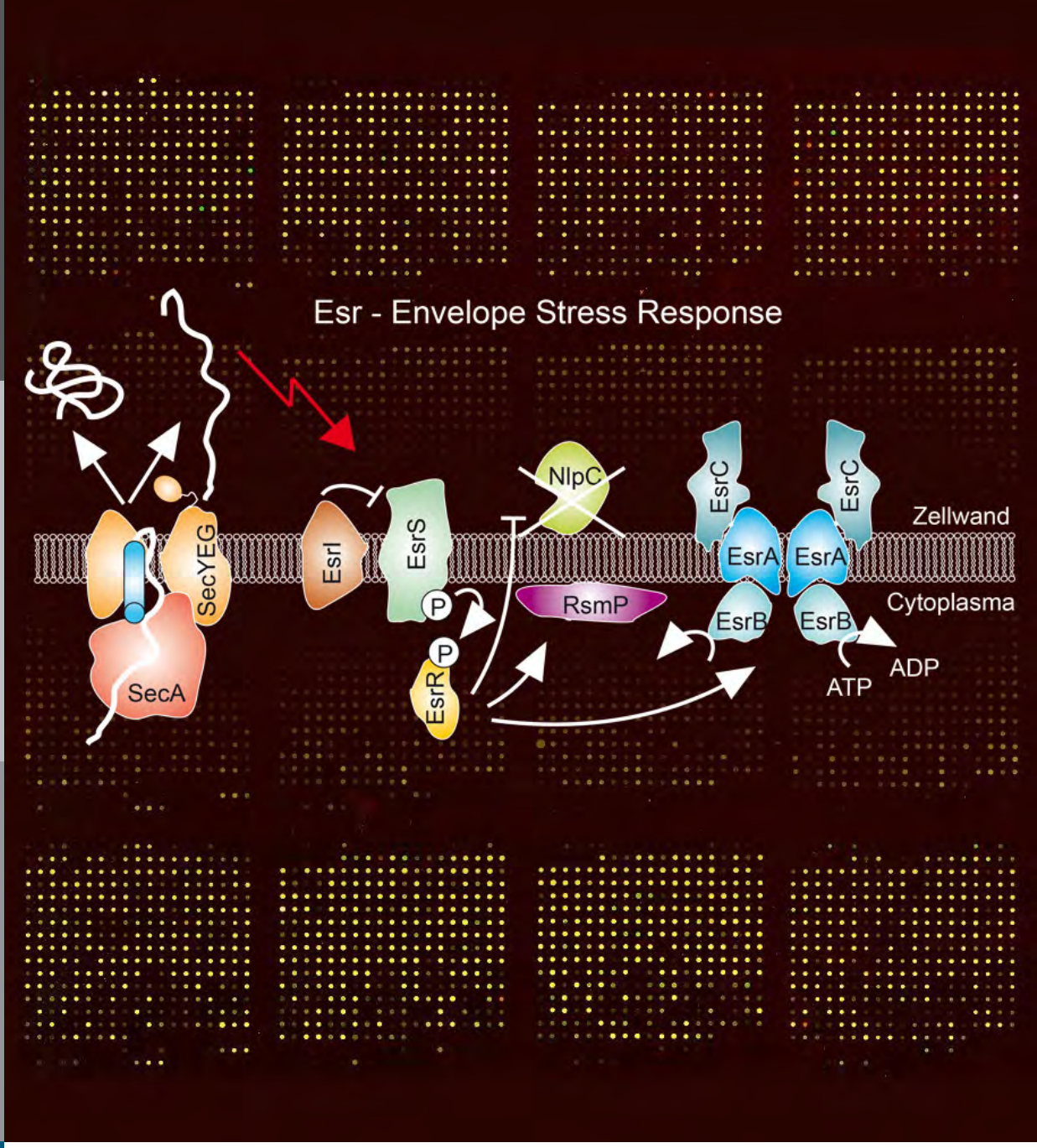


Regulatorische Aspekte der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *Corynebacterium glutamicum*

Ava Rebecca Chattopadhyay

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM

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

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

Ava Rebecca Chattopadhyay

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

ISSN 1866-1785 ISBN 978-3-89336-845-7

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung 1

II. Summary 3

III. Einleitung 5

1 Biotechnologische Herstellung rekombinanter Proteine 5

1.1 Die sekretorische Produktion rekombinanter Proteine 6

2 *Corynebacterium glutamicum* als Wirtsorganismus zur Herstellung rekombinanter Proteine 9

3 Stressantworten in Mikroorganismen aufgrund von Proteinexpression und -sekretion 12

3.1 Die Überexpression von Proteinen kann zur Induktion der Hitzeschockantwort führen 13

3.2 Schutz durch die extracytoplasmatische Protease HtrA 14

3.3 Schutz der Zellhülle durch den Sigmafaktor σ^E 15

3.4 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem CpxAR 16

3.5 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem CssRS 17

3.6 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem BaeSR 18

3.7 Schutz der Zellhülle durch das „Phage Shock“ Protein (Psp)-System 18

3.8 Schutz der Zellhülle durch das Zweikomponentensystem LiaSR 19

4 Die biotechnologische Nutzung von Zellhüllenschutzsystemen 20

4.1 Die Nutzung des Wissens über das Psp-System 20

4.2 Die Nutzung des Wissens über das CssRS-System 20

5 Genomweite Transkriptionsanalysen zur Definition von Zellhüllenstress-antworten als Reaktion auf die Überexpression und Sekretion von Proteinen 21

6 Mögliche Engpässe bei der Expression und Sekretion heterologer Proteine in *C. glutamicum* 22

7 Ziel der Arbeit 23

IV. Material und Methoden 25

1 Chemikalien und Enzyme 25

2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide 25

2.1 Bakterienstämme 25

2.2 Plasmide 26

2.3 Oligonukleotide 27

3 Mikrobiologische Methoden 30

3.1 Nährmedien 30

3.2 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung 31

4 Molekularbiologische Methoden 34

4.1 DNA-Isolierung 34

4.2 DNA- / RNA-Konzentrationsbestimmung 34

4.3 Agarosegelelektrophorese 34

4.4 Aufreinigung von DNA 35

4.5 Amplifikation von DNA per PCR (Polymerasekettenreaktion) 35

4.6 Restriktion von DNA 36

4.7 Dephosphorylierung von DNA 36

4.8 Ligation von DNA 36

4.9 Klonierungen 36

4.10 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation 38

4.11 Sequenzierung von DNA 40

4.12 Konstruktion von Deletionsmutanten in *C. glutamicum* (Schäfer *et al.*, 1994), modifiziert 40

5 Genomweite Transkriptionsanalysen mit Hilfe von DNA-Microarrays 41

5.1 Isolierung von RNA 41

5.2 Analyse der isolierten RNA mit Hilfe von denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel 41

5.3 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA..... 42

5.4 Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNA auf DNA-Microarrays ... 43

5.5 Auslesen der DNA-Microarrays..... 44

5.6 Auswertung der DNA-Microarray-Daten..... 44

6 Biochemische Methoden 44

6.1 Analyse von Proteinexpression und –sekretion in *C. glutamicum* 44

6.2 Western Blot (Towbin *et al.*, 1979), modifiziert..... 46

6.3 Herstellung von löslichem Rohextrakt mit *E. coli*..... 47

6.4 Aufreinigung von Proteinen mit Hexahistidintag mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose 48

6.5 Umpufferung von gereinigtem Protein per PD-10 Säule 49

6.6 Thrombin-Verdau 49

6.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen..... 49

6.8 Gelretardationsexperimente..... 49

6.9 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese 50

7 Bioinformatische Methoden 50

7.1 Die DNA-Motivsuche mit MEME (Bailey & Elkan, 1994) 50

V. Ergebnisse 51

1 Untersuchung des Transkriptoms von *C. glutamicum* bei Expression und Tat-abhängiger Sekretion heterologer Proteine..... 51

1.1 GFP als Modellprotein..... 53

1.2 MalE als Modellprotein..... 76

1.3 *C. glutamicum* ATCC 13032 ΔTatAC als Simulation einer ausgelasteten Tat-Translokase 77

1.4 Fazit der Untersuchung der transkriptionellen Reaktionen auf die Tat-abhängige Translokation von Proteinen in *C. glutamicum*..... 85

2 Untersuchung ausgewählter Reaktionen von *C. glutamicum* auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion heterologer Proteine 86

2.1 *htrA* (*cg0998*) liegt in *C. glutamicum* in der gleichen Anordnung wie in *M. tuberculosis* hinter einem Zweikomponentensystem 87

2.2 Transkriptionelle Regulation von Genen, die für Proteine mit PspC- („Phage Shock“ Protein C) oder PspA-Domäne kodieren, als Reaktion auf die Expression und Sec-abhängige Sekretion eines heterologen Proteins in *C. glutamicum* 101

VI. Diskussion 125

1.1 Die Expression des signalpeptidlosen GFP induziert die SOS-Antwort . 125

1.2 Die Expression sowie die Sekretion von Cg0955-GFP führt zur Repression von Genen, die in die Kupferhomöostase involviert sind – und teilweise Tat-abhängig transloziert werden 127

1.3 Die Expression und Sekretion von $PhoD^{Bs}$-GFP führt zur Induktion von Genen für Chaperone in *C. glutamicum* 129

1.4 Auch nach längerer Expression und Sekretion von $PhoD^{Bs}$-GFP erfolgen keine spezifischen Reaktionen auf die Sekretion des heterologen Proteins.... 131

1.5 *C. glutamicum* zeigt auf die Expression und Tat-abhängige Sekretion des Modellproteins TorA-MalE keine Reaktionen auf transkriptioneller Ebene 132

1.6 *C. glutamicum* ATCC 13032 ΔTatAC als Simulation vollständiger Auslastung der Tat-Translokase zeigt transkriptionelle Reaktionen 133

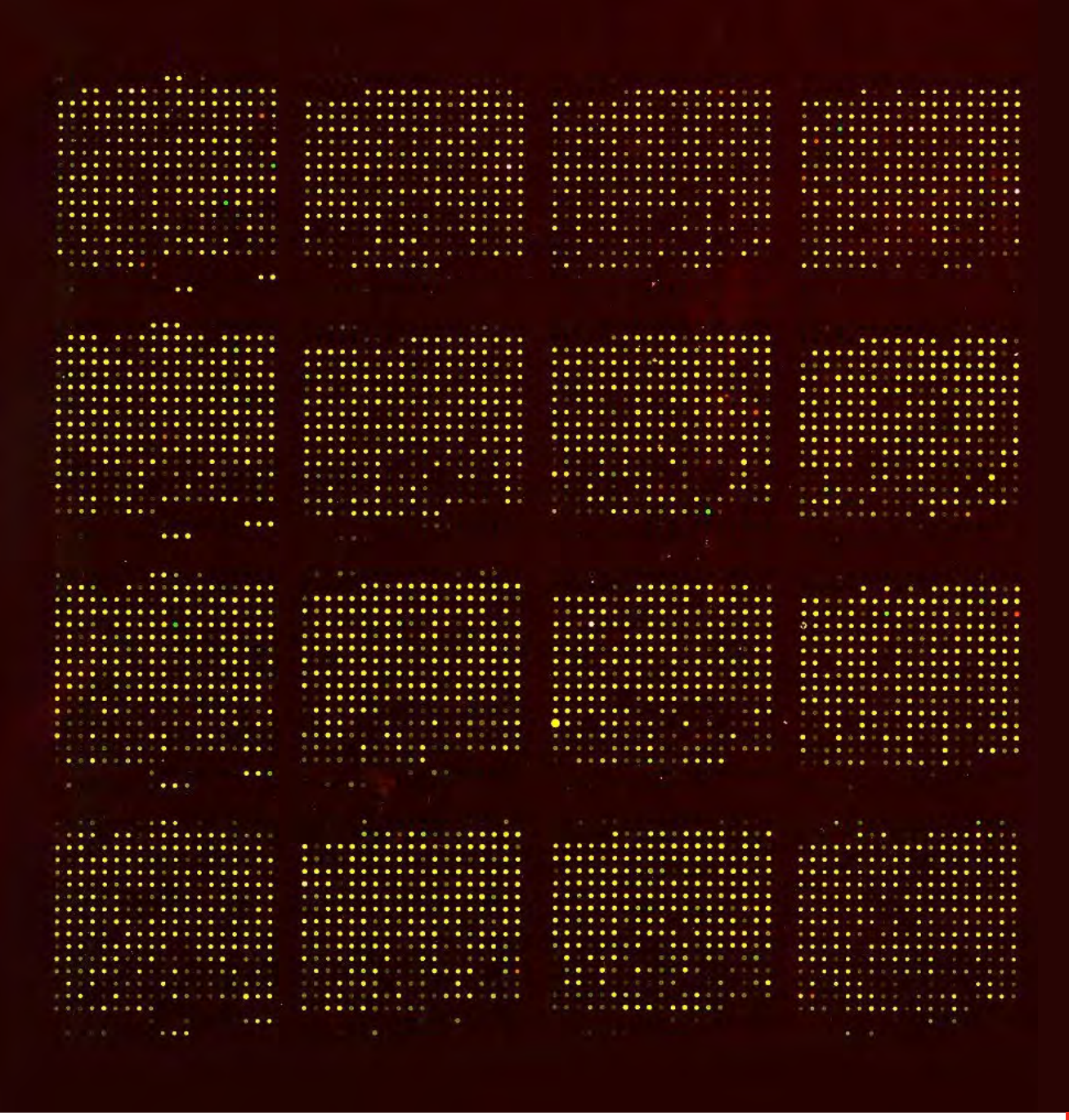
1.7 Fazit zur Expression und Tat-abhängigen Sekretion von heterologen Proteinen in *C. glutamicum* 137

2 Hinweise auf eine Beteiligung der Zweikomponentensysteme CgtRS2 und CgtSR7 am Schutz der Zellhülle 139

2.1 Das Zweikomponentensystem CgtRS2 139

2.2 Das Zweikomponentensystem CgtSR7 147

VII. Literatur 155



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

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM