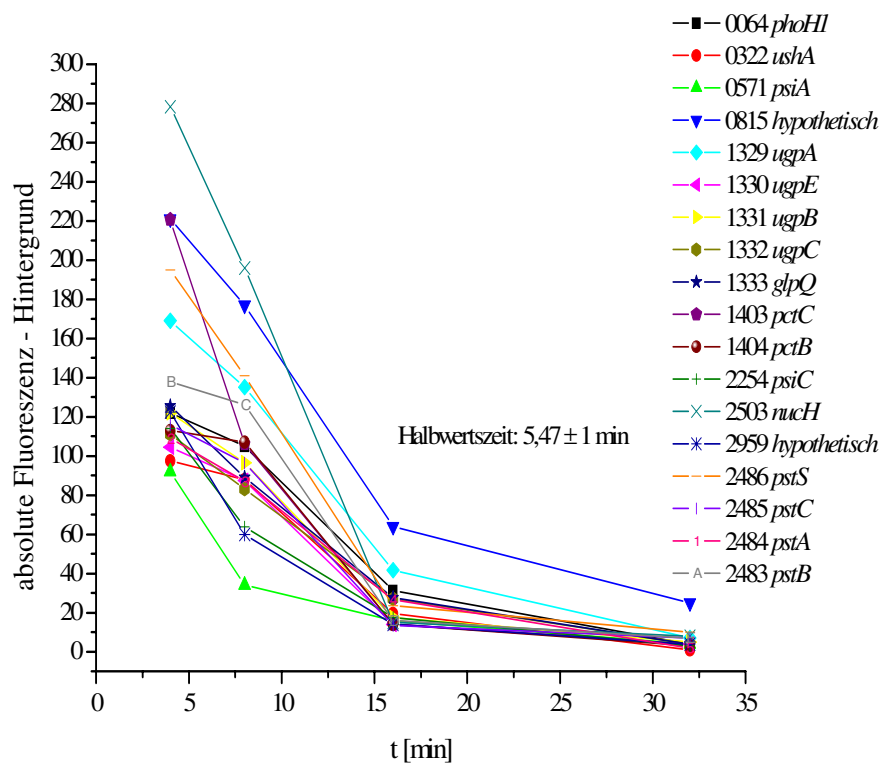


Abb. 32: Stabilität der mRNA des Pho-Regulons. Die mRNA dieser Gene zeigte eine Halbwertszeit von $5,47 \pm 1 \text{ min}$ und entspricht damit fast der durchschnittlichen Halbwertszeit aller Gene. In der Legende sind die NCgl-Nummern der entsprechenden Gene und die Gennamen angegeben.

5. Diskussion

5.1. Genomweite Analyse der mRNA-Stabilität in *C. glutamicum*

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Gene des Phosphatmangelstimulons einer Kontrolle durch mRNA-Abbau unterliegen. Dafür wurde zum ersten Mal die mRNA-Stabilität von mRNA in einem genomweiten Ansatz in *C. glutamicum* untersucht. Dabei konnte die durchschnittliche mRNA-Halbwertszeit in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium mit 5 min bestimmt werden. Diese Halbwertszeit wurde ebenfalls für den mRNA-Abbau in *E. coli* (5,2 min) und in *B. subtilis* (5 min) nachgewiesen (Bernstein et al. 2002; Hambræus et al. 2003).

Bei der mRNA der Gene des Phosphatmangelstimulons zeigten sich keine Abweichungen von der durchschnittlichen Halbwertszeit.

Bis jetzt liegen noch keine Daten über den mRNA-Abbau in *C. glutamicum* vor. Wichtig sind diese Ergebnisse deshalb, weil die Bestimmung von extrem stabilen mRNAs für die Konstruktion von stabilen rekombinanten Genen für die Überproduktion von Biomolekülen nützlich sein kann. Hinzu kommt auch, dass für die Zelle ein Großteil der Regulation auf Translationsebene stattfindet, über den bis jetzt relativ wenig bekannt ist (Kennell 2002; Kushner 2002; Condon 2003). Studien über den mRNA-Abbau in *E. coli* und *B. subtilis* zeigten, dass besonders stabile mRNAs, wie die des *ompA*-Gens in *B. subtilis* mit einer Halbwertszeit von 25 min und des *apr*-Gens in *E. coli* mit einer Halbwertszeit von 14 min, Sekundärstrukturen im 5'-Ende aufwiesen (Emory et al. 1992; Hambræus et al. 2002). Aber auch die Bildung von dreidimensionalen Strukturen durch die Bindung von Ribosomen, Proteinen, anderen Nukleinsäuren oder kleineren Liganden wie Metallionen oder organischen Molekülen (Wade 2002) kann ein Transkript entweder direkt vor Nukleaseaktivität schützen oder dessen Struktur beeinflussen, so dass es indirekt geschützt ist (Sandler and Weisblum 1989; DiMari and Bechhofer 1993; Hue et al. 1995; Agaisse and Lereclus 1996; Romeo 1998; Vytvytska et al. 1998). Es hat sich nicht bestätigt, dass die Stabilität einer mRNA anhand des Primärtranskripts vorhergesagt werden kann (Hambræus et al. 2003). Allerdings konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass die Stabilität bestimmter mRNAs mit ihrer Funktion korrelieren (Bernstein et al. 2002). Außerdem kann die mRNA-Stabilität durch bestimmte Antibiotika wie Puromycin, das den Ribosomen-mRNA-Komplex destabilisiert bzw. Chloramphenicol, das ihn stabilisiert, beeinflusst werden (Varmus et al. 1971; Fry et al. 1972).

Die mRNA-Halbwertszeiten können dazu benutzt werden, um vorherzusagen oder zu bestätigen, ob Gene, die in *C. glutamicum* in einem Cluster vorkommen, zusammen transkribiert werden. Außerdem könnte das 5'-Ende von stabilen mRNAs in *C. glutamicum*

wie z.B. der Alkoholdehydrogenase (Halbwertszeit: 19 min) oder die der ribosomalen Proteine dazu benutzt werden, um instabile Transkripte zu stabilisieren, wie das schon in *B. subtilis* für *aprE* und *gsiB* demonstriert wurde (Jurgen et al. 1998; Hambræus et al. 2000). Diese genetische Manipulation kann die Menge eines Translationsproduktes in der industriellen Anwendung erhöhen.

Da die mRNA-Halbwertszeit der Phosphatmangelgene nicht von der durchschnittlichen Halbwertszeit aller Gene abweicht, kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation der Phosphatmangelgene im Wesentlichen auf Ebene der Transkription und nicht durch Kontrolle des mRNA-Abbaus erfolgt. Allerdings sollte zukünftig die mRNA-Stabilität der Gene des Phosphatmangelstimulons auch bei Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen und besonders beim Transfer von Phosphatüberschuss in Phosphat-Mangelmedium bestimmt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass sich bei Induktion der Phosphatmangelantwort die mRNA-Stabilität verlängert.

5.2. Rolle des Zweikomponentensystems PhoRS bei der Regulation der Gene des Phosphorstoffwechsels

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es die PhoRS-unabhängige Regulation des *pstSCAB*-Operons zu charakterisieren. Außer PhoR wurden mit Hilfe der DNA-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF Massenspektrometrie die Regulatoren RamB, GlxR, CgtR4, NCgl1401 und NCgl2978 identifiziert (Tab. 6).

Tab. 6: Nachweis der Interaktion von sechs Transkriptionsregulatoren aus *C. glutamicum* mit dem *pstS*-Promotor durch DNA-Affinitätschromatographie. Es wurden Extrakte von *C. glutamicum*-Zellen, die entweder auf Glucose oder Acetat bei ausreichender oder limitierender Phosphatversorgung kultiviert wurden, eingesetzt.

Nachweis der Interaktion zwischen dem <i>pstS</i> -Promotor und Proteinen aus Extrakten von <i>C. glutamicum</i> nach Kultivierung auf			
	Glucose	Acetat	
Transkriptions- regulator	Phosphatüberschuss	Phosphatmangel	Phosphatmangel
PhoR	n.n.	+	+
RamB	+	n.n.	+
GlxR	n.n.	n.n.	+
CgtR4	+	n.n.	+
NCgl1401	+	n.n.	n.n.
NCgl2978	+	n.n.	n.n.

+ = identifiziert, n.n. = nicht nachweisbar

Das zeigt, dass die Regulation des *pstSCAB*-Operons durch Transkriptionsregulatoren ähnlich komplex ist wie z.B. in *B. subtilis* (Hulett 1996; Hulett 2002).

Das Zweikomponentensystem PhoRS von *C. glutamicum* ist, wie kürzlich gezeigt (Kocan et al. 2006), in die Aktivierung der durch Phosphatmangel induzierbaren Gene involviert. Alle Gene, die zum Phosphatmangelstimulon gehören (Ishige et al. 2003), waren in der Deletionsmutante Δ *phoRS* eine Stunde nach einem Wechsel von phosphatreichen in phosphatlimitiertes Glucose-Minimalmedium nicht mehr induzierbar, mit der Ausnahme des *pstSCAB*-Operons. Das *pstSCAB*-Operon wurde allerdings schwächer induziert als in *C. glutamicum* WT (Kocan et al. 2006). Die bisherigen Untersuchungen zu PhoRS waren auf die kurzfristige Antwort auf Phosphatmangel beschränkt. Die experimentellen Daten dieser Arbeit zeigen, dass das Zweikomponentensystem PhoRS weder essentiell für das Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen noch für das Wachstum auf den alternativen Phosphorquellen Adenosin-5'-Monophosphat, L- α -Glycerinphosphat und UDP-Glucose ist. PhoRS ist damit wie die meisten Zweikomponentensysteme nicht essentiell (Howell et al. 2006). Die verzögerte Induktion der Gene des Phosphatmangelstimulons in Abwesenheit von PhoRS zeigt jedoch, dass PhoRS wichtig für die schnelle Anpassung an Phosphatmangel ist.

In *E. coli* wird die Phosphatmangelantwort durch das Zweikomponentensystem PhoBR ausgelöst (Wanner 1996a). Eine Deletion des Antwortregulators PhoB führte dazu, dass die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase (*phoA*) nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Wanner 1996a). Es ist allerdings nicht bekannt, ob es zur Transkription der anderen Phosphatmangelgene kommt. Außerdem wurde in *E. coli* auch das Zweikomponentensystem PhoBR deletiert, was zu einer verringerten Nutzung der getesteten Organophosphate führte (Zhou et al. 2003). Da nichts über Wachstumsexperimente auf verschiedenen Phosphorquellen und Vorkultivierungen ohne Phosphorquelle bekannt ist, um die internen Phosphorspeicher zu verbrauchen, kann nichts darüber ausgesagt werden, ob es sich bei PhoBR oder PhoB aus *E. coli* um essentielle Gene handelt. Außerdem ist auch das PstSCAB-PhoU-System als negativer Regulator in der Regulation des Pho-Regulons involviert, da die meisten Mutationen im *pst*-Operon zu einer konstitutiven Synthese aller PHO-Gene führten (Wanner 1996a). Das Gen *phoU*, das ebenfalls im *pstSCAB*-Operon lokalisiert ist, ist nicht in den Phosphattransport involviert (Steed and Wanner 1993), sondern vermutlich in die physikalische Reizübertragung der limitierten Phosphatkonzentration (Wanner 1993).

In *B. subtilis* sind dagegen drei unabhängige Regulationssysteme PhoPR, ResDE und Spo0A für Genexpressionsveränderungen bei Phosphatmangel verantwortlich (Hulett 1996), wobei

der Antwortregulator PhoP essentiell für die Induktion der Gene des *resABCDC*-Operons ist. Ebenso hat der Antwortregulator ResD, der über den internen *resDE*-Promotor eine geringe konstitutive Expression zeigt, eine essentielle Funktion für die Transkription des *resABCDE*-Operons (Sun et al. 1996).

Mit Hilfe von bioinformatischen Analysen war es nicht möglich, ein konserviertes PhoR-Bindemotiv in *C. glutamicum* zu identifizieren (Kocan 2005). Allerdings konnte für den *pstS*-Promotor aus *C. glutamicum* sowohl durch Transkriptionsfusionsexperimente als auch durch DNA-Affinitätschromatographie die Binderegion eingegrenzt werden. Diese befindet sich in einem 35 bp langen Bereich, -217 bis -182 stromaufwärts vom Transkriptionsstart.

In *E. coli* ist eine als PHO-Box bezeichnete Promotorregion mit der Sequenz CTGTCAT bekannt. Unter Phosphatmangelbedingungen aktiviert PhoB~P als erstes die Transkription des *pstSCAB*-Operons durch Bindung an diese PHO-Box (Wanner 1996b). Die Kontrollregion des *pstSCAB-phoU*-Operons besteht aus der -10-Region und zwei Pho-Boxen stromaufwärts davon, an die der aktivierte Antwortregulator PhoB~P bindet, mit dem σ^{70} -Faktor der RNA-Polymerase interagiert und auf diese Weise die Transkription initiiert (Makino et al. 1989; Wanner 1993).

Unter Phosphatmangelbedingungen in *B. subtilis* wird ebenfalls als erstes die Transkription des *pstS*-Promotors durch den Antwortregulator PhoP~P durch Binden an das Bindemotiv Tn(A/T/C)ACA aktiviert, das sich in einem Bereich von -20 bp bis -60 bp bezogen auf den Transkriptionsstart befindet (Liu and Hulett 1998). Der *pstS*-Promotor enthält vier dieser Bindemotive als Tandemrepeats, die jeweils durch 5 Nukleotide voneinander getrennt sind. Außerdem weist der *pstS*-Promotor neben dieser Kernbinderegion noch eine zweite PhoP~P-Binderegion auf, die sich +75 bp stromabwärts vom Transkriptionsstart befindet (Liu et al. 1998). Der *pstS*-Promotor zeigt eine höhere Affinität zu PhoP~P als das *phoA*-Gen, das für eine alkalische Phosphatase kodiert, und erreicht schon bei einer dreifach niedrigeren Konzentration von PhoP~P eine halbmaximale Transkriptionsrate (Liu and Hulett 1997).

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass PhoR den *pstS*-Promotor bei Phosphatmangel nicht nur nach Kultivierung auf Glucose sondern auch auf Acetat bindet (Tab. 6). Vergleichbare Ergebnisse sind bei *E. coli* und *B. subtilis* nicht bekannt. Allerdings gibt es auch in *E. coli* und *B. subtilis* Hinweise darauf, dass die Regulation des Phosphor- und Kohlenstoffstoffwechsels miteinander verbunden sind (s. Kap. 5.4).

5.3. RamB

In dieser Arbeit konnte RamB als Regulator des *pstS*-Promotors identifiziert werden. Bisher war nicht bekannt, dass der Regulator des Acetatstoffwechsels RamB (Gerstmeir et al. 2004) die zum Phosphatmangelstimulon gehörenden Gene des *pstSCAB*-Operons reguliert (Abb. 33 und 34).

C. glutamicum ist in der Lage auf einer Vielzahl von Kohlenhydraten z.B. Glucose oder organischen Säuren z.B. Acetat als einziger oder kombinierter Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen (Kinoshita 1972; Liebl 1991). Es konnten drei Regulatoren des Acetatstoffwechsels identifiziert werden, RamA, RamB und GlxR (Gerstmeir et al. 2004; Kim et al. 2004; Cramer et al. 2006). Bei Kultivierung auf Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wird der Glyoxylatzyklus als anaplerotischer Stoffwechselweg induziert, um Oxalacetat zu liefern und Kohlenstoff für die Zellsynthese bereitzustellen, wobei die CO₂ produzierenden Schritte des Tricarbonsäurezyklus vermieden werden. Dabei werden in *C. glutamicum* die Acetat aktivierenden Enzyme Acetatkinase und Phosphotransacetylase (Reinscheid et al. 1999), die Acetat in Acetyl-Coenzym A konvertieren, sowie die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus Isocitratlyase und Malatsynthase induziert (Reinscheid et al. 1994b; Reinscheid et al. 1994a). Die Gene für die erwähnten Enzyme sind essentiell bei Wachstum auf Acetat als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle (Reinscheid et al. 1994b; Reinscheid et al. 1994a; Reinscheid et al. 1999; Gerstmeir et al. 2003) und werden durch den Repressor RamB in Abwesenheit von Acetat reprimiert (Wendisch et al. 1997; Reinscheid et al. 1999; Gerstmeir et al. 2004). Bei Wachstum auf Acetat wird die Expression der Gene für die Acetatkinase, Phosphotransacetylase und die Glyoxylatzyklusenzyme Isocitratlyase und Malatsynthase dereprimiert, da RamB unter diesen Bedingungen nicht mehr bindet. Stromaufwärts vor diesen Genen konnte ein hochkonserviertes 13 bp langes Bindemotiv AA/GAACTTTGCAAA identifiziert werden, das eine Dyadensymmetrie an einem Ende (unterstrichen) aufweist (Gerstmeir et al. 2004). Genomweite und vergleichende Expressionsanalysen mit *C. glutamicum*-Zellen, die entweder auf Glucose oder Acetat kultiviert wurden, zeigten eine Vielzahl anderer Gene des Zentralstoffwechsels, deren Expression offensichtlich durch die An- und Abwesenheit von Acetat als Kohlenstoffquelle reguliert wird (Gerstmeir et al. 2004). Zu dieser Gruppe von Genen, die das Acetatstimulon bilden, gehören z.B. Gene für Enzyme des Tricarbonsäurezyklus (Citratsynthase, Aconitase, Succinatdehydrogenase Untereinheit A, B und C/D und Fumarase) sowie für Enzyme, die in den Zuckerstoffwechsel (Glucose spezifisches Phosphotransferasesystem II, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Transaldolase, Transketolase, Pyruvatkinase und Pyruvatdehydro-

genase Komplex E1 Untereinheit) involviert sind. Bioinformatische Analysen, die zwei Basenaustausche im hochkonservierten Bindemotiv erlaubten, ergaben 28 weitere Regionen, die sich in Promotorregionen von Strukturgenen befanden (Gerstmeir et al. 2004). Zwei oder sogar drei Motive waren dabei vor Genen, die für die Pyruvatcarboxylase, PET-Carboxykinase, Citratsynthase, Untereinheit E1 des Pyruvatdehydrogenasekomplexes, Phosphotransacetylase und Acetatkinase kodieren, lokalisiert (Gerstmeir et al. 2004). Bei fünf Basenaustauschen im konservierten Bindemotiv ergaben sich fünf weitere Gene (Gerstmeir et al. 2004). Das zeigt, dass RamB wahrscheinlich zu den globalen Regulatoren gehört und damit nicht nur Gene des Acetatstoffwechsels sondern ein breites Spektrum weiterer Stoffwechselgene in *C. glutamicum* reguliert (Gerstmeir et al. 2004). Das *pstSCAB*-Operon war nicht unter den Genen, die durch bioinformatische Analysen dem RamB-Regulon zugeschrieben wurden (Gerstmeir et al. 2004). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass RamB mit dem *pstS*-Promotor in den Experimenten der DNA-Affinitätschromatographie sowohl auf Glucose-Medium unter ausreichender Phosphatkonzentration als auch auf Acetat-Medium unter Phosphatmangel interagiert. Bei einer anschließenden genaueren bioinformatischen Analyse der *pstS*-Promotorregion gelang es, zwei nicht vollständig konservierte RamB-Bindemotive zu identifizieren. Das Bindemotiv A weist 10 identische Basenpaare zum 13bp-Motiv auf, während das Bindemotiv B, das die reverse komplementäre Sequenz bildet, in 8 bp mit dem konservierten Bindemotiv übereinstimmt. In Gelretardierungstests mit 14 verschiedenen Teilfragmenten des *pstS*-Promotors konnte gezeigt werden, dass beide Motive für die Komplexbildung zwischen RamB und dem *pstS*-Promotor wichtig sind. Nur wenn beide Motive mutiert sind bzw. wenn beide Motive im Teilfragment des *pstS*-Promotors nicht vorhanden sind, findet keine Bindung zwischen RamB und dem *pstS*-Promotor statt.

Um die Rolle von RamB für die Transkriptionsregulation des *pstS*-Promotors *in vivo* zu bestimmen, wurden Transkriptionsfusionsanalysen durchgeführt, aus denen sich ableiten ließ, dass der Regulator RamB den *pstS*-Promotor bei einem Transfer von phosphathaltigem Glucose-Medium zu phosphatfreiem Glucose-Medium aktiviert. Andererseits reprimiert RamB die Transkription des *pstS*-Promotors bei einem Transfer von phosphathaltigem Acetat-Medium zu phosphatfreiem Acetat-Medium (Abb. 33 und 34). Auch bei Gerstmeir *et al.* wurde RamB sowohl aus Zellen von *C. glutamicum* isoliert, die auf Glucose als auch auf Acetat kultiviert wurden (Gerstmeir et al. 2004). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass RamB funktionell durch ein Effektormolekül kontrolliert wird, das für eine der Kultivierungsbedingungen spezifisch ist (Gerstmeir et al. 2004). Allerdings konnte dieses

Effektormolekül bisher noch nicht identifiziert werden (Gerstmeir et al. 2004). Es wurde vermutet, dass Acetyl-CoA dieses Effektormolekül ist, da die Acetyl-CoA-Konzentration bei Kultivierung auf Acetat im Gegensatz zur Kultivierung auf Glucose deutlich erhöht ist (Wendisch et al. 1997). Dies konnte allerdings durch Gerstmeir *et al.* nicht bestätigt werden (Gerstmeir et al. 2004).

In *E. coli* gibt es kein funktionelles Gegenstück zu RamB. Das *aceBAK*-Operon, das für die Isocitratlyase (*aceB*), Malatsynthase (*aceA*) und Isocitratdehydrogenase/Kinase/Phosphorylase (*aceK*) im Glyoxylatbypass kodiert, wird in *E. coli* durch IclR reprimiert (Pan et al. 1996) und durch den Transkriptionsregulator Cra und IHF (integration host factor) positiv kontrolliert (Resnik et al. 1996). Die Gene für die Acetatkinase und Phosphotransacetylase werden bei Wachstum auf Acetat anders als in *C. glutamicum* überhaupt nicht induziert. Das liegt daran, dass *ack-pta* für die Acetatbildung zuständig sind (Kakuda et al. 1994), während für die Aktivierung des Acetats hauptsächlich das Enzym Acetatsynthetase verantwortlich ist, das durch *acs* kodiert und durch IclR reguliert wird (Shin et al. 1997). Damit übernimmt IclR in *E. coli* sowohl die Funktion eines Repressors (*aceBAK*) als auch die eines Aktivators für die Gene der Acetatsynthetase (*acs*) und Acetatpermease (*actP* o. *yjcG*) (Gimenez et al. 2003). Bis jetzt gibt es keinen experimentiellen Hinweis darauf, dass IclR in *E. coli* in die Regulation des *pstS*-Promotors involviert ist.

5.4. GlxR

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regulation des *pstSCAB*-Operons auch von dem Transkriptionsregulator GlxR abhängig ist (Abb. 34). GlxR wurde als cAMP-abhängiger Repressor des *aceB*-Gens identifiziert (Kim et al. 2004). Anschließend wurde gezeigt, dass GlxR die Gene *gntP* und *gntK* des Gluconatstoffwechsels reprimiert (Letek et al. 2006). In dieser Arbeit wurde GlxR mit Hilfe der Affinitätschromatographie in *C. glutamicum*-Extrakten nach Kultivierung auf Acetat und unter Phosphatlimitierung als an den *pstS*-Promotor bindendes Protein identifiziert (Tab. 6 und Abb. 34). In Gelretardierungsexperimenten konnte diese Interaktion zwischen GlxR und dem *pstS*-Promotor in Anwesenheit von 0,2 mM cAMP bestätigt werden. Auch für die Gene *aceB* und *gntP* sowie *gntK* konnte in Gelretardierungsexperimenten gezeigt werden, dass GlxR für die Bindung cAMP benötigt (Kim et al. 2004; Letek et al. 2006). Letek *et al.* konnten außerdem nachweisen, dass eine cAMP-Konzentration von $\geq 0,05$ mM eingesetzt werden muss, um in den Gelretardierungsexperimenten eine Komplexbildung zwischen GlxR und den Zielgenen *gntP* und *gntK* zu dedektieren (Letek et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte

außerdem gezeigt werden, dass cAMP nicht durch cGMP ersetzt werden kann, wie das bei dem GlxR-Homolog in *M. tuberculosis* der Fall ist (Rickman et al. 2005). Desweiteren konnte in dieser Arbeit auch in Anwesenheit von 5'AMP in *C. glutamicum* keine Interaktion zwischen GlxR und dem Zielgen festgestellt werden. Außerdem konnte eine 255 bp lange Region identifiziert werden, die sich von – 129 bp bis + 126 bp bezogen auf den Transkriptionsstart erstreckt, in der wahrscheinlich mindestens ein GlxR-Bindemotiv liegt. Über ein Bindemotiv ist aus der Literatur noch nichts bekannt und auch bei der bioinformatischen Analyse der Zielgene von GlxR *pstS*, *aceB*, *gntP* und *gntK* in der vorliegenden Arbeit konnte kein Bindemotiv identifiziert werden. Aus der Lokalisation der 233 bp langen Binderegion lässt sich nicht ableiten, ob GlxR eine aktivierende oder reprimierende Funktion für den *pstS*-Promotor übernimmt. Allerdings ist bekannt, dass die Überexpression des *glxR*-Gens in *C. glutamicum* nach Kultivierung der Zellen auf Acetat zu einer 10- bis 15-fach niedrigeren spezifischen Aktivität der Isocitratlyase und der Malatsynthese führte, was für eine reprimierende Funktion von GlxR für diese Gene spricht (Kim et al. 2004). Jedoch gibt die Repression der beiden Gene wahrscheinlich nicht die physiologische Situation in *C. glutamicum* nach Kultivierung auf Acetat wider (Kim et al. 2004). Kim et al. erklärten dieses Ergebnis deshalb als Artefakt aufgrund der erhöhten GlxR-Konzentration bei Überexpression von *glxR* und vermuten eine reprimierende Funktion von cAMP-GlxR für die Gene der Isocitratlyase und der Malatsynthese in *C. glutamicum* (Kim et al. 2004). Da auch die intrazelluläre cAMP-Konzentration in *C. glutamicum* ca. vierfach höher bei Kultivierung auf Glucose als bei Kultivierung auf Acetat ist, wird vermutet, dass die Transkription von *aceB* durch cAMP-GlxR bei Wachstum auf Glucose reprimiert wird (Kim et al. 2004).

In *E. coli* gibt es ein zu *C. glutamicum* GlxR ähnliches cAMP-abhängiges Regulatorprotein. Crp (cAMP receptor protein) in *E. coli* ist ein globaler Regulator und wesentlich für die Katabolitrepression. CRP bindet an ein Sequenzmotiv mit einem Tandemrepeat TGTGA und TCACA, das durch sechs Nukleotide voneinander getrennt ist und aktiviert die Transkription einer Vielzahl von Genen des Zentralstoffwechsels z.B. das *lacZYA*-Operon (Gaston et al. 1990; Reznikoff 1992; Joung et al. 1993; Gosset et al. 2004). Crp benötigt für seine Funktion die Komplexbildung mit cAMP, agiert als transkriptioneller Aktivator und vermittelt den direkten Kontakt zwischen DNA und der RNA-Polymerase (Gaston et al. 1990; Reznikoff 1992). Auch in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die genetische Regulation des Phosphor- und Kohlenstoffwechsel über cAMP-CRP miteinander verknüpft ist (Kasahara et al. 1991; Kim et al. 2000). Das durch Phosphatmangel induzierbare Gen *psiE*, das für ein

anionspezifisches Porin kodiert, sowie das *ugp*-Operon, das für die Aufnahme von sn-Glycerin-3-Phosphat und Glycerinphosphoryldiester kodiert, werden durch den Antwortregulator des Zweikomponentensystems PhoB und cAMP-CRP je nach Verfügbarkeit der Kohlenstoff- und Phosphorquelle reguliert (Kasahara et al. 1991; Kim et al. 2000). Allerdings überlagert die cAMP-Crp-Bindestelle die Pho-Box für die Bindung von PhoB~P (Kim et al. 2000). Deshalb aktiviert PhoB vermutlich die Transkription von *psiE* unter Phosphatmangelbedingungen und ausreichender Glucoseversorgung, während cAMP-Crp die Transkription durch die Bindung an *psiE* reprimiert, wenn Glucose limitierend und Phosphat im Überschuss vorhanden ist. Wenn sowohl Glucose als auch Phosphat limitierend sind, dominiert PhoB über cAMP-Crp (Kim et al. 2000). Im *ugp*-Operon konnten zwei Promotoren identifiziert werden, von denen der eine durch Kohlenstoffmangel induziert und durch cAMP-Crp reguliert wird, während der andere durch Phosphatmangel induziert und durch PhoB reguliert wird.

In *B. subtilis* gibt es kein GlxR ähnliches, jedoch ein Katabolitkontrollprotein. Für CcpA (catabolite control protein A) in *B. subtilis* wurde festgestellt, dass es indirekt über das Zweikomponentensystem PhoRP die Expression der Gene der zwei alkalischen Phosphatasen *phoA* und *phoB* beeinflusst (Choi and Saier 2005). CcpA ist aber auch direkt in der Lage, die Transkription der Gene für das Zweikomponentensystem PhoPR bei Wachstum auf Glucose und unter Phosphatmangelbedingungen zu reprimieren (Puri-Taneja et al. 2006). Die auf diese Weise reduzierte Bildung von PhoPR reicht zur Induktion der Phosphatmangelantwort aus, allerdings in signifikant geringerem Ausmaße als wenn CcpA nicht mehr bindet. Letzteres ist der Fall, wenn *B. subtilis* sowohl unter Phosphat- als auch Kohlenstoffmangel kultiviert wurde, d.h. Kohlenstoffmangel verstärkt die Phosphatmangelantwort (Puri-Taneja et al. 2006).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht nachgewiesen, ob der *pstS*-Promotor von *E. coli* und *B. subtilis* unter der transkriptionellen Kontrolle von Crp bzw. CcpA steht.

5.5. Komplexität der Phosphatmangelantwort durch drei weitere Transkriptionsregulatoren CgtR4, NCgl1401 und NCgl2978

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CgtR4 den *pstS*-Promotor sowohl bei Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatversorgung als auch bei Kultivierung auf Acetat und Phosphatmangelbedingungen bindet (Abb. 33 und 34). CgtR4 ist der Antwortregulator aus dem Zweikomponentensystem CgtSR4. Mirja Wessel konnte in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass CgtR4 die Phosphatmangelgene *pstSCAB*, *ugpABCE* und *glpQ*

induziert. Allerdings konnte die Interaktion in Gelretardierungsexperimenten nicht bestätigt werden. Die Konstruktion einer $\Delta cgtSR4$ -Deletionsmutante war nur in Anwesenheit einer Plasmid kodierten Kopie der *cgtSR4*-Gene bzw. des *cgtR4*-Gens möglich (Wessel 2004). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Antwortregulator CgtR4 des Zweikomponentensystems essentiell ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch *C. glutamicum* $\Delta phoRS$ in der Lage ist, auf L- α -Glycerinphosphat als einziger Phosphorquelle zu wachsen, wofür es wahrscheinlich das Aufnahmesystem für Glycerin-3-Phosphat UgpABCE benötigt. Das könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass das *ugpABCE*-Operon außer durch PhoR auch durch CgtR4 reguliert wird. In Zukunft sollten die Gelretardierungsexperimente mit dem in dieser Arbeit konstruierten Vektor pET16b-*cgtR4* (s. Anhang, Abb. 46) wiederholt werden, da dieser Vektor CgtR4 mit abspaltbaren His-Tag enthält. Das könnte den Nachweis der Bindung zwischen CgtR4 und den wahrscheinlichen Zielgenen *pstSCAB*, *ugpABCE* und *glpQ* erleichtern. Außerdem könnte man durch unterschiedliche lange Fragmente die Binderegion von CgtR4 eingrenzen bzw. Footprintanalysen durchführen, um das Bindemotiv zu identifizieren. CgtR4 könnte in *C. glutamicum* eine Rolle als genereller Stressregulator einnehmen, analog der Funktion der Sigmafaktoren σ^S in *E. coli* (Loewen et al. 1998; Weber et al. 2005) oder σ^B und σ^M in *B. subtilis* (Hecker and Volker 1998; Price et al. 2001). RpoS (σ^S) reguliert in *E. coli* die Expression von Genen während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase, wenn sich *E. coli* an Mangelbedingungen anpasst (Weber et al. 2005). Diese Anpassung, die durch eine Reihe physiologischer und morphologischer Veränderungen gekennzeichnet ist, die vor allem durch RpoS kontrolliert werden, führt zur Bildung von kleinen und sphärischen *E. coli*-Zellen, die besser mit dem verlangsamten Stoffwechsel in der stationären Phase zurecht kommen (Loewen et al. 1998). Damit übernimmt RpoS eine analoge Rolle wie die der Sigmafaktoren σ^B und σ^M in *B. subtilis*, die in diesem Organismus die Sporenbildung bei Nährstoffmangel einleiten und auf diese Weise dafür sorgen, dass *B. subtilis* extreme Mangelbedingungen überlebt (Hecker and Volker 1998; Price et al. 2001). In *C. glutamicum* konnte bisher noch kein Regulationssystem identifiziert werden, dass die Aufgaben der generellen Stressantwort übernimmt. Die bisherigen Ergebnisse in dieser Arbeit und in der von M. Wessel zeigen jedoch, dass CgtSR4 ein guter Kandidat dafür wäre, da CgtR4 essentiell ist und unter Stressbedingungen wie Phosphatmangel oder bei oxidativen Stress exprimiert wird (Wessel 2004).

Auch die Transkriptionsregulatoren NCgl1401 und NCgl2978 konnten nach Wachstum auf Glucose unter Phosphatüberschuss als an den *pstS*-Promotor bindende Proteine identifiziert

werden (Abb. 33). Das Gen für den Transkriptionsregulator NCgl1401 gehört zur Familie der RpiR-Regulatoren, die in *E. coli* die Ribosephosphatisomerase negativ regulieren (Sorensen and Hove-Jensen 1996). *NCgl1401* liegt unmittelbar neben den Genen für einen ABC-Transporter, der für die Aufnahme einer unbekannten Phosphorkomponente kodiert und dessen Expression durch Phosphatmangel induziert wird (Ishige et al. 2003). Deshalb ist es möglich, dass NCgl1401 für die Regulation der Gene dieses Transporters notwendig ist. Zukünftig sollten aus diesem Grund sowohl die Komplexbildung zwischen dem Transkriptionsregulator NCgl1401 und dem *pstS*-Promotor als auch mit dem *pctDCBA*-Operon mit dem in dieser Arbeit konstruierten Vektor pET16b_*NCgl1401* (s. Anhang, Abb. 47) nachgewiesen werden.

Der Transkriptionsregulator NCgl2978 gehört zur Familie der AlgH-Regulatoren, die in *Pseudomonas aeruginosa* die Synthese der Succinyl-CoA-Synthetase sowie der Nukleosiddiphosphatase kontrollieren (Shankar et al. 1995; Cowley et al. 2005). Das Gen für NCgl2978 befindet sich innerhalb eines Operons neben den Genen *brnF-2* und *brnE-2* (Kennerknecht 2003), die eine hohe Sequenzidentität zu *brnF-1* und *brnE-1* aufweisen und für den Isoleucinexporter BrnFE kodieren (Kennerknecht et al. 2002). Die Funktion des paralogen Systems BrnFE-2 ist bisher noch ungeklärt, es wird jedoch vermutet, dass sie wahrscheinlich für den Transport von kleinen, hydrophoben Substraten notwendig sind (Kennerknecht 2003). Ob der Transkriptionsregulator NCgl2978 wichtig für die Phosphatverwertung ist und an den *pstS*-Promotor bindet, muss in der Zukunft durch Gelretardierungsexperimente geklärt werden.

5.6. Modell des Phosphatregulationsnetzwerkes in *C. glutamicum*

In *C. glutamicum* konnte anhand von Wachstumsexperimenten, Transkriptomanalysen, Transkriptionsfusionsanalysen und Enzymaktivitätsbestimmungen gezeigt werden, dass die Regulation der Phosphatmangelantwort in *C. glutamicum* einem komplexen Kontrollmechanismus unterliegt, der von der verwendeten Kohlenstoffquelle abhängt und in dem wahrscheinlich sechs unabhängige Transkriptionsregulationssysteme involviert sind. Deshalb wurde ein Modell erstellt, das die Regulation in Anwesenheit der Kohlenstoffquellen Glucose (Abb. 33) und Acetat (Abb. 34) darstellt. Dabei ist sowohl auf Glucose als auch auf Acetat das Zweikomponentensystem PhoRS für die frühe und schnelle Antwort nach Auslösen des Phosphatmangels zuständig (Abb. 33 und 34). Die Sensorkinase PhoS wird bei Phosphatmangel aktiviert und phosphoryliert den Antwortregulator PhoR, was zu dessen Aktivierung führt. Auf diese Weise ist PhoR~P in der Lage die Transkription der Gene des

PhoR-Regulons wie z.B. *pstSCAB*, *ugp*, *ushA* etc. zu induzieren (Abb. 33 und 34, (Kocan et al. 2006)).

Der Transkriptionsregulator RamB aktiviert die Transkription des *pstSCAB*-Operons bei Kultivierung auf Glucose und Phosphatüberschuss, während RamB dieses Operon bei Kultivierung auf Acetat unter Phosphatmangelbedingungen reprimiert (Abb. 33 und 34). Damit reguliert RamB den *pstS*-Promotor in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und der Phosphatverfügbarkeit. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Interaktion zwischen dem *pstS*-Promotor und RamB spricht für eine Verbindung zwischen Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel (Abb. 33 und 34). Außerdem reprimiert RamB auf Glucose die Gene *aceA*, *aceB* und *pta-ack* (Gerstmeir et al. 2004).

Der Antwortregulator des Zweikomponentensystems CgtR4 bindet an den *pstS*-Promotor sowohl bei Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatversorgung als auch bei Kultivierung auf Acetat und Phosphatmangelbedingungen (Abb. 33 und 34). Außerdem ist CgtR4 wahrscheinlich auch in die Regulation des *ugpAEBC*-Operon sowie des *glpQ*-Gens involviert (Wessel 2004). Da über dieses Regulationsnetzwerk in *C. glutamicum* noch zu wenig bekannt ist, kann nur vermutet werden, dass es in die generelle Stressantwort involviert sein könnte.

Weiterhin binden bei Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatversorgung die Transkriptionsregulatoren NCgl1401 und NCgl2978 an den *pstS*-Promotor (Abb. 33). NCgl1401 könnte außerdem in die Regulation des *pctABCD*-Operons involviert sein. Auch bei diesen beiden Transkriptionsregulatoren muss zukünftig geklärt werden, ob sie als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren agieren.

Der Transkriptionsregulator GlxR bindet cAMP-abhängig unter Phosphatlimitierung nur an den *pstS*-Promotor, wenn *C. glutamicum* auf Acetat kultiviert wurde (Abb. 34). Die Komplexbildung zwischen dem Kohlenstoffregulator GlxR und dem *pstS*-Promotor bestätigt die Verbindung zwischen Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel in *C. glutamicum*.

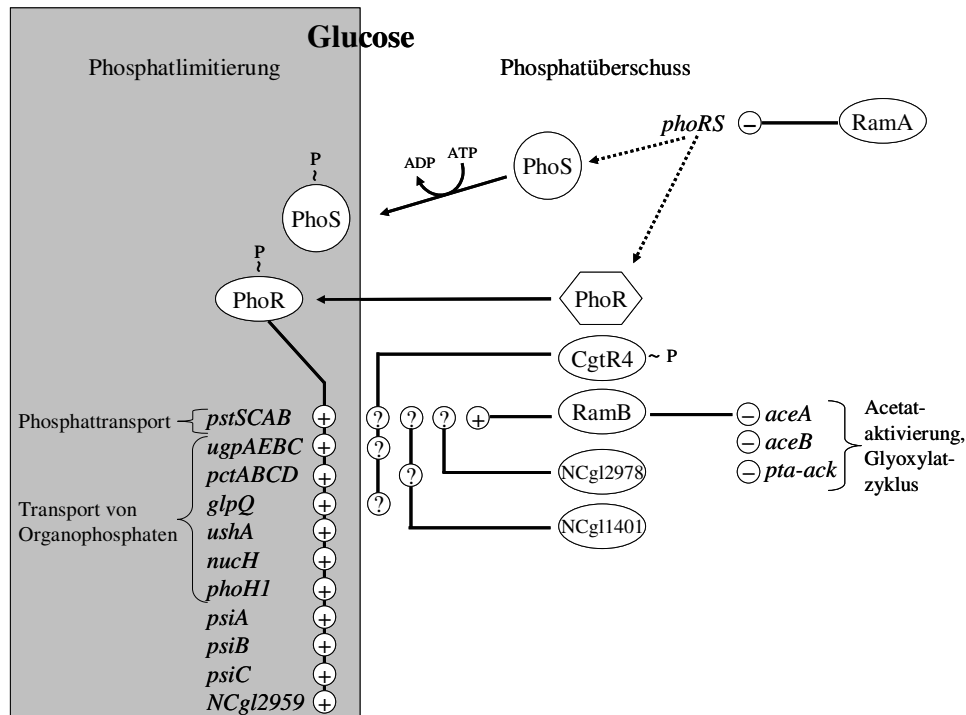


Abb. 33: Modell der Phosphatregulation in *C. glutamicum* bei Kultivierung auf Glucose.

RamA reprimiert (-) das *phoRS*-Operon bei Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatkonzentration. Unter Phosphatmangelbedingungen kommt es zur Autophosphorylierung der Sensorkinase PhoS des Zweikomponentensystem PhoRS. Anschließend phosphoryliert PhoS-P den Antwortregulator PhoR an einem konservierten Aspartatrest. Phosphoryliertes PhoR~P induziert (+) die Expression der Phosphatmangelgene. Der Transkriptionsregulator RamB (+) aktiviert bei Wachstum auf Glucose bei ausreichender Phosphatkonzentration die Transkription des *pstSCAB*-Operons. Außerdem reprimiert er die Glyoxylatbypassgene *aceA*, *aceB* und *pta-ack*. Der Antwortregulator CgtR4 des Zweikomponentensystem CgtSR4 reguliert bei Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatkonzentration ebenfalls das *pstSCAB*-Operon und wahrscheinlich auch das *ugpAEBC*-Operon sowie das *glpQ*-Gen. Es ist bisher unklar, ob CgtR4 eine aktivierende oder reprimierende Funktion übernimmt (?). Die Transkriptionsregulatoren NCgl1401 und NCgl2978 binden ebenfalls bei Kultivierung auf Glucose und ausreichender Phosphatkonzentration an den Promotor des *pstSCAB*-Operons. Außerdem könnte NCgl1401 auch den Promotor des *pctABCD*-Operons regulieren. Auch hier ist noch nicht geklärt, ob diese Transkriptionsregulatoren eine reprimierende oder aktivierende Funktion übernehmen (?).

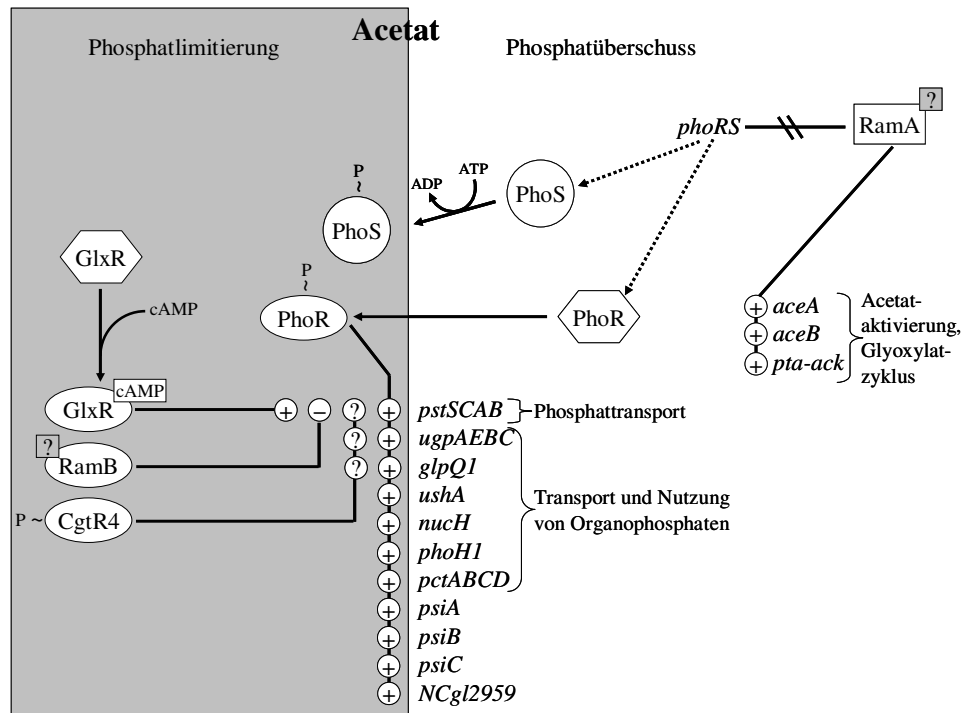


Abb. 34: Modell der Phosphatregulation in *C. glutamicum* bei Kultivierung auf Acetat.

Die Transkription der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS wird bei Phosphatmangel und Kultivierung auf Acetat induziert, da unter diesen Bedingungen die Repression durch RamA aufgehoben wird. RamA benötigt für seine Funktion wahrscheinlich einen Effektor. Unter Phosphatmangelbedingungen kommt es auch bei Kultivierung auf Acetat zur Autophosphorylierung der Sensorkinase PhoS des Zweikomponentensystems PhoRS an einem konservierten Histidinrest. Anschließend phosphoryliert PhoS-P den Antwortregulator PhoR an einem konservierten Aspartatrest. Phosphoryliertes PhoR-P induziert (+) die Expression der Phosphatmangelgene. Der Transkriptionsregulator GlxR aktiviert (+) wahrscheinlich bei Kultivierung auf Acetat unter Phosphatmangelbedingungen die Transkription des *pstSCAB*-Operons, wobei es für seine Funktion cAMP benötigt. Der Transkriptionsregulator RamB reprimiert (-) auf Acetat auch bei Phosphatmangel das *pstSCAB*-Operon, wofür er wahrscheinlich einen Effektor benötigt. Der Antwortregulator CgtR4 reguliert bei Kultivierung auf Acetat und unter Phosphatmangelbedingungen ebenfalls das *pstSCAB*-Operon und wahrscheinlich auch das *ugpAEBC*-Operon sowie das *glpQ*-Gen. Es ist bisher unklar, ob CgtR4 eine aktivierende oder reprimierende Funktion übernimmt (?).

Phosphatmangelgene induziert (Abb. 35). Das Zweikomponentensystem PhoPR wird allerdings auch durch Phosphatmangel aktiviert, reguliert die Expression seiner eigenen Gene (Paul et al. 2004) und kann die Expression des *resABCDE* Operons hemmen (Hulett 2002). Außerdem wird das *phoPR*-Operon noch über den Transkriptionsregulator AbrB positiv reguliert (Birkey et al. 1998). Bei AbrB handelt es sich um einen Übergangsregulator zwischen lag-Phase und Sporulation (Birkey et al. 1998). Wie bei Glucosemangel oder anderen Stresssituationen, die zeitlich zu lange andauern, wird auch bei Phosphatmangel in *B. subtilis*, vermittelt durch den Antwortregulator Spo0A die Sporulation eingeleitet (Birkey et al. 1998). Dabei reprimiert Spo0A die Transkription von *abrB* und *resABCDE* und damit indirekt auch die des *phoPR*-Operon (Abb. 35). Neben den hier genannten Regulationssystemen löst die Phosphatmangelantwort bei *B. subtilis* außerdem die Induktion von Genen der generellen Stressantwort unter Vermittlung durch die Sigmafaktoren der RNA-Polymerase σ^B , σ^M und σ^H aus (Hecker and Volker 1998; Price et al. 2001; Pragai and Harwood 2002; Minnig et al. 2005).

Eine weitere Stufe der Komplexität ergibt sich in *B. subtilis* durch eine Kreuzregulation zwischen zwei unabhängigen Zweikomponentensystemen. Eine Kreuzregulation konnte in *B. subtilis* zwischen den beiden Zweikomponentensystemen PhoPR und YycFG festgestellt werden (Howell et al. 2006). PhoR, die Sensorkinase des bei Phosphatmangel induzierten Zweikomponentensystems PhoPR ist in der Lage, den Antwortregulator des essentiellen Zweikomponentensystems YycF zu phosphorylieren und möglicherweise auch zu dephosphorylieren (Howell et al. 2006). Diese Form der Interaktion ist allerdings nur möglich bei Zweikomponentensystemen, die phylogenetisch nah miteinander verwandt sind (Howell et al. 2006), was auch für die Zweikomponentensysteme PhoRS und CgtSR4 aus *C. glutamicum* zutrifft (Kocan et al. 2006). Es ist daher nicht auszuschließen, dass in *C. glutamicum* eine Kreuzregulation zwischen PhoRS und CgtSR4 eine Rolle bei der Regulation der Phosphorstoffwechselgene spielt.

Die Transkription von PhoRS ist beim Wechsel von phosphatreichem zu phosphatlimitiertem Glucose-Minimalmedium transient erhöht (Ishige et al. 2003) und wird autoreguliert (Kocan et al. 2006). Außerdem konnte bei der bioinformatischen Untersuchung der Promotorsequenz von PhoS in dieser Arbeit auch ein Bindemotiv für RamA nachgewiesen werden. RamA ist ein Transkriptionsregulator, der zum LuxR-Typ gehört, und essentiell für das Wachstum auf Acetat ist (Cramer et al. 2006). RamA bindet ein hochkonserviertes Bindemotiv mit der Sequenz (A/C/TG₄₋₆T/C). In den Promotorbereichen seiner Zielgene, die für Acetatkinase, Phosphotransacetylase, Isocitratlyase und Malatsynthase kodieren, kommt das Bindemotiv als

Tandemrepeat zweimal vor und ist durch vier bis fünf Nukleotide voneinander getrennt. RamA aktiviert die Expression seiner Zielgene in Anwesenheit von Acetat (Cramer et al. 2006). Cramer *et al.* haben jeweils in eines der Bindemotive des Tandemrepeats in allen vier Zielgenen Basenaustausche eingeführt und konnten weiterhin eine partielle Bindung feststellen (Cramer et al. 2006). Ihre Ergebnisse zeigten, dass RamA die Bindung an Motive mit der Sequenzwiederholung von 4-6 Gs und/oder 4-6 Cs bevorzugt. Diese Motive befinden sich nicht nur in den vier schon erwähnten Genen *aceA*, *aceB*, *ack* und *pta*, sondern auch in den Promotorregionen der Gene für Succinatdehydrogenase, Aconitase sowie Phosphoenolpyruvatcarboxykinase. Im *phoRS*-Promotor ist das RamA-Bindemotiv als Tandemrepeat mit der Sequenz TGGTGGGT und TGGGGCGT vorhanden, die durch 7 Nukleotide voneinander getrennt sind. Da die identifizierte Sequenz geringfügig vom hochkonservierten RamA-Bindemotiv abweicht, muss die Interaktion zukünftig durch Gelretardierungsexperimente zwischen PhoS und aufgereinigtem RamA *in vitro* und durch die Konstruktion einer *C. glutamicum* $\Delta ramA$:*phoRS*-Doppelmutante *in vivo* bestätigt werden. Außerdem befindet sich ein einzelnes RamA-Bindemotiv mit der Sequenz ACCCCA vor dem Translationsstart, das ebenfalls für die Interaktion mit RamA ausreichen könnte (Ermer, Cramer & Eikmanns, unveröffentlicht). Ob RamA an diese Sequenz bindet, muss ebenfalls zukünftig durch Gelretardierungsexperimente überprüft werden. Mittlerweile ist bekannt, dass RamA nicht nur Gene des Acetatstoffwechsels und des zentralen Kohlenstoffwechsels reguliert, sondern auch das *cspB*-Gen, das für das Oberflächenprotein 2 kodiert (Hansmeier et al. 2006).

Ein weiterer Hinweis auf die Regulation des *phoRS*-Operons durch RamA findet sich in den vergleichenden Transkriptomanalysen zwischen *C. glutamicum* WT und der $\Delta ramA$ -Mutante (Cramer, Eikmanns & Wendisch, unveröffentlicht). Auf Glucose wurde *phoR* in *C. glutamicum* $\Delta ramA$ 3,8-fach höher exprimiert als in *C. glutamicum* WT, während *phoS* in *C. glutamicum* $\Delta ramA$ 2,3-fach höher exprimiert wurde als in *C. glutamicum* WT. Dieser Effekt zeigte sich nicht auf TY-Komplexmedium oder auf Glucose/Acetat-Mischsubstrat. Daraus lässt sich ableiten, dass das *phoRS*-Operon bei Kultivierung auf Glucose unter Kontrolle von RamA steht. Damit sind die drei Regulatoren des Acetatstoffwechsels GlxR, RamA und RamB an der Kontrolle des Phosphatstoffwechsels beteiligt.

5.7. Verbindung zwischen der Regulation des Kohlenstoff- und des Phosphorstoffwechsels

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen der Regulation von Kohlenstoff- und Phosphorstoffwechsel in *C. glutamicum* besteht. Dafür spricht 1) die Regulation des *pstSCAB*-Operons durch die Regulatoren des Acetatstoffwechsels GlxR und RamB und 2) die Regulation der Gene des für die Kontrolle des Phosphorstoffwechsels wichtigen Zweikomponentensystems PhoRS durch den Regulator des Acetatstoffwechsels RamA und 3) die unterschiedliche Expression der Gene des Phosphatmangelstimulons während eines Transfers von Phosphatüberschuss- zu Phosphatmangelbedingungen in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle Glucose oder Acetat.

Durch die vergleichenden Transkriptomanalysen zwischen *C. glutamicum* WT auf Glucose und Acetat unter Phosphatmangelbedingungen konnte festgestellt werden, dass die Gene des Phosphatmangelstimulons auf Glucose nach 90 min Phosphatmangel mindestens 2-fach stärker induziert waren als auf Acetat-Medium. Die mRNA-Spiegel der Gene des Zweikomponentensystems PhoRS sind jedoch nach 90 min Phosphatmangel auf Acetat-Medium höher als auf Glucose-Medium.

Ein weiterer wichtiger Unterschied bezüglich der Regulation des *pstSCAB*-Operons bei Kultivierung auf Glucose oder Acetat als Kohlenstoffquelle ist der Befund, dass RamB den *pstS*-Promotor unter Phosphatmangelbedingungen auf Glucose aktiviert, während RamB den *pstS*-Promotor bei Kultivierung auf Acetat unter Phosphatmangelbedingungen reprimiert.

Aus diesen unabhängigen experimentellen Befunden lässt sich schlussfolgern, dass die Phosphatverfügbarkeit in *C. glutamicum*-Zellen während des Transfers von phosphathaltigem zu phosphatfreien Medium höher ist, wenn Acetat die Kohlenstoffquelle ist als wenn Glucose als Kohlenstoffquelle dient. Hierbei ist hervorzuheben, dass die experimentiellen Befunde unter transienten Bedingungen erhalten wurden, d.h. innerhalb von 2 Stunden während des Transfers von phosphatreichen zu phosphatlimitierten Bedingungen. Dies ist besonders deshalb wichtig, da PhoR nicht essentiell für die Phosphatregulation ist, aber wesentlich unter transienten Bedingungen, also wichtig für die schnelle Anpassung an Phosphatmangelbedingungen.

Eine mögliche Erklärung für die höhere Phosphatverfügbarkeit während eines Transfers von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel auf Acetat-Minimalmedium könnte in der Freisetzung von anorganischem Phosphat durch die Phosphotransacetylase-reaktion in der Acetataktivierung begründet sein (Abb. 36). Acetat wird unter Verbrauch von ATP durch die Acetataktinase zu Acetylphosphat phosphoryliert (Reinscheid et al. 1999). In der Reaktion der Phosphotransacetylase wird der Acetyl-Rest des Acetylphosphats auf Coenzym A übertragen und anorganisches Phosphat wird frei. Dagegen verringert sich die Phosphatverfügbarkeit während eines Transfers von Phosphatüberschuss zu Phosphatmangel auf Glucose-Minimalmedium, da bei der Umsetzung von Glucose zu Acetyl-CoA in der Glykolyse und der oxidativen Decarboxylierung anorganisches Phosphat zu ATP assimiliert wird. (Abb. 36). Bei Wachstum unter Gleichgewichtsbedingungen stellt sich ein quasi-stationärer Zustand des Stoffwechsels ein, und es ist davon auszugehen, dass die Phosphatverfügbarkeit nicht wesentlich von der Kohlenstoffquelle beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind transient und unter diesen Bedingungen könnte der Gewinn von zwei Phosphatmolekülen einen Zeitvorteil darstellen. Während gezeigt werden konnte, dass PhoR nicht essentiell ist, aber für eine schnelle Anpassung an Phosphatmangel wesentlich ist, muss zukünftig noch geklärt werden, ob RamB und/oder GlxR wesentlich für eine schnelle Anpassung an Phosphatmangel in Abwesenheit von Acetat sind.

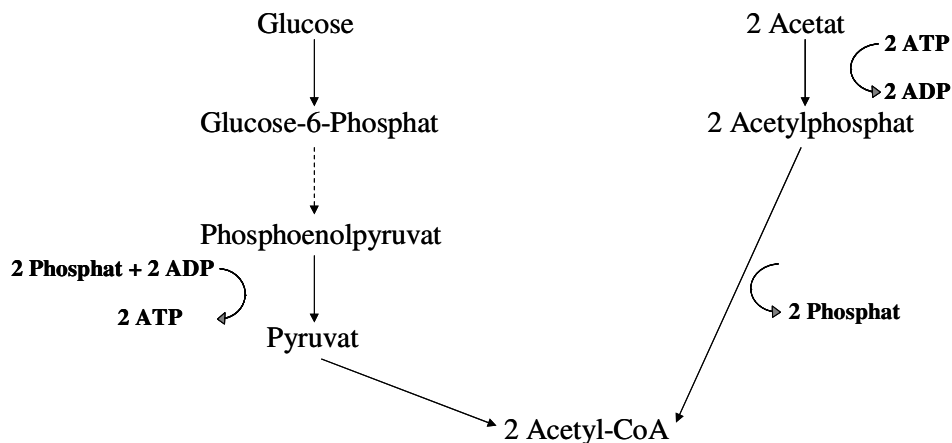


Abb. 36: Umsetzung von Phosphat in der Glycolyse, der oxidativen Decarboxylierung und der Acetataktivierung bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucose bzw. Acetat.

Eine weitere Besonderheit der Verstoffwechselung von Acetat bei Kultivierung auf Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle ist die hohe intrazelluläre Acetylphosphatkonzentration von 196 μM , die im Vergleich zum Wachstum auf Glucose <

15 μM ist (Wendisch et al. 1997). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Acetylphosphat eine Reihe von Regulationsvorgängen beeinflusst. Acetylphosphat wird bei *E. coli* als Effektor beschrieben, der z.B. die Dimerisierung des Antwortregulators DcuR begünstigt und damit zu einer höheren DNA-Bindeaffinität verhilft (Abo-Amer et al. 2004). Das Zweikomponentensystem DcuSR reguliert die Gene des Kohlenstoffstoffwechsels, die für die Aufnahme und Verstoffwechselung der Dicarbonsäuren Succinat, Fumarat, Malat und Aspartat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle notwendig sind (Abo-Amer et al. 2004). Die Konzentration von Acetylphosphat variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle (McCleary et al. 1993). Am höchsten ist sie, wenn *E. coli* auf Pyruvat kultiviert wird (McCleary et al. 1993). Die Bindung eines Effektors wie z.B. Acetylphosphat wird auch für die Kohlenstoffregulatoren RamA und RamB vermutet (Gerstmeir et al. 2004; Cramer et al. 2006). Möglich ist aber auch, dass Acetyl-Phosphat direkt, wie bei *E. coli* beschrieben, den Basislevel von aktiviertem PhoR erhöht, da es in der Lage ist, den Antwortregulator zu phosphorylieren (Wanner and Wilmes-Riesenberg 1992; McCleary et al. 1993).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Acetyl-Coenzym A, dessen Konzentration bei Wachstum auf Acetat mit 145 μM gegenüber auf Glucose < 24 μM stark erhöht ist (Wendisch et al. 1997), eine regulierende Funktion zwischen Acetat- und Phosphorstoffwechsel einnimmt. Cramer *et al.* haben in Gelretardierungsexperimenten festgestellt, dass sie eine höhere Konzentration von RamA in Anwesenheit von Acetyl-CoA benötigen (Cramer et al. 2006).

Der Einfluss der Transkriptionsregulatoren RamB und GlxR auf die Expression des *pstSCAB*-Operons und anderer Phosphatmangelgene sollte in Zukunft durch vergleichende Transkriptomanalysen zwischen *C. glutamicum* WT und einer $\Delta ramB$ und/oder einer $\Delta glxR$ -Mutante bei Kultivierung unter Phosphatmangelbedingungen charakterisiert werden. Wenn sich bestätigt, dass es sich bei *glxR* um ein essentielles Gen handelt, besteht auch die Möglichkeit, die Regulation von GlxR unter Phosphatmangelbedingungen durch Transkriptomanalysen mit dem in dieser Arbeit konstruierten Vektor pVWEx1*glxR* (s. Anhang, Abb. 48) zu bestimmen. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die Phosphatmangelantwort in Verbindung mit dem Kohlenstoffwechsel über die Regulationssysteme PhoRS, CgtSR4, RamB, GlxR, NCgl1401 sowie NCgl2978 in seiner Komplexität zu verstehen.

6. Literatur

- Abe S, Takayarna K, Kinoshita S (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 13:279-301
- Abo-Amer AE et al. (2004) DNA interaction and phosphotransfer of the C4-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:1879-1889
- Adhya S, Garges S (1990) Positive control. *J Biol Chem* 265:10797-10800
- Agaisse H, Lereclus D (1996) STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol Microbiol* 20:633-643
- Alifano P, Bruni CB, Carlomagno MS (1994) Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. *Genetica* 94:157-172
- Altschul SF et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402
- Antelmann H, Scharf C, Hecker M (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol* 182:4478-4490
- Barnes WM (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2216-2220
- Belasco JG, Higgins CF (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* 72:15-23
- Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, Lin-Chao S, Cohen SN (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9697-9702
- Birkey SM, Liu W, Zhang X, Duggan MF, Hulett FM (1998) Pho signal transduction network reveals direct transcriptional regulation of one two-component system by another two-component regulator: *Bacillus subtilis* PhoP directly regulates production of ResD. *Mol Microbiol* 30:943-953
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Botsford JL, Harman JG (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* 56:100-122
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Campbell EA et al. (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 104:901-912

- Choi SK, Saier MH, Jr. (2005) Regulation of pho regulon gene expression by the carbon control protein A, CcpA, in *Bacillus subtilis*. J Mol Microbiol Biotechnol 10:40-50
- Condon C (2003) RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. Microbiol Mol Biol Rev 67:157-174, table of contents
- Cowley AB, Urbauer RJ, Urbauer JL (2005) ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR assignments for AlgH, a putative transcriptional regulator from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biomol NMR 33:74
- Cramer A, Gerstmeir R, Schaffer S, Bott M, Eikmanns BJ (2006) Identification of RamA, a novel LuxR-type transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 188:2554-2567
- de-Bashan LE, Bashan Y (2004) Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). Water Res 38:4222-4246
- Dekleva ML, Titus JA, Strohl WR (1985) Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. Can J Microbiol 31:287-294
- Derouaux A et al. (2004) Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind cAMP. Biochem Biophys Res Commun 325:983-990
- DiMari JF, Bechhofer DH (1993) Initiation of mRNA decay in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 7:705-717
- Doull JL, Vining LC (1990) Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. Appl Microbiol Biotechnol 32:449-454
- Edwards CJ, Innes DJ, Burns DM, Beacham IR (1993) UDP-sugar hydrolase isozymes in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*: silent alleles of *ushA* in related strains of group I *Salmonella* isolates, and of *ushB* in wild-type and K12 strains of *E. coli*, indicate recent and early silencing events, respectively. FEMS Microbiol Lett 114:293-298
- Eikmanns BJ, Thum-Schmitz N, Eggeling L, Ludtke KU, Sahm H (1994) Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gltA* gene encoding citrate synthase. Microbiology 140 (Pt 8):1817-1828
- Emory SA, Bouvet P, Belasco JG (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. Genes Dev 6:135-148
- Engels S, Schweitzer JE, Ludwig C, Bott M, Schaffer S (2004) *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. Mol Microbiol 52:285-302

- Epstein W, Rothman-Denes LB, Hesse J (1975) Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2300-2304
- Fling SP, Gregerson DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155:83-88
- Fountoulakis M, Langen H (1997) Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* 250:153-156
- Fry M, Israeli-Reches M, Artman M (1972) Stabilization and breakdown of *Escherichia coli* messenger ribonucleic acid in the presence of chloramphenicol. *Biochemistry* 11:3054-3059
- Gabrielsen OS, Hornes E, Korsnes L, Ruet A, Oyen TB (1989) Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor tau--a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Res* 17:6253-6267
- Gasteiger EH, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, pp pp. 571-607
- Gaston K, Bell A, Kolb A, Buc H, Busby S (1990) Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP. *Cell* 62:733-743
- Gerstmeir R, Cramer A, Dangel P, Schaffer S, Eikmanns BJ (2004) RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 186:2798-2809
- Gerstmeir R et al. (2003) Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* 104:99-122
- Gimenez R, Nunez MF, Badia J, Aguilar J, Baldoma L (2003) The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:6448-6455
- Gosset G, Zhang Z, Nayyar S, Cuevas WA, Saier MH, Jr. (2004) Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:3516-3524
- Hambraeus G, Karhumaa K, Rutberg B (2002) A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis* aprE leader mRNA. *Microbiology* 148:1795-1803
- Hambraeus G, Persson M, Rutberg B (2000) The aprE leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146 Pt 12:3051-3059

- Hambraeus G, von Wachenfeldt C, Hederstedt L (2003) Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol Genet Genomics* 269:706-714
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA-cloning*:109-135
- Hansmeier N et al. (2006) The surface (S)-layer gene *cspB* of *Corynebacterium glutamicum* is transcriptionally activated by a LuxR-type regulator and located on a 6 kb genomic island absent from the type strain ATCC 13032. *Microbiology* 152:923-935
- Harris RM, Webb DC, Howitt SM, Cox GB (2001) Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:5008-5014
- Hecker M, Volker U (1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* 29:1129-1136
- Henkin TM, Yanofsky C (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* 24:700-707
- Hermann T (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* 104:155-172
- Hobbs G et al. (1992) An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 174:1487-1494
- Hoffer SM, Schoondermark P, van Veen HW, Tommassen J (2001) Activation by gene amplification of pitB, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 183:4659-4663
- Horinouchi S, Beppu T (1992) Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 46:377-398
- Howell A, Dubrac S, Noone D, Varughese KI, Devine K (2006) Interactions between the YycFG and PhoPR two-component systems in *Bacillus subtilis*: the PhoR kinase phosphorylates the non-cognate YycF response regulator upon phosphate limitation. *Mol Microbiol* 59:1199-1215
- Hue KK, Cohen SD, Bechhofer DH (1995) A polypurine sequence that acts as a 5' mRNA stabilizer in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177:3465-3471
- Hueck CJ, Hillen W (1995) Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* 15:395-401
- Hulett FM (1996) The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:933-939
- Hulett FM (2002) The pho regulon. In: (ed.) JASaRML (ed) *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, D.C., pp 193-201

- Hulett FM, Kim EE, Bookstein C, Kapp NV, Edwards CW, Wyckoff HW (1991) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatases III and IV. Cloning, sequencing, and comparisons of deduced amino acid sequence with *Escherichia coli* alkaline phosphatase three-dimensional structure. J Biol Chem 266:1077-1084
- Hulett FM et al. (1994) Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 176:1348-1358
- Ibba M, Soll D (1999) Quality control mechanisms during translation. Science 286:1893-1897
- Ikeda M, Nakagawa S (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol 62:99-109
- Ishige T, Krause M, Bott M, Wendisch VF, Sahm H (2003) The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. J Bacteriol 185:4519-4529
- Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HG (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A 88:8972-8976
- Joung JK, Le LU, Hochschild A (1993) Synergistic activation of transcription by *Escherichia coli* cAMP receptor protein. Proc Natl Acad Sci U S A 90:3083-3087
- Jurgen B, Schweder T, Hecker M (1998) The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. Mol Gen Genet 258:538-545
- Kaiser D, Losick R (1993) How and why bacteria talk to each other. Cell 73:873-885
- Kakuda H, Hosono K, Shiroishi K, Ichihara S (1994) Identification and characterization of the *ackA* (acetate kinase A)-*pta* (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an *ackA-pta* deletion mutant of *Escherichia coli*. J Biochem (Tokyo) 116:916-922
- Kalinowski J et al. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. J Biotechnol 104:5-25
- Kasahara M, Makino K, Amemura M, Nakata A, Shinagawa H (1991) Dual regulation of the *ugp* operon by phosphate and carbon starvation at two interspaced promoters. J Bacteriol 173:549-558
- Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. J Bacteriol 175:5595-5603
- Kennell D (2002) Processing endoribonucleases and mRNA degradation in bacteria. J Bacteriol 184:4645-4657; discussion 4665

- Kennerknecht N (2003) Untersuchungen zum Export von verzweigtkettigen Aminosäuren in *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Kennerknecht N, Sahm H, Yen MR, Patek M, Saier Jr MH, Jr., Eggeling L (2002) Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol* 184:3947-3956
- Khodursky AB, Bernstein JA, Peter BJ, Rhodius V, Wendisch VF, Zimmer DP (2003) *Escherichia coli* spotted double-strand DNA microarrays: RNA extraction, labeling, hybridization, quality control, and data management. *Methods Mol Biol* 224:61-78
- Kim HJ, Kim TH, Kim Y, Lee HS (2004) Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 186:3453-3460
- Kim SK et al. (2000) Dual transcriptional regulation of the *Escherichia coli* phosphate-starvation-inducible *psiE* gene of the phosphate regulon by PhoB and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J Bacteriol* 182:5596-5599
- Kinoshita S, and K. Tanaka (1972) Glutamic acid. In: Yamada K (ed) The microbial production of amino acids. John Wiley, N.Y., New York, pp 263-324
- Kinoshita S, Uda S, Shimono M (1957) Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* 3:193-205
- Kocan M (2005) Regulation of the phosphate starvation response in *Corynebacterium glutamicum* by the PhoRS two-component system. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.
- Kocan M, Schaffer S, Ishige T, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF, Bott M (2006) Two-Component Systems of *Corynebacterium glutamicum*: Deletion Analysis and Involvement of the PhoS-PhoR System in the Phosphate Starvation Response. *J Bacteriol* 188:724-732
- Kushner SR (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *J Bacteriol* 184:4658-4665; discussion 4657
- Lambert C, Weuster-Botz D, Weichenhain R, Kreutz EW, De Graaf AA, Schoberth SM (2002) Monitoring of inorganic polyphosphate dynamics in *Corynebacterium glutamicum* using a novel oxygen sparger for real time P-31 *in vivo* NMR. *Acta Biotechnologica* 22:245-260
- Lange C, Rittmann D, Wendisch VF, Bott M, Sahm H (2003) Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine. *Appl Environ Microbiol* 69:2521-2532
- Lebens M, Lundquist P, Soderlund L, Todorovic M, Carlin NI (2002) The *nptA* gene of *Vibrio cholerae* encodes a functional sodium-dependent phosphate cotransporter homologous to the type II cotransporters of eukaryotes. *J Bacteriol* 184:4466-4474

- Lehnen D, Blumer C, Polen T, Wackwitz B, Wendisch VF, Uden G (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 45:521-532
- Letek M, Valbuena N, Ramos A, Ordonez E, Gil JA, Mateos LM (2006) Characterization and Use of Catabolite-Repressed Promoters from Gluconate Genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 188:409-423
- Liebl W (1991) The genus *Corynebacterium* - nonmedical. In: A. Balows HGT, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (ed) *The procaryotes*. Springer, New York, pp 1157 - 1171
- Liu W, Hulett FM (1997) *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J Bacteriol* 179:6302-6310
- Liu W, Hulett FM (1998) Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site. *Microbiology* 144 (Pt 5):1443-1450
- Liu W, Qi Y, Hulett FM (1998) Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol Microbiol* 28:119-130
- Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 44:707-717
- Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier MH, Jr. (2005) Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* 187:7826-7839
- Lounes A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P (1996) Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:204-211
- Madan Babu M, Teichmann SA (2003) Functional determinants of transcription factors in *Escherichia coli*: protein families and binding sites. *Trends Genet* 19:75-79
- Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A (1989) Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* 210:551-559
- Maplestone RA, Stone MJ, Williams DH (1992) The evolutionary role of secondary metabolites--a review. *Gene* 115:151-157
- Martin JF, Marcos, A.T., Martin, A., Asturias, J.A., and Liras, P. (1994) *Phosphate control of antibiotic biosynthesis at the transcriptional level*. American Society for Microbiology Press, Washington
- Martin JFaD, A. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiolbiol Rev* 44:230-251

- McCleary WR, Stock JB, Ninfa AJ (1993) Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? J Bacteriol 175:2793-2798
- Minnig K, Lazarevic V, Soldo B, Mauel C (2005) Analysis of teichoic acid biosynthesis regulation reveals that the extracytoplasmic function sigma factor {sigma}M is induced by phosphate depletion in *Bacillus subtilis* W23. Microbiology 151:3041-3049
- Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W, Saier MH, Jr. (2001) Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. Mol Microbiol 39:1366-1381
- Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P (1994) Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. Biol Mass Spectrom 23:249-261
- Netzer R et al. (2004) Roles of pyruvate kinase and malic enzyme in *Corynebacterium glutamicum* for growth on carbon sources requiring gluconeogenesis. Arch Microbiol 182:354-363
- Nouwens AS et al. (2000) Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Electrophoresis 21:3797-3809
- Ogawa N, DeRisi J, Brown PO (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. Mol Biol Cell 11:4309-4321
- Ogawa N, Noguchi K, Sawai H, Yamashita Y, Yompakdee C, Oshima Y (1995) Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of Pi signals in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 15:997-1004
- Oshima Y (1997) The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Genet Syst 72:323-334
- Pallerla SR et al. (2005) Formation of volutin granules in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol Lett 243:133-140
- Pan B, Unnikrishnan I, LaPorte DC (1996) The binding site of the IclR repressor protein overlaps the promoter of *aceBAK*. J Bacteriol 178:3982-3984
- Patek M, Muth G, Wohlleben W (2003a) Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, and *Bacillus subtilis*. J Biotechnol 104:325-334
- Patek M, Nesvera J, Guyonvarch A, Reyes O, Leblon G (2003b) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol 104:311-323
- Paul S, Birkey S, Liu W, Hulett FM (2004) Autoinduction of *Bacillus subtilis* *phoPR* operon transcription results from enhanced transcription from EsigmaA- and EsigmaE-responsive promoters by phosphorylated PhoP. J Bacteriol 186:4262-4275

- Peirs P et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced *in vivo* virulence. *Infect Immun* 73:1898-1902
- Peters-Wendisch PG et al. (2001) Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:295-300
- Pinson B, Merle M, Franconi JM, Daignan-Fornier B (2004) Low affinity orthophosphate carriers regulate PHO gene expression independently of internal orthophosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279:35273-35280
- Polen T (2002) Genomweite Expressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität. In:
- Polen T, Rittmann D, Wendisch VF, Sahm H (2003) DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl Environ Microbiol* 69:1759-1774
- Polen T, Wendisch VF (2004) Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* 118:215-232
- Pragai Z et al. (2004) Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186:1182-1190
- Pragai Z, Harwood CR (2002) Regulatory interactions between the Pho and sigma(B)-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 148:1593-1602
- Price CW, Fawcett P, Ceremonie H, Su N, Murphy CK, Youngman P (2001) Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 41:757-774
- Puri-Taneja A, Paul S, Chen Y, Hulett FM (2006) CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P(A6). *J Bacteriol* 188:1266-1278
- Rao NN, Torriani A (1990) Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 4:1083-1090
- Reinscheid DJ, Eikmanns BJ, Sahm H (1994a) Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J Bacteriol* 176:3474-3483
- Reinscheid DJ, Eikmanns BJ, Sahm H (1994b) Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* 140 (Pt 11):3099-3108
- Reinscheid DJ, Schnicke S, Rittmann D, Zahnnow U, Sahm H, Eikmanns BJ (1999) Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *pta-ack* operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase. *Microbiology* 145 (Pt 2):503-513

- Ren YL, Garges S, Adhya S, Krakow JS (1990) Characterization of the binding of cAMP and cGMP to the CRP*598 mutant of the *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* 18:5127-5132
- Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ (2005) From The Cover: Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8327-8332
- Resnik E, Pan B, Ramani N, Freundlich M, LaPorte DC (1996) Integration host factor amplifies the induction of the *aceBAK* operon of *Escherichia coli* by relieving IclR repression. *J Bacteriol* 178:2715-2717
- Reznikoff WS (1992) Catabolite gene activator protein activation of *lac* transcription. *J Bacteriol* 174:655-658
- Rhodius V, Van Dyk TK, Gross C, LaRossa RA (2002) Impact of genomic technologies on studies of bacterial gene expression. *Annu Rev Microbiol* 56:599-624
- Rickman L et al. (2005) A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol* 56:1274-1286
- Rittmann D, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF (2005) Phosphate Starvation-Inducible Gene *ushA* Encodes a 5' Nucleotidase Required for Growth of *Corynebacterium glutamicum* on Media with Nucleotides as the Phosphorus Source. *Appl Environ Microbiol* 71:4339-4344
- Romeo T (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29:1321-1330
- Sahm H, Eggeling L, de Graaf AA (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem* 381:899-910
- Saiki RK et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sandler P, Weisblum B (1989) Erythromycin-induced ribosome stall in the *ermA* leader: a barricade to 5'-to-3' nucleolytic cleavage of the *ermA* transcript. *J Bacteriol* 171:6680-6688
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73

- Schaffer S et al. (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* 22:4404-4422
- Schau M, Eldakak A, Hulett FM (2004) Terminal Oxidases Are Essential To Bypass the Requirement for ResD for Full Pho Induction in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186:8424-8432
- Schneider KR, Smith RL, O'Shea EK (1994) Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* 266:122-126
- Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, Church GM, Rosenow C (2003) Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* 13:216-223
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6:639-645
- Shankar S, Kavanaugh-Black A, Kamath S, Chakrabarty AM (1995) Characterization of a phosphoprotein phosphatase for the phosphorylated form of nucleoside-diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 270:28246-28250
- Shin S, Song SG, Lee DS, Pan JG, Park C (1997) Involvement of *iclR* and *rpoS* in the induction of *acs*, the gene for acetyl coenzyme A synthetase of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 146:103-108
- Sindelar G (2003) Globale Expressionsanalysen zur Charakterisierung der Lysin-Produktion in *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität.
- Sola-Landa A, Moura RS, Martin JF (2003) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6133-6138
- Sola-Landa A, Rodriguez-Garcia A, Franco-Dominguez E, Martin JF (2005) Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol* 56:1373-1385
- Sorensen KI, Hove-Jensen B (1996) Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *J Bacteriol* 178:1003-1011
- Stackebrandt E, F. A. Rainey, and N.L. Ward-Rainey (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:479-491
- Steed PM, Wanner BL (1993) Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* 175:6797-6809
- Stulke J (2002) Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch Microbiol* 177:433-440

- Stulke J, Hillen W (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54:849-880
- Sun G, Birkey SM, Hulett FM (1996) Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:941-948
- Tanaka S et al. (2003) Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Micrococcus phosphovorans*. *J Bacteriol* 185:5654-5656
- Taschner NP, Yagil E, Spira B (2004) A differential effect of sigmaS on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* 150:2985-2992
- Tauch A, Puhler A, Kalinowski J, Thierbach G (2003) Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *J Biotechnol* 104:27-40
- Tindall KR, Kunkel TA (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27:6008-6013
- Tobisch S, Zuhlke D, Bernhardt J, Stulke J, Hecker M (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181:6996-7004
- van der Rest ME, Lange C, Molenaar D (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:541-545
- van Veen HW, Abee T, Kortstee GJ, Konings WN, Zehnder AJ (1994) Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33:1766-1770
- Varmus HE, Perlman RL, Pastan I (1971) Regulation of *lac* transcription in antibiotic-treated *E. coli*. *Nat New Biol* 230:41-44
- Vasicova P, Abrahmova Z, Nesvera J, Patek M, Sahm H, Eikmanns B (1998) Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Techniques* 12:743-746
- Vogtli M, Chang PC, Cohen SN (1994) *afsR2*: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* 14:643-653
- Vytvytska O, Jakobsen JS, Balcunaite G, Andersen JS, Baccarini M, von Gabain A (1998) Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14118-14123
- Wade CW, W. C.; Cohen-Chalamish S.; Breaker R. R. (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15908-15913
- Wanner BL (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 51:47-54

- Wanner BL (1996a) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, 2nd edn. ASM Press, Washington, D.C
- Wanner BL (1996b) Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int* 49:964-967
- Wanner BL, Chang BD (1987) The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 169:5569-5574
- Wanner BL, Wilmes-Riesenberg MR (1992) Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:2124-2130
- Webb DC, Rosenberg H, Cox GB (1992) Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* 267:24661-24668
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187:1591-1603
- Wendisch VF (2003a) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J. Biotechnol.* 101
- Wendisch VF (2003b) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* 104:273-285
- Wendisch VF, and M. Bott (2005) Phosphorus metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, USA
- Wendisch VF, Spies M, Reinscheid DJ, Schnicke S, Sahm H, Eikmanns BJ (1997) Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch Microbiol* 168:262-269
- Wendisch VF, Zimmer DP, Khodursky A, Peter B, Cozzarelli N, Kustu S (2001) Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal Biochem* 290:205-213
- Wennerhold J, Krug A, Bott M (2005) The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from corynebacterium under iron limitation and is itself repressed by DtxR. *J Biol Chem* 280:40500-40508
- Wessel M (2004) Funktionelle Analyse des essentiellen Zweikomponentensystems CgtSR4 in *Corynebacterium glutamicum*. Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität. In:
- Willsky GR, Malamy MH (1980) Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144:356-365

- Zhou L, Lei XH, Bochner BR, Wanner BL (2003) Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. J Bacteriol 185:4956-4972
- Zimmer DP et al. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14674-14679

7. Anhang

Tab. 7: Primer, die in dieser Arbeit benutzt wurden

Name	Sequenz (5' → 3')	nt in fett = nt in NC003450	Funktion
ushA80prext	G CGAAAGCTGGAAGTGCAGTGC	343717	IRD800 markierter Primer für <i>ushA</i>
ushA1	T TAAACACCCATAAAGAGGGTGAAGAT	343450	Forw. Primer für <i>ushA</i>
ushA2	C CACTGGCACCCATTCTGAGTAAC	343843	Rev. Primer für <i>ushA</i>
nucH90prext	A GGATTAGCTGTTGCTGCTGGAACAAGTGC	2754084	IRD800 markierter Primer für <i>nucH</i>
nucH1	A GACCAAAGGTGAAGTGCAGGTC	2753880	Forw. Primer für <i>nucH</i>
nucH2	C GAGGGAATGTCCTGAGGTTG	2754199	Rev. Primer für <i>nucH</i>
pstsR-1c	<u>CCCCTCGAGT</u> T AAAAAGAGACTTGCTAAAAACCT	2737835	Forw. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XhoI</u>)
pstsR0	<u>CCCCTCGAGT</u> A AGAATCGGTGATTTTCGTTCC	2737801	Forw. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XhoI</u>)
pstsR1	<u>CCCCTCGAGT</u> A GAGTCTCCAAATGTTACGAGTGAA	2737746	Forw. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XhoI</u>)
pstsR2	<u>CCCCTCGAGT</u> C CTGAGTTAGTCATTTCAAGGTCCTTA	2737657	Forw. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XhoI</u>)
pstsR3	<u>CCCCTCGAGT</u> G CCCGCTACAGGATCTGCTCA	2737596	Forw. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XhoI</u>)
pstR4	<u>CGTCTAGT</u> A TAGACCTTGAAATGACTAACTCAGG	2737633	Forw. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XhoI</u>)
pstsF0	<u>CGTCTAGT</u> T GCGGACTGCTGGGAAGATG	2737328	Rev. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XbaI</u>)
pstsF1	<u>CGTCTAGT</u> C CTCAATGGATGCAGCATCGGAAG	2737386	Rev. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XbaI</u>)
pstsF2	<u>CGTCTAGT</u> T CAGACTCATTGGAGTCGGAGCAA	2737443	Rev. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XbaI</u>)
pstsF3	<u>CGTCTAGT</u> G TTACGGGGAAGCCTTTCCGG	2737532	Rev. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XbaI</u>)
pstsF4	<u>CGTCTAGT</u> A TAGACCTTGAAATGACTAACTCAGG	2737633	Rev. Primer für <i>pstS</i> Deletionsanalyse (<u>XbaI</u>)
pstsF3c	C GGTTTCCTCCGGATTGCTCAGCACTAAAAACCTA	2737599	Gelretardierungs-experimente
pstsR1c	C CCGATGTGGGTAGTGGCAGAATTTGCCGAACGAT	2737722	Gelretardierungs-experimente
pstsF3m	C GGTTTCCTCCGGATTGCGCGCGAGTAAAAACCTA	2737599	Gelretardierungs-experimente, <u>mutagenisierte Nucleotide</u>
pstsR1m	C CCGATGTGGGTAGTGGCAGAAGAGGCCGAACGAT	2737722	Gelretardierungs-experimente, <u>mutagenisierte Nucleotide</u>
pstsF0biotin	Biotin-TEG- T GCGGACTGCTGGGAAGATGCAC'	2737328	Biotinylierter Rev. primer für <i>pstS</i> Promotor/Operatorsonde
pstsR0biotin	Biotin-TEG- T AAGAATCGGTGATTTTCGTTCC'	2737801	Biotinylierter For. primer für <i>pstS</i> Promotor/Operatorsonde
pstsR2biotin	Biotin-TEG- C CTGAGTTAGTCATTTCAAGGTCCTTA	2737657	Biotinylierter For. primer für <i>pstS</i> Promotor/Operatorsonde

Name	Sequenz (5' → 3')	nt in fett = nt in NC003450	Funktion
glxRforward	CGCATATG GA AGGTGTACAGGAGATCCTGT	306778	Überexpression von GlxR (NdeI)
glxRreverse	CCCGGATCC T TATCGAGCGCGACGTGCCAAAT	307461	Überexpression von GlxR (BamHI)
cgtR4forward	CGCATATG AC GAGAATCCTGATCGTTGAAGAT	427174	Überexpression von CgtR4 (NdeI)
cgtR4reverse	CCCGGATCC C TACAGCTCGAATTTGTAGCCCAA	427869	Überexpression von CgtR4 (BamHI)
NCgl1401forward	CGCATATG TC GTGGCACCACCAAGCAACTGA	1534525	Überexpression von NCgl1401 (NdeI)
NCgl1401reverse	CCCGGATCC T TACTCTTCCAGCGAGGTGCCAA	1535397	Überexpression von NCgl1401 (BamHI)
glxRforward_sal	CGGTCGAG G TGGAAGGTGTACAGGAGATCCTGT	306778	Homologe Überexpression von GlxR (Sal)

Forw., forward; rev., reverse

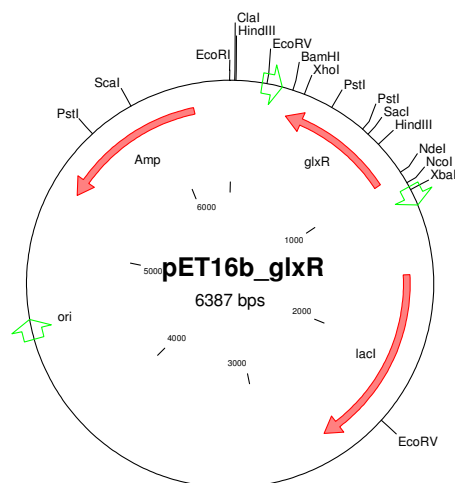


Abb. 37: Plasmid pET16b_glxR zur Überexpression von GlxR mit einem N-terminalen His₁₀-Tag.

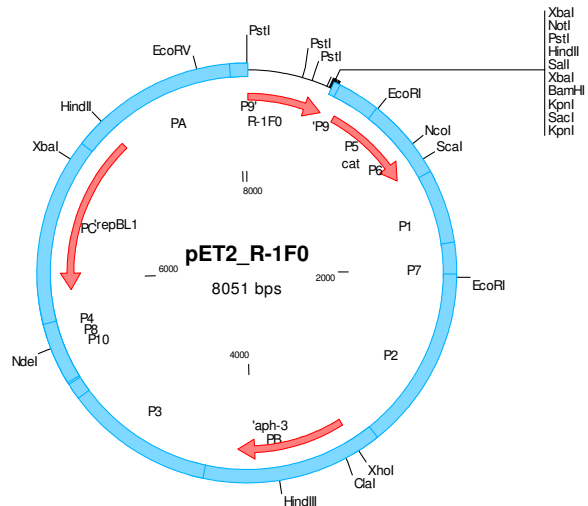


Abb. 38: Plasmidkarte pET2_R-1F0: Promotor-Testvektor pET2 mit R-1F0-Fragment des *pstSCAB*-Promotors.

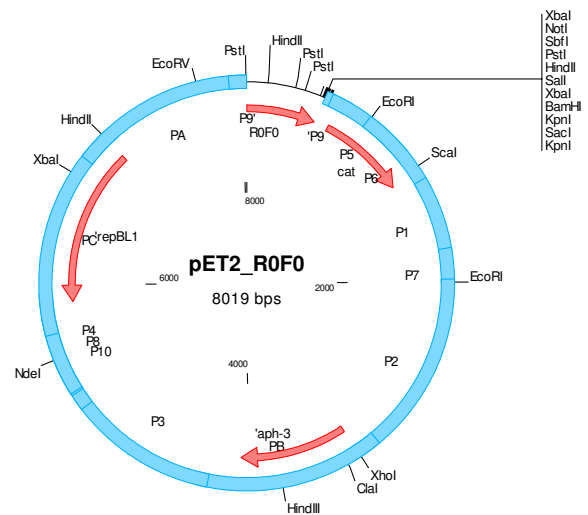


Abb. 39: Plasmidkarte pET2_R0F0: Promotor-Testvektor pET2 mit R0F0-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

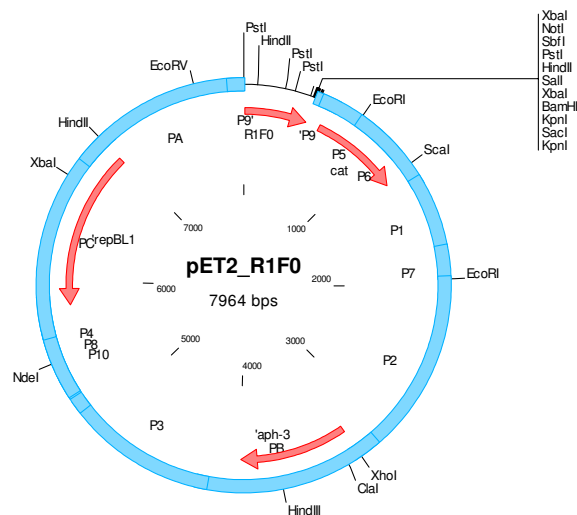


Abb. 40: Plasmidkarte pET2_R1F0: Promotor-Testvektor pET2 mit R1F0-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

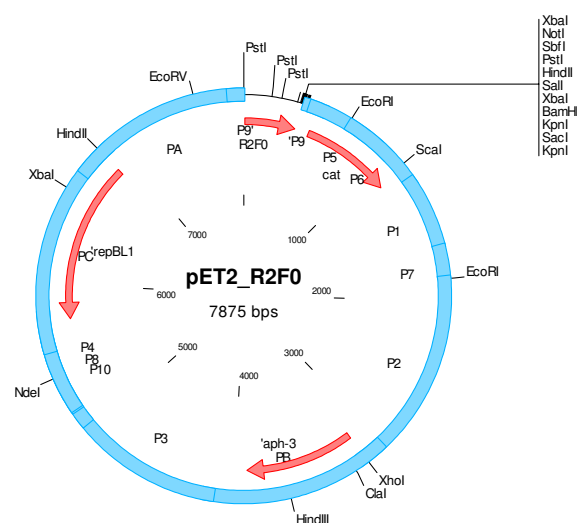


Abb. 41: Plasmidkarte pET2_R2F0: Promotor-Testvektor pET2 mit R2F0-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

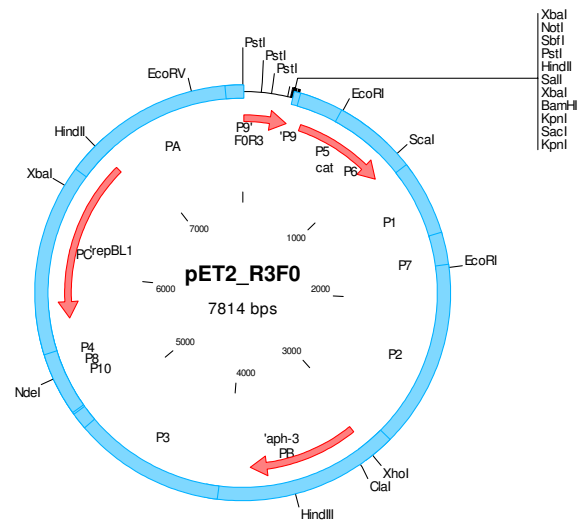


Abb. 42: Plasmidkarte pET2_R3F0: Promotor-Testvektor pET2 mit R3F0-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

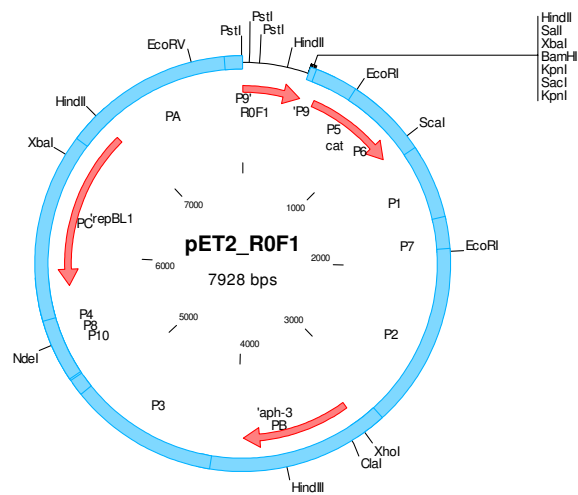


Abb. 43: Plasmidkarte pET2_R0F1: Promotor-Testvektor pET2 mit R0F1-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

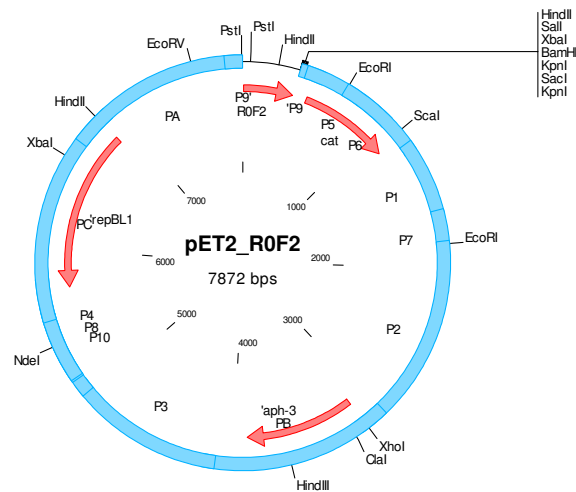


Abb. 44: Plasmidkarte pET2_R0F2: Promotor-Testvektor pET2 mit R0F2-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

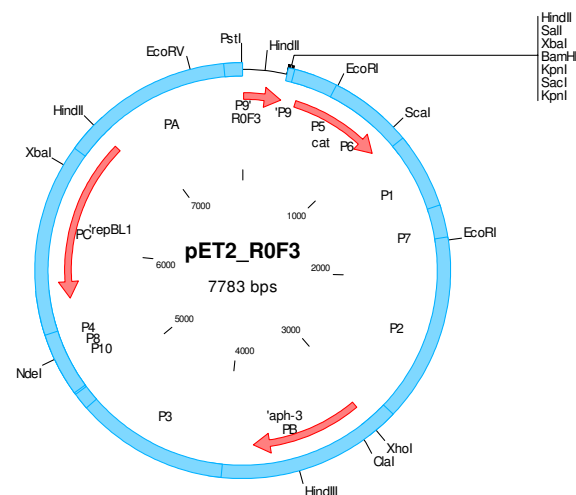


Abb. 45: Plasmidkarte pET2_R0F3: Promotor-Testvektor pET2 mit R0F3-Fragment des *pstSCAB*-Operons.

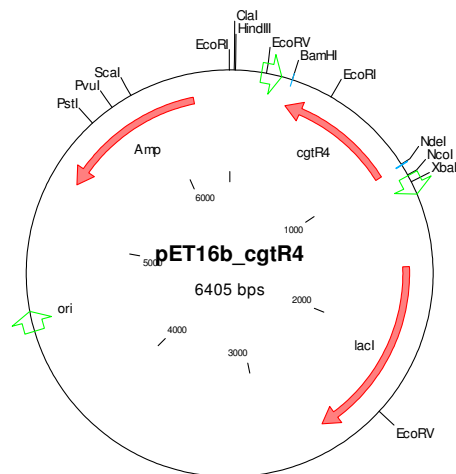


Abb. 46: Plasmidkarte pET16b_cgtR4 zur Überexpression von CgtR4 mit einem N-terminalen His₁₀-Tag.

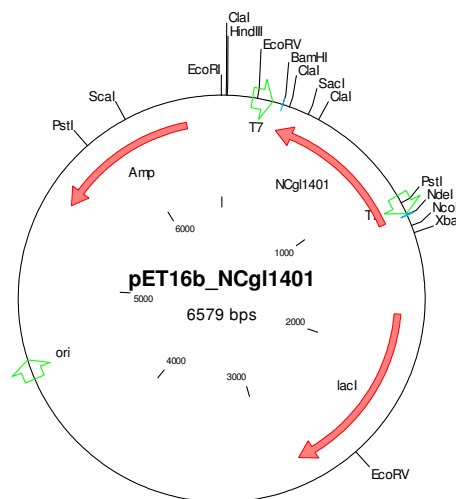


Abb. 47: Plasmidkarte pET16b_NCgl1401 zur Überexpression von NCgl1401 mit einem N-terminalen His₁₀-Tag.

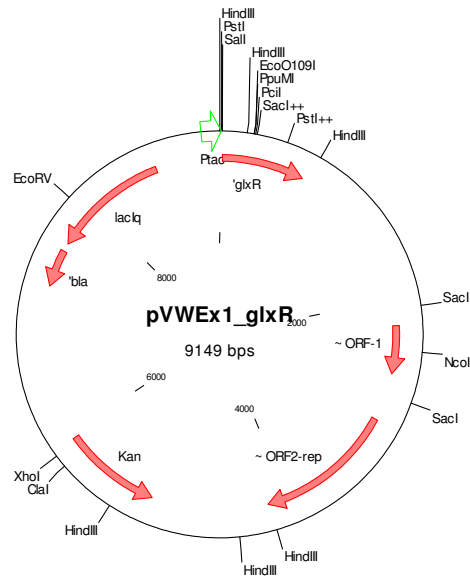


Abb. 48: Plasmidkarte pVWEx1_glxR zur homologen Überexpression des Transkriptionsregulators GlxR.

Danksagung

Herrn Prof. Hermann Sahm danke ich für die Bereitstellung des Themas und das Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Biotechnologie I.

Herrn Prof. Volker Wendisch gilt mein besonderer Dank für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für die ständige Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Ratschläge in allen wissenschaftlichen Bereichen.

Dr. Tino Polen danke ich für die Einführung in die DNA-Chip-Technik sowie die Bereitschaft bei Problemen jeglicher Art mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Doris Rittmann danke ich für die Genom-PCR von *C. glutamicum*, ohne die die DNA-Chip-Technik in Jülich nicht möglich gewesen wäre. Außerdem bedanke ich mich für die Hilfe bei den Enzymtests und die sehr gute Organisation in der Arbeitsgruppe.

Sarah Schaaf und Melanie Brocker danke ich für die Einführung in die DNA-Affinitätschromatographie. Außerdem noch einmal ein besonderer Dank für Sarah, die die Arbeit Korrektur gelesen hat.

Tobias Georgi und Verena Werner danke ich für die sehr angenehme Atmosphäre im Labor sowie konstruktiven Diskussionen in vielen fachlichen als auch weniger fachlichen Angelegenheiten.

Corinna, Andrea, Christian, Siggie und allen anderen schon genannten sowie ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke meinem Mann Tim, meinen Eltern und Schwiegereltern für die Unterstützung und Aufmunterung in dieser Zeit.

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

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 3-89336-221-5
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 3-89336-245-2
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 3-89336-272-X
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 3-89336-337-8
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 3-89336-340-8
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 3-89336-344-0
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 3-89336-360-2
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 3-89336-364-5

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 3-89336-379-3
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 3-89336-380-7
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 3-89336-382-3
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 3-89336-387-4
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 3-89336-388-2
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 3-89336-389-0
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 3-89336-390-4
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 3-89336-400-5
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 3-89336-407-2

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoiner mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkelfmann (2005), 222 Seiten
ISBN: 3-89336-408-0
20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizierender und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 3-89336-412-9
21. **Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 3-89336-413-7
22. **Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 3-89336-416-1
23. **Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 3-89336-420-X
24. **Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 3-89336-423-4
25. **Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 3-89336-424-2
26. **Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 3-89336-427-7
27. **Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 3-89336-439-0
28. **NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifizierender, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 3-89336-441-2

29. **Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 127 Seiten
ISBN: 3-89336-442-0

30. **Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging**
Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System
by C. Lackas (2006), XX, 176 Seiten
ISBN: 3-89336-451-X

31. **Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen**
Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I
von T. Stillger (2006), XIV, 146 Seiten
ISBN: 3-89336-457-9

32. **Echtzeitsystem für Phasenrücksetzanalysen und Neuro-Rückkopplungen am MEG**
von H. Rongen (2006), 176 Seiten
ISBN: 3-89336-461-7

33. **Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum***
von U. Sorger-Herrmann (2006), 117 Seiten
ISBN: 3-89336-466-8

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 33
ISBN 3-89336-466-8

Lebenswissenschaften
Life Sciences