

**Zellteilung und Chromosomensegregation in  
*Corynebacterium glutamicum***

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Astrid Schwaiger**

aus Neunkirchen / Saar

**Köln, März 2009**



1. Referent: Herr Prof. Dr. Reinhard Krämer  
Institut für Biochemie der Universität zu Köln
2. Referent: Frau Prof. Dr. Karin Schnetz  
Institut für Genetik der Universität zu Köln

Tag der Disputation: 20.05.2009



## Kurzzusammenfassung

Das Gram-positive, stäbchenförmige Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* gehört zu den Mykolsäure-haltigen Actinomyceten und durchläuft eine für Coryneforme typische V-förmige Zellteilung. Zellteilungsmechanismen sind im Wesentlichen in den stäbchenförmigen Modellorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mechanismen der Chromosomentrennung und des Chromosomenschutzes gegen eine Teilung durch das Septum sowie Regulatoren der Lokalisation der Zellteilungsebene in *C. glutamicum* untersucht. Da *C. glutamicum* keinerlei Gene für bisher beschriebene Proteine des Chromosomenschutzes besitzt, wurde die Frage bearbeitet, inwiefern dieser Organismus die korrekte Aufteilung des Erbguts auf die beiden Tochterzellen und die Lokalisation des Septums zwischen den beiden segregierten Chromosomen gewährleistet. So konnte gezeigt werden, dass das Par System in *C. glutamicum*, welches aus einem *parAB* Operon und einer zusätzlichen ATPase ParA<sub>2</sub> besteht, als negativer Regulator der FtsZ Polymerisation agiert und somit die Platzierung des Septums negativ reguliert. Eine Überexpression von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> führte zu signifikant verlängerten Zellen. Zudem konnte gereinigtes ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> die Polymerisation von FtsZ *in vitro* inhibieren. So schützen beide ParA ATPasen, die unspezifisch an DNS binden, das Chromosom gegen fatale Septumbildung. Dabei bildet ParA<sub>1</sub> innerhalb der Zelle große Strukturen über dem gesamten Chromosom aus, während ParA<sub>2</sub> hauptsächlich in kleinen Bereichen am Septum und an den Polen lokalisiert ist. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ParB eine hochkonservierte *parS* Sequenz spezifisch bindet, welche dreimal auf dem Genom nahe der *oriC* Region von *C. glutamicum* identifiziert werden konnte. ParB kolokalisierte mit der *oriC* Region, was das Modell, nach dem ParB *in vivo* an die *parS* Sequenzen bindet und so die Segregation initiiert, unterstützt. Weiterhin steigerte ParB die ATPase Aktivität von ParA<sub>2</sub>, während es die enzymatische Aktivität von ParA<sub>1</sub> fast vollständig inhibierte. Dieses Ergebnis verstärkt die Annahme, dass beide ATPasen während der Zellteilung verschiedene Aufgaben wahrnehmen. So scheint ParA<sub>1</sub> für den Schutz und die Segregation des Chromosoms und ParA<sub>2</sub> für die Verankerung der Chromosome an den Zellpolen verantwortlich zu sein, was durch Untersuchungen mittels eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems bestärkt wurde.

## **Abstract**

*Corynebacterium glutamicum* is a Gram-positive, rod-shaped soil bacterium belonging to the group of mycolic acid-containing actinomycetes. *C. glutamicum* undergoes a v-shaped cell division, which is specific for Mycobacteria. During bacterial cell division, negatively acting factors protect the cell poles and the nucleoid from aberrant division. Most rod-shaped bacteria such as *Escherichia coli* or *Bacillus subtilis* have a dual system to ensure correct division. Cell poles are usually protected by the Min system and nucleoids are protected by DNA-binding proteins that act as FtsZ polymerization inhibitors. Strikingly, the rod-shaped bacterium *C. glutamicum* has no Min system and hence division site selection completely relies on an elaborated nucleoid occlusion system. In bacteria, the Par system is comprised of ParA, ParB and *parS* sites and is involved in chromosome partitioning. Unlike most other organisms, *C. glutamicum* possesses an orphan *parA*<sub>2</sub> gene in addition to the canonical *parAB* operon. In this work it could be shown that the Par System is involved in chromosome protection as well as regulating septum placement in *C. glutamicum*. Up-regulation of both ParA ATPases led to significant cell elongation. Investigation of sub-cellular localization of ParA<sub>1</sub> and ParA<sub>2</sub> showed, that ParA<sub>1</sub> polymers spread all over the nucleoids, while ParA<sub>2</sub> mostly remains at the origin region. ParB and the *oriC* region co-localize forming a centromere-like structure. Furthermore, purified ParB was able to shift a highly conserved *parS* sequence specifically, which could be found three times in vicinity of the *oriC* region in the genome of *C. glutamicum*. Biochemical studies with purified proteins showed that both ParA ATPases have an inhibitory effect on FtsZ polymerization acting as negative regulators of septum placement in *C. glutamicum*. Additionally, ParB increases the ATPase activity of ParA<sub>2</sub> while inhibiting the enzymatic activity of ParA<sub>1</sub> completely. This result indicates that both ATPases have a different function during cell division. Finally, using a bacterial Two-Hybrid system, it was demonstrated that ParA<sub>2</sub> interacts strongly with ParB and another essential cell division protein. Therefore, a model is favoured, where ParA<sub>2</sub> acts as an anchor for the chromosome to the polar region, while ParA<sub>1</sub> is involved in protection and segregation of the chromosomes.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zellteilung in Bakterien.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Chromosomensegregation und Lokalisation der Zellteilungsebene.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Zellteilung und Wachstum in <i>Corynebacterium glutamicum</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>14</b>
<b>II. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Bakterienstämme.....	15
2.1.2 Plasmide.....	21
2.1.3 Oligonukleotide.....	24
<b>2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Nährmedien für <i>E. coli</i> .....	28
2.2.2 Nährmedien für <i>C. glutamicum</i> .....	28
2.2.3 Antibiotika.....	28
2.2.4 Kultivierungsbedingungen.....	29
<b>2.3 Biochemische Techniken.....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Proteinpräparation aus Zellextrakten.....	29
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Lowry.....	30
2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
2.3.4 Färbung mit Coomassie <i>Brilliant Blue</i> .....	31
2.3.5 Immunoblot.....	32
2.3.6 Proteinreinigung.....	33
2.3.7 DNS-Mobilitäts-Assay.....	35
2.3.8 Polymerisations-Assay.....	35
2.3.9 Nachweis der enzymatischen Aktivität von GTP- und ATPasen.....	36
2.3.10 $\beta$ -Galactosidase-Assay.....	36
<b>2.4 Molekularbiologische Techniken.....</b>	<b>37</b>
2.4.1 DNS Techniken.....	37
2.4.1.1 Präparation chromosomaler DNS aus <i>C. glutamicum</i> .....	37
2.4.1.2 Konzentrationsbestimmung der DNS.....	37

2.4.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
2.4.1.4	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNS aus Agarosegelen.....	40
2.4.1.5	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	40
2.4.1.6	Plasmidpräparation aus <i>C. glutamicum</i> .....	41
2.4.1.7	Restriktion und Ligation von Plasmiden und PCR- Fragmenten.....	41
2.4.1.8	Interaktionsstudien mit einem Zwei-Hybrid-System.....	42
2.4.2	RNS Techniken.....	42
2.4.2.1	Präparation von Gesamt-RNS aus <i>C. glutamicum</i> und RNS- Gelelektrophorese.....	42
2.4.2.2	RNS Hybridisierung mittels Slot-Blots.....	43
2.4.2.3	Präparation von RNS-Sonden durch <i>in vitro</i> Transkription.....	45
2.4.2.4	Southern Blot.....	46
<b>2.5</b>	<b>Techniken zur Manipulation von Zellen.....</b>	<b>47</b>
2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	47
2.5.2	Herstellung kompetenter <i>C. glutamicum</i> Zellen.....	48
2.5.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	48
2.5.4	TSS-Transformation von <i>E. coli</i> BL21 Zellen.....	49
2.5.5	Elektroporation von kompetenten <i>C. glutamicum</i> Zellen.....	50
2.5.6	DNS-Transfer mittels Konjugation.....	50
2.5.7	Konstruktion von Insertionsmutanten.....	51
2.5.8	Konstruktion von Deletionsmutanten.....	52
<b>2.6</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>52</b>
2.6.1	Subzelluläre Lokalisation von fluoreszierenden Fusionsproteinen.....	52
2.6.2	Zeitreihenaufnahmen.....	53
2.6.3	Immunofluoreszenz.....	54
2.6.4	Mikroskopie von Proteinpolymeren.....	55
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Überexpression und Lokalisation von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>.....</b>	<b>56</b>
3.1.1	Extrachromosomale Überexpression von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> .....	56
3.1.2	Chromosomale Überexpression von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> .....	59
3.1.3	Subzelluläre Lokalisation von ParA <sub>1</sub> -GFP und ParA <sub>2</sub> -GFP.....	63



<b>3.2</b>	<b>Lokalisation von ParB.....</b>	<b>65</b>
3.2.1	Integration von <i>parB-gfp</i> , <i>parB+60-gfp</i> und <i>parA<sub>1</sub>+100-parB-gfp</i> .....	65
3.2.2	Immunofluoreszenz von ParB in Cg RES 167.....	69
<b>3.3</b>	<b>Lokalisation des <i>oriC</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>3.4</b>	<b>Immunofluoreszenz von FtsZ.....</b>	<b>72</b>
<b>3.5</b>	<b>Mitomycin-Experimente.....</b>	<b>73</b>
<b>3.6</b>	<b>Lokalisation von DivIVA.....</b>	<b>78</b>
<b>3.7</b>	<b>DNS-Mobilitäts-Assays.....</b>	<b>80</b>
3.7.1	DNS-Bindung von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> .....	81
3.7.2	DNS-Bindung von ParB.....	81
<b>3.8</b>	<b>Enzymatische Aktivität von ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und FtsZ.....</b>	<b>83</b>
3.8.1	ATPase Aktivität von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> .....	83
3.8.2	Einfluss von ParB auf die enzymatischen Aktivitäten.....	85
3.8.3	GTPase Aktivität von FtsZ.....	86
<b>3.9</b>	<b>Mikroskopie von Protein-Polymeren.....</b>	<b>88</b>
<b>3.10</b>	<b><i>In vitro</i> Polymerisationsassays.....</b>	<b>93</b>
3.10.1	<i>In vitro</i> Polymerisationsassay mit ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> .....	93
3.10.2	<i>In vitro</i> Polymerisationsassay mit ParA <sub>1</sub> -GFP und ParA <sub>2</sub> -GFP.....	94
<b>3.11</b>	<b>Interaktion der Proteine des Par Systems mit FtsZ und DivIVA.....</b>	<b>96</b>
<b>IV.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
4.1	Zytoskelettelemente und Chromosomensegregation in Bakterien....	101
4.2	Par System in <i>C. glutamicum</i> .....	103
4.3	<i>Nucleoid occlusion</i> durch ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> .....	106
4.4	Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene.....	109
4.5	ParB- <i>parS</i> -Komplex.....	114
4.6	Interaktion des Par Systems mit DivIVA.....	117
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>122</b>
<b>VI.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>124</b>
<b>VII.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>127</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5`-diphosphat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BP	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
IMF	Immunofluoreszenz
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(Morpholino)propansulfonsäure
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
ÜN	über Nacht

# I. Einleitung

## 1.1 Zellteilung in Bakterien

Die Zellteilung ist der elementare Schritt im Lebenszyklus einer Zelle. Sie ist essentiell für Wachstum, Differenzierung und Reproduktion. Während die Zellteilung bei Eukaryoten tiefgreifend erforscht wurde und größtenteils verstanden ist, ist dieser Prozess bei Prokaryoten nur ansatzweise geklärt.

Grundsätzlich durchlaufen alle Zellen während einer Zellteilung das selbe Muster: Replikation der DNS, Orientierung der DNS zu jeweils entgegengesetzt liegenden Polen innerhalb der Zelle und Ausbildung eines Septums, welches die beiden Tochterzellen letztendlich trennt. Unterschiede zwischen Eu- und Prokaryoten begründen unterschiedliche Mechanismen, welche die Zellen während der Teilung durchlaufen müssen. So gliedert sich die Zellteilung bei Eukaryoten in die Zellkernteilung (Mitose) und die Zellplasmateilung (Zytokinese).

Prokaryoten, zu denen die Bakterien und Archaeen zählen, besitzen keinen Zellkern, weshalb hier keine Zellkernteilung stattfindet. Allerdings werden in Bakterien die zuvor replizierten Chromosomen vor der Zellteilung getrennt, indem die Replikationsursprünge der Chromosomen zum jeweiligen entgegengesetzten Zellpol wandern. Der Vorgang der Chromosomensegregation wird auch als bakterielle Mitose bezeichnet. Dabei ist die Orientierung des Chromosoms innerhalb der Zelle durchaus nicht zufällig: Studien haben gezeigt, dass sowohl in *Bacillus subtilis* als auch in *Caulobacter crescentus* die zirkuläre DNS nach Replikation und Segregation wieder dieselbe Lage innerhalb der beiden Tochterzellen einnimmt (Teleman *et al.*, 1998 und Viollier *et al.*, 2004). So liegt der Replikationsursprung (*oriC*) in *C. crescentus* immer an dem Pol, an dem sich die Flagelle ausbildet, während der Terminus am gegenüberliegenden Pol lokalisiert ist. In *Escherischia coli* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich der *oriC* und der Terminus innerhalb der Zelle gegenüberliegen (Wang *et al.*, 2006a; Nielsen *et al.*, 2006), in diesem Fall allerdings in der Zellmitte des stäbchenförmigen Bakteriums. Nach der Trennung des Erbguts erfolgt die Einschnürung der Membran und der Zellwand, welche die Zelle bei vegetativer Teilung in zwei identische Tochterzellen teilt. Während des Prozesses müssen verschiedene Systeme die korrekte Replikation und Verteilung des Erbguts und die richtige Lokalisation des Septums sicherstellen. Die eukaryotischen Zellen sind durch Kompartimentierung in spezielle Bereiche unterteilt. Diese räumliche

Organisation wird zumindest teilweise durch ein Zytoskelett gewährleistet, wohingegen in Prokaryoten lange Zeit keinerlei subzelluläre Organisation entdeckt werden konnte.

Der Fortschritt in der Fluoreszenzmikroskopie und der Zugriff auf komplette Genom-Datenbanken hat zu einem besseren Verständnis der Zellstruktur und -dynamik geführt. Es wurden dadurch bakterielle Homologe zu eukaryotischen Proteinen des Zytoskeletts entdeckt. Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass Bakterien kein Zytoskelett besitzen und damit zusätzlich von den eukaryotischen Zellen unterschieden werden können. Die Entdeckung homologer Proteine in bakteriellen Zellen revolutionierte somit das Verständnis der Organisation der Bakterienzelle. So konnte gezeigt werden, dass Bakterien mit FtsZ ein Tubulinhomolog besitzen (Bi & Lutkenhaus, 1991). Darüber hinaus sind MreB, FtsA und ParM Aktinhomologe (Gerdes *et al.*, 2000), und CreS (Crescentin) scheint ein Homolog der Intermediärfilamente zu sein, welches allerdings bisher nur in *Caulobacter* gefunden werden konnte (Ausmees *et al.*, 2003). Proteine wie Aktin, Tubulin und die Intermediärfilamente spielen in Eukaryoten eine bedeutende Rolle bei Prozessen der Zellteilung wie Mitose und Zytokinese. Demnach könnten diese Zytoskelettelemente auch in den Prokaryoten eine regulatorische und rekrutierende Funktion besitzen. Wie im Folgenden ausgeführt wird, konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie unter anderem auch bei der Zellteilung der Bakterien eine entscheidende Rolle spielen.

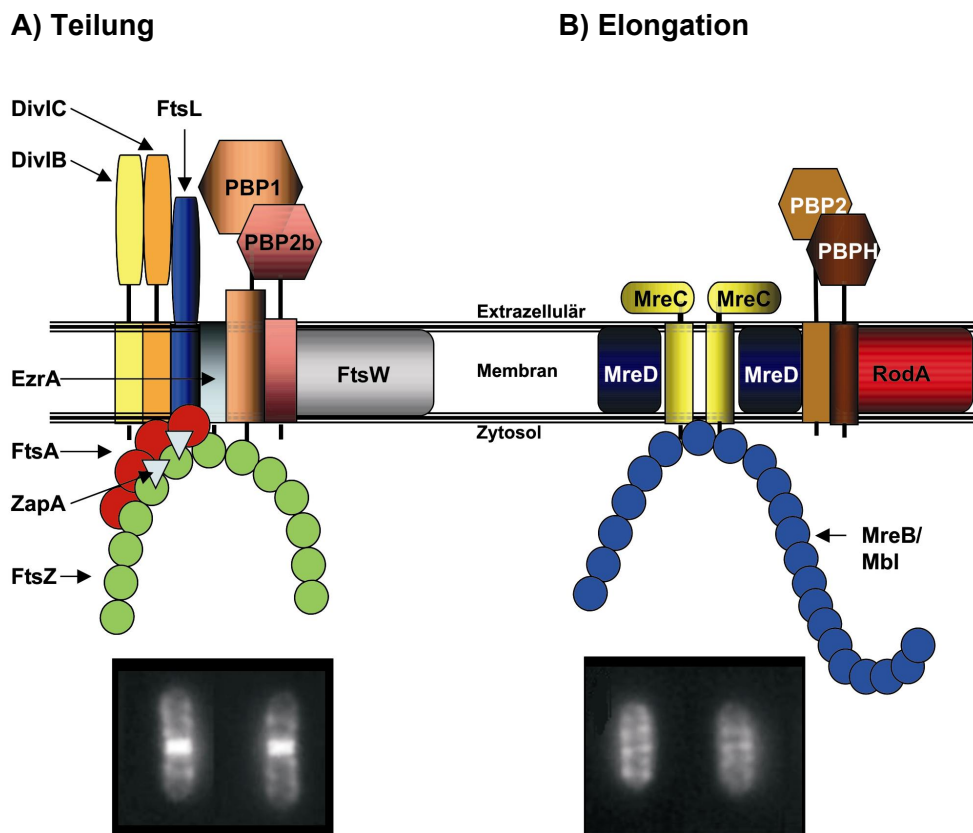
FtsZ ist, wie Tubulin, eine GTPase, die GTP-abhängig Filamente ausbildet, und die in der Dynamik und der Morphologie den Tubulinfilamenten gleich ist (Löwe *et al.*, 2004). Obwohl FtsZ nur eine schwache Sequenzhomologie zu Tubulin besitzt, ist die strukturelle Übereinstimmung zu Tubulin auffällig (Löwe & Amos, 1998). Es ist ein hochkonserviertes Zellteilungsprotein, welches in allen Bakterien und Archaeen gefunden wurde (bis auf wenige Ausnahmen wie *Chlamydia trachomatis* und *Ureaplasma urealyticum* (Dziadek *et al.*, 2002). Zudem ist FtsZ in Chloroplasten und einigen Mitochondrien nachgewiesen worden (Osteryoung & Vierling, 1995; Osteryoung, 2001). FtsZ ist das erste Zellteilungsprotein, das an der zukünftigen Teilungsebene lokalisiert (Bi & Lutkenhaus, 1991) und ist somit das zentrale Protein des zytokinetischen Ringes. Durch Polymerisation in Protofilamente wird der sogenannte Z-Ring ausgebildet, zu dem sich sukzessive weitere Teilungsproteine rekrutieren und die Formation des bakteriellen Zellteilungsapparates, dem

sogenannten Divisom, initiiert. Letztendlich werden die Zellen durch die dortige Zellwandsynthese getrennt. Von den bakteriellen Aktin homologen sind zur Zeit zwei Klassen bekannt: MreB-artige Aktin homologe sind bei vielen Bakterien (z. B. *B. subtilis*) chromosomal kodiert, während ParM-artige Homologe durch einige Plasmide kodiert werden (Gerdes *et al.*, 2000). Aktin, MreB und ParM können *in vivo* und *in vitro* polymerisieren und weisen trotz ihrer geringen Sequenzhomologie eine hochkonservierte Tertiärstruktur auf (van den Ent *et al.*, 2001; 2002). MreB und seine Homologe wie Mbl und MreBH (aus *B. subtilis*) wurden meist in nicht-sphärischen Bakterien gefunden. Sie regulieren die Zellform, indem sie Enzyme wie PBPs (Penicillin-bindende Proteine) lokalisieren oder aktivieren, welche in der Zellwandsynthese involviert sind (Daniel & Errington, 2003). MreB scheint zudem an der Chromosomensegregation bei *E. coli*, *B. subtilis* und *Caulobacter* beteiligt zu sein (Kruse *et al.*, 2003; Soufo & Graumann, 2003; Gitai *et al.*, 2005).

ParM-artige Proteine gehören der zweiten bekannten Klasse von Aktin homologen an. Dabei ist ParM Teil des Par Systems, welches während der Plasmidsegregation eine bedeutende Rolle spielt (Möller-Jensen *et al.*, 2003). Interessanterweise wird die Zytokinese demnach bei Eukaryoten durch den auf Aktin basierenden kontraktilen Ring möglich, während im Gegensatz dazu in Bakterien dafür das Tubulin homolog FtsZ benötigt wird. Die DNS-Segregation in Eukaryoten wird durch den Spindelapparat kontrolliert, welcher aus Tubulin besteht, wohingegen in Bakterien Aktin homologe wie MreB und ParM diese Funktion übernehmen (Gerdes *et al.*, 2004). Diese Umkehrung der Funktionen könnte auf eine konvergente Evolution hinweisen, als eine Funktion der beiden Vorläufer von Tubulin und Aktin noch nicht festgelegt war.

Nach der korrekten Chromosomensegregation und der Lokalisation des Septums wird durch die Zellwandsynthese die eigentliche Zellteilung vollzogen. Zuerst wird der sogenannte Z-Ring ausgebildet, der aus sich zusammenlagernden FtsZ Protofilamenten besteht, welcher durch die Membran-assoziierten Proteine ZipA (in *B. subtilis* ZapA) und FtsA stabilisiert wird (Hale & de Boer 1997; RayChaudhuri, 1999) (Abbildung 1.1). Zusätzlich könnte FtsA durch die, durch ATP Hydrolyse gewonnene Energie, die Konstriktion der Zelle erleichtern. An diesen Komplex bindet FtsK (SpolIIE in *B. subtilis*), das sowohl an der Stabilität des Z-Rings als auch an der Chromosomensegregation beteiligt ist (Bigot *et al.*, 2004). Daraufhin werden, neben

anderen Proteinen, FtsW und FtsI rekrutiert, welche für die Zellwandsynthese am Septum verantwortlich sein sollen (Höltje, 1998).



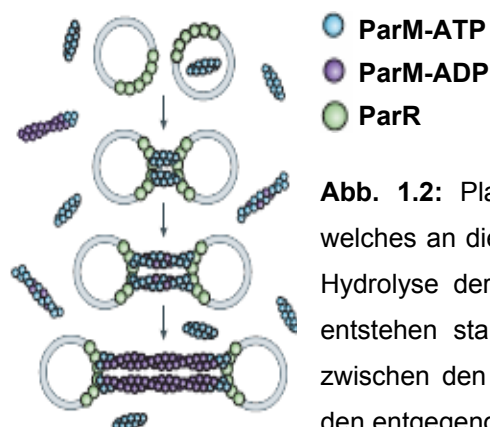
**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des Makromolekül-Komplexes für die septale und laterale Zellwandsynthese in *B. subtilis*. A) Teilung: Während der Zellteilung interagiert FtsZ mit mehreren Membranproteinen, die Septum-spezifische PBP's rekrutieren und das Divisom ausbilden. B) Elongation: Bei der Zellstreckung interagiert MreB bzw. Mbl (in *B. subtilis*) mit den Membranproteinen MreC und MreD, welche wiederum mit Zellwandsynthesepoteinen (PBP2) interagieren. Unten: Mikroskopische Aufnahmen einer Van-FL Markierung der aktiven Zellwandsynthese am Septum und helikal an der Zellwand entlang (Daniel & Errington, 2003).

Die Zellwände von Bakterien bestehen aus Peptidoglykan (Murein), die aus zwei Zuckerderivaten, N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure sowie einer kleinen Gruppe von Aminosäuren, die häufig aus L-Alanin, D-Alanin, D-Glutamin und entweder Lysin oder Diaminopimelinsäure bestehen. Die aus den Zuckern gebildeten Glykanschichten werden über Peptidquervernetzungen der Aminosäuren verbunden. Diese Peptidquervernetzung kommt durch die Ligierung von D-Alanin mit Lysin bzw. Diaminopimelinsäure zustande. Um die Regionen der Zellwandneusynthese in Zellen sichtbar zu machen, werden deshalb fluoreszenzmarkierte Antibiotika wie Vancomycin eingesetzt, welche diese Ligierung durch Bindung an das D-Ala – D-Ala

Ende des Stammpeptids eine Transpeptidierung verhindern und somit diese Regionen markieren (Daniel & Errington, 2003). Über die genauen molekularen Details der Zellwandsynthese ist nicht sehr viel bekannt. Bekannt ist, dass verschiedene PBPs für die Peptidoglykansynthese - durch Transglukosilierung und Transpeptidierung - zuständig sind. Da PBPs Komplexe mit Aktin homologen wie zum Beispiel MreB bilden, nimmt man an, dass durch die helikale Strukturen von MreB das „Gerüst“ für die Lokalisation der PBPs gewährleistet wird (Figge *et al.*, 2005). Letztendlich werden zum späten Septum Peptidoglykan-abbauende Enzyme (z. B. AmiC und EnvC) rekrutiert, welche durch Hydrolyse die Trennung der beiden Tochterzellen übernehmen (Bernhardt & de Boer, 2003 und 2004).

## 1.2 Chromosomensegregation und Lokalisation der Zellteilungsebene

Neben der eigentlichen Zellteilung ist die korrekte Aufteilung des replizierten Erbguts auf die entstehenden Tochterzellen unerlässlich. Es hat sich herausgestellt, dass das Par System (*partitioning*) in Bakterien eine bedeutende Rolle während der Chromosomensegregation spielt. Dieses System wurde zuerst bei Plasmiden entdeckt, bei denen es für die Aufteilung der Plasmide in beide Tochterzellen verantwortlich ist (Gerdes *et al.*, 2004). So besteht das plasmidkodierte Par System des Plasmids R1 in *E. coli* aus drei Komponenten: dem Protein ParR, welches spezifisch an die *parC* Sequenzen auf dem Plasmid bindet und der ATPase ParM. Sobald ParR an die *parC* Sequenzen bindet, wird ParM rekrutiert und verteilt durch Polymerisation zwischen den beiden Plasmiden die Plasmide zu den entgegengesetzten Polen der Zelle (Möller-Jensen *et al.*, 2003) (Abbildung 1.2).



**Abb. 1.2:** Plasmidsegregation durch ParM. ParM bindet an ParR, welches an die *parC* Domänen auf dem Plasmid gebunden hat. Durch Hydrolyse der sich an diesen Komplex anlagernden ParM Moleküle entstehen stabile Filamente. Die Verlängerung der ParM Filamente zwischen den Plasmiden führt zu einer Segregation der Plasmide zu den entgegengesetzten Zellpolen (Thanbichler & Shapiro, 2007).

Auch das chromosomale Par System besteht aus drei Komponenten (Funnell, 2005; Ebersbach & Gerdes, 2005; Leonard *et al.*, 2005): ein oder mehrere *cis*-agierende DNS-Sequenzen (*parS*), welche beidseitig nahe der *oriC* Region des Chromosoms liegen und kurze Sequenzen mit invertierten *repeats* darstellen (Jakimowicz *et al.*, 2002), einer ATPase (ParA oder Soj in *B. subtilis*) und einem DNS-bindenden Protein (ParB oder Spo0J in *B. subtilis*), welches spezifisch an die *parS* Sequenzen als Di- oder Oligomer anlagert (Schumacher & Funnell, 2005). Diese Bindung rekrutiert und aktiviert die ATPase, wodurch die *oriC* Region bei der Replikation des bakteriellen Chromosoms die Funktion des eukaryotischen Zentromers übernimmt. Die beiden Gene *parA* und *parB* liegen immer zusammen auf dem Chromosom und bilden das *parAB* Operon.

Es wurden drei verschiedene Teilungssysteme identifiziert: Typ I sind ATPasen mit einem Walker-Box Bindemotiv (ParA). Typ II ATPasen (ParM) sind strukturell dem eukaryotischen Aktin verwandt (Gerdes *et al.*, 2000) und schließlich Typ III mit tubulinhomologen ATPasen (TubZ). TubZ ist an der Plasmidstabilisierung und -segregation in *B. thuringiensis* beteiligt, konnte aber noch nicht näher charakterisiert werden (Chen & Erickson, 2007b). Typ I ATPasen, welche am häufigsten vorkommen, sind weiterhin in Typ Ia und Typ Ib unterteilt. Typ Ia ATPasen interagieren spezifisch mit dem *par*-Lokus und reprimieren diesen. Typ Ib ATPasen binden unspezifisch an DNS (Funnell, 2005; Ebersbach & Gerdes, 2005; Leonard *et al.*, 2005). Der Mechanismus, durch welchen Typ I ATPasen ihre Funktion während der Segregation wahrnehmen, ist noch nicht bekannt. Typ II ATPasen scheinen für die Plasmidsegregation verantwortlich zu sein, indem sie die Plasmide zu den jeweiligen Polen „drücken“ (Möller-Jensen *et al.*, 2003). Einige Proteine des Typ I scheinen zu oszillieren, die Funktion der Oszillation ist allerdings nicht klar (Ebersbach & Gerdes, 2001). Kürzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ParA radiale Filamente ausbildete, nachdem es an ParB-DNS gebunden hatte (Lim *et al.*, 2005). ParB Proteine werden in drei Familien getrennt: Typ I- und Typ II-ParB binden an *parS* Sequenz auf der DNS mit einem *helix-turn-helix* Motiv und verteilen sich um diese Domäne. ParB Proteine vom Typ III interagieren mit ATPasen vom Typ Ib und binden an die *parS* Regionen mit einem *ribbon-helix-helix* Motiv. In diesem Fall gibt es ein bis mehrere *parS* Sequenzen, welche die Zentromer-Region ausmachen (Funnell, 2005; Ebersbach & Gerdes, 2005; Leonard *et al.*, 2005; Hayes & Barilla, 2006).



Während der Chromosomensegregation scheint das Verhältnis von ParA zu ParB für eine korrekte Teilung von Bedeutung zu sein. So führte die Deletion von *parB* zu filamentösen Zellen in *C. crescentus*. Der identische Phänotyp wurde bei einer Überexpression von ParA beobachtet (Mohl *et al.*, 2001). In beiden Fällen bildeten die Zellen keinen Z-Ring aus. Die Par Proteine sind in *B. subtilis* nicht essentiell, haben aber Auswirkungen auf die Chromosomensegregation (Ireton *et al.*, 1994). So hatten Spo0J Deletionsmutanten (ParB) eine signifikant höhere Anzahl an Minizellen. Zudem sind Soj (ParA) und Spo0J in *B. subtilis* an der Initiation der Sporulation beteiligt. In *C. crescentus* sind die Par Proteine essentiell und Überexpressionen und Verminderung der Expression von ParA und ParB führen zu Defekten in Zellwachstum, Zellteilung und Chromosomensegregation (Mohl *et al.*, 2001). Damit scheinen in *C. crescentus* ParA und ParB Einfluss auf die Zellteilung und auf die Chromosomensegregation zu haben.

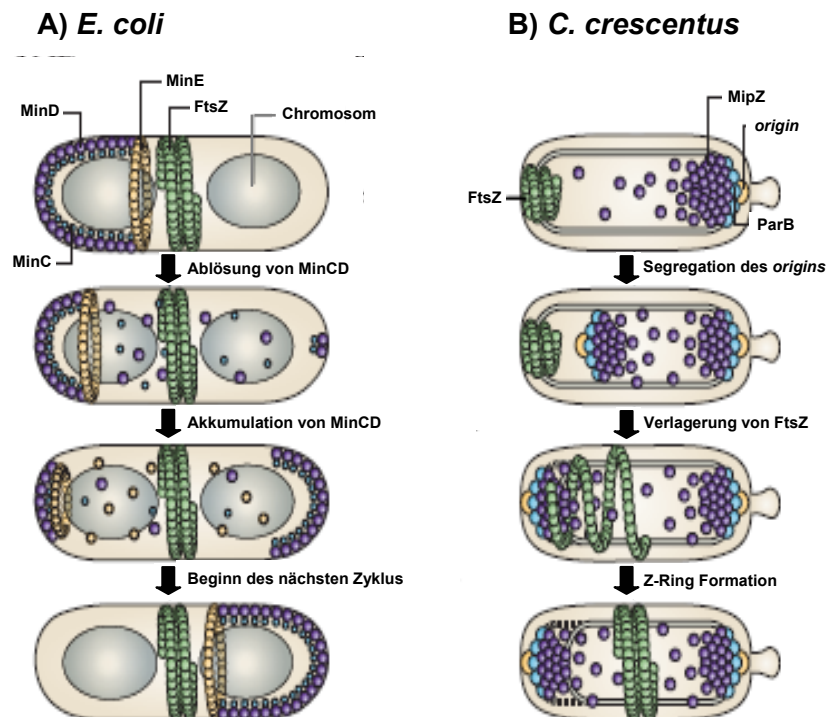
Die Chromosomen bewegen sich während der Segregation aktiv, wobei die molekularen Mechanismen für eine solche Bewegung noch nicht geklärt sind. Es wird diskutiert, ob in *B. subtilis* die DNS Polymerase für die bidirektionale Bewegung der replizierten Chromosomen verantwortlich ist oder ob das MreB-„Gerüst“ durch Polymerisation diese Aufgabe übernimmt (Lemon & Grossman, 2000; Soufo & Graumann, 2003). Die Polymerase würde in diesem Fall in der Mitte der Zelle verharren und während der Replikation die Chromosomen zu den entgegengesetzten Polen „drücken“ (Lemon & Grossman, 2000). Die Verankerung der DNS an den Polen erfolgt, zumindest während der Sporulation, durch RacA. RacA bindet an DivIVA, das an den Polen lokalisiert ist (Thomaidis *et al.*, 2001). In *C. crescentus* hingegen befindet sich die DNS am alten Pol und erst nach der Replikation wandert eine Kopie zum neuen Pol (Jensen *et al.*, 2001). Das Chromosom wird in *C. crescentus* durch das Protein PopZ an den Zellpolen verankert (Bowman *et al.*, 2008; Ebersbach *et al.*, 2008). Dabei interagiert PopZ direkt mit dem ParB-*parS*-Komplex und akkumuliert dadurch an den Polen. Es wird dort MreB-abhängig gehalten oder gelöst. In *Vibrio cholerae* wurde eine weitere Variante entdeckt: die *origins* des Chromosoms I sind durch ParA an den Zellpolen verankert, indem ParA an den ParB-DNS-Komplex und an ein bisher unbekanntes Protein der Zellpolmembran bindet. Nach der Replikation bleibt eine Kopie an dem alten Pol verankert und die zweite Kopie wird durch ParA Filamente, welche vom neuen Pol ausgebildet werden, mit dem neuen Pol verbunden. Durch

Depolymerisation dieser ParA Filamente wird die zweite Kopie zum neuen Pol gezogen (Fogel & Waldor, 2006). Allerdings konnte dieser Mechanismus nur für eines der beiden Chromosome in *V. cholerae* beobachtet werden.

Nach der Aufteilung der DNS kann sich zwischen den segregierten Chromosomen das Teilungsseptum ausbilden. Die Lokalisation der Zellteilungsebene wird hauptsächlich durch zwei verschiedene Mechanismen reguliert, dem Min und dem *nucleoid occlusion* System. Das Min System wurde zuerst in *E. coli* entdeckt und es konnte nachgewiesen werden, dass es die FtsZ Polymerisation inhibiert (De Boer *et al.*, 1989) (Abbildung 1.3). Das Min System besteht aus drei Proteinen, die zusammen die Septumbildung an den Polen inhibieren (Rothfield *et al.*, 2005). Die Hauptkomponenten des Min Systems sind MinC und MinD, die Dimere ausbilden und an die Zellmembran binden. MinC agiert als Inhibitor der FtsZ Polymerisation (Hu *et al.*, 1999), indem es die laterale Assemblierung der FtsZ Protofilamente verhindert (Dajkovic *et al.*, 2008b), während MinD ATP-abhängig für die Membranbindung verantwortlich ist (Hu & Lutkenhaus, 2001; Suefuji *et al.*, 2002). Der MinCD-Komplex interagiert mit einem dritten Protein, das in Gram-negativen Bakterien MinE darstellt und in Gram-positiven DivIVA (Rothfield *et al.*, 2005). DivIVA ist an den Polen lokalisiert und verankert dort MinCD statisch (Edwards & Errington, 1997; Marston *et al.*, 1998). MinE hingegen ist für die Oszillation von MinCD von Pol zu Pol verantwortlich (Raskin & de Boer, 1999). Durch die Oszillation von MinCD bzw. deren statische Verankerung an die Pole durch DivIVA, hat die Bildung eines Konzentrationsgradienten von MinCD, mit der höchsten Konzentration an den Polen, zur Folge (Meinhardt & de Boer, 2001). So fällt die Konzentration von MinCD durch zelluläres Längenwachstum in der Mitte der Zellen unter einen bestimmten Schwellenwert, so dass dort FtsZ polymerisieren kann. Zusätzlich interagiert DivIVA mit der Maschinerie der Chromosomensegregation und spielt eine wesentliche Rolle bei der korrekten Lokalisation der *oriC* Region zu den Zellpolen während der Sporulation in *B. subtilis* (Errington, 2001).

Neben dem Min System, welches durch einen Konzentrationsgradienten die FtsZ Polymerisation in der Mitte der Zellen gewährleistet, gibt es Proteine, welche das Erbgut selbst gegen eine fatale Septumbildung schützen. Sie gehören dem sogenannten *nucleoid occlusion* System an. So wurden in *B. subtilis* das Protein Noc (Wu & Errington, 2004) und in *E. coli* SlmA (Bernhardt & de Boer, 2005) identifiziert, welche einander allerdings nicht ähnlich sind. In Zellen bilden sich Septen auch über

den Chromosomen aus, wenn Noc bzw. SlmA deletiert sind. Allerdings ist dieser Phänotyp von einem fehlerhaften Min System abhängig.



**Abb. 1.3:** Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene in *E. coli* (A) und *C. crescentus* (B). In *E. coli* erfolgt die Regulation durch das Min System. Durch Oszillation des MinCDE-Komplexes von Pol zu Pol, welcher die Polymerisation von FtsZ inhibiert, entsteht ein Konzentrationsgradient dieser Proteine innerhalb der Zelle. Dadurch bedingt kann FtsZ nur in der Mitte der Zelle die Septumformation initiieren. In *C. crescentus* wird die Lokalisation der Zellteilungsebene durch die Walker ATPase MipZ reguliert. MipZ, ein Inhibitor der FtsZ Polymerisation, bindet an den ParB-*parS*-Komplex. Durch Segregation der Replikationsursprünge bildet sich ein Konzentrationsgradient von MipZ mit der höchsten Konzentration an den ParB-*parS*-Komplex und damit an den Polen. FtsZ verlagert sich von dem, dem Flagellum gegenüberliegenden Pol zur Mitte der Zellen, wo es den Z-Ring ausbildet (Thanbichler & Shapiro, 2007).

Die Proteine zeigen lediglich einen schwachen Einfluss auf die Lokalisation von FtsZ, wenn das Min System funktional ist. Die Funktionsweise der beiden Proteine ist noch unklar. Beide besitzen ein *helix-turn-helix* Motiv, wodurch sie unspezifisch an DNS binden können. Es besteht die Theorie, dass die beiden *nucleoid occlusion* Proteine mit FtsZ Filamenten interagieren und um die Bindung von FtsA und ähnlichen Proteinen konkurrieren, welche FtsZ Polymere stabilisieren. Allerdings existieren Bakterien, die weder das Min System noch Proteine des *nucleoid occlusion* besitzen. Da auch diese sich zwischen den replizierten Chromosomen teilen und eine korrekte

Chromosomensegregation aufweisen, muss es alternative Mechanismen geben. So wurde in *C. crescentus* MipZ, eine zu ParA homologe ATPase beschrieben, welche direkt mit ParB interagiert (Thanbichler & Shapiro, 2006). MipZ inhibiert die FtsZ Polymerisation und wird mit dem ParB-*parS*-Komplex an die Zellpole positioniert (Abbildung 1.3). Nach der Replikation und Segregation ist die niedrigste MipZ-Konzentration in der Mitte der Zelle, wo FtsZ den Z-Ring formen kann.

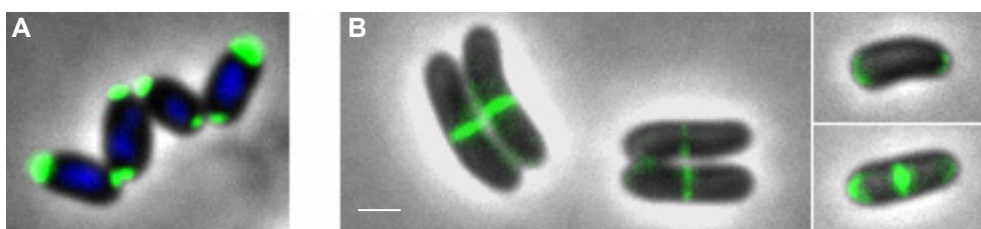
### **1.3 Zellteilung und Wachstum in *Corynebacterium glutamicum***

*Corynebacterium glutamicum* ist ein Gram-positives, nichtsporulierendes, apathogenes Bodenbakterium, welches zu den Actinomyceten gehört. Neben einer großen biotechnologischen Bedeutung (Park *et al.*, 1997), hat dieses Bakterium nahe Verwandtschaft mit humanpathogenen Bakterien (*C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*), weshalb es sich als Modellorganismus etabliert hat. Als namensgebendes Mitglied der *Corynebacteriaceae* besitzt es eine einzigartige Zellwandzusammensetzung. Der Mureinsacculus ist kovalent mit einer Arabinogalaktanschicht verbunden, über der eine Schicht an Mykolsäuren und freien Lipiden liegt. Während der Zellteilung durchläuft es eine für Coryneforme typische V-förmige Zellteilung (Abbildung 1.4). Es wird vermutet, dass diese V-Form dadurch zustande kommt, dass das Septum hauptsächlich aus der Plasmamembran und Peptidoglykan besteht. Während der Konstriktion des Z-Rings, bleiben die äußeren Arabinogalaktanschicht und die Mykolsäuren zunächst unverändert. Auch während der enzymatischen Peptidoglykan-Hydrolyse ist dieser äußere Zellwandteil vorerst nicht betroffen. Die V-Form sollte dann durch ungleiches Aufreißen der äußeren Zellwandschichten zustande kommen (Thanky *et al.*, 2007). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von sich teilenden *C. glutamicum* Zellen zeigten allerdings, dass die beiden Tochterzellen durch eine bisher unbekannte Komponente auf der Oberfläche des Bakteriums zusammengehalten werden (Letek *et al.*, 2008b), weshalb diese besondere Teilung beobachtet werden kann.

Gene, welche für den gesamten Zellteilungsprozeß in Bakterien kodieren, sind in dem sogenannten *dcw cluster* (division cell wall) hochkonserviert lokalisiert. Ein Vergleich dieser Genregionen von verschiedenen Bakterien zeigte, dass *C. glutamicum* wichtige Gene anderer Bakterien fehlen (Letek *et al.*, 2008a). So besitzt *C. glutamicum* weder *ftsA*, noch konnten positive (*zipA* oder *zapA*) oder negative (*minCD*, *noc*, *slmA*) Regulatoren der FtsZ Polymerisation gefunden werden

(Letek *et al.*, 2007; eigene unpublizierte Ergebnisse). Veränderungen oder Überexpressionen dieser Gene in *E. coli* führten aber zu dem Schluß, dass viele dieser Gene redundant sind (Geissler & Margolin, 2005; Bernard *et al.*, 2007). Es ist möglich, dass *C. glutamicum* eine reduzierte Version dieses *dcw clusters* besitzt. Dafür spräche auch, dass diese Gene in *C. glutamicum* nicht deletiert werden können, also keine Redundanz vorliegt. Allerdings konnte das *ftsEX* Operon identifiziert werden, welches auch in *M. tuberculosis* vorhanden ist und für einen ABC Transporter kodiert (Mir *et al.*, 2006). In *E. coli* spielt dieser Transporter während der Zellteilung zur Erhaltung des osmotischen Drucks beim Aufbau der Zellwand eine Rolle (Schmidt *et al.*, 2004; Reddy, 2007). Zudem könnte FtsW in *C. glutamicum* als positiver Regulator der FtsZ Polymerisation agieren. In *M. tuberculosis* stabilisiert FtsW den Z-Ring (Datta *et al.*, 2006).

Ein besonders interessantes Merkmal der *Corynebacterianae* ist das vollständige Fehlen von Aktin homologen wie MreB oder FtsA. So kann *C. glutamicum* auch ohne Gegenwart des MreB-Gerüsts eine Stäbchenform erlangen. Im Gegensatz zu *B. subtilis* oder *E. coli* wächst *C. glutamicum* auch nur an den Polen (Daniel & Errington, 2003; eigene unpublizierte Ergebnisse) (Abbildung 1.4). Während des Längenwachstums bildet sich an den Polen ein Komplex von DivIVA, RodA und den beiden Zellwand-synthetisierenden PBPs PBP1a und PBP1b. Dahingegen besteht das Divisom am Septum hauptsächlich aus FtsZ, FtsEX, FtsW und FtsI (Letek *et al.*, 2008a). Inwiefern diese Maschinerie die Stäbchenform gewährleistet, ist unklar.



**Abb. 1.4:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *C. glutamicum*. *C. glutamicum*, als Vertreter der *Corynebacterianae*, durchläuft eine typische V-förmige Zellteilung (A). Diese Art der Teilung kommt wahrscheinlich durch die zusätzliche Mykolschicht in der Zellwand zustande. So reißt die Zellwand nach Konstriktion der Zellmembran erst auf einer Seite, so dass die sich teilenden Zellen zu einer V-Form „umschnappen“. *C. glutamicum* wächst zudem ausschließlich an den Zellpolen und am Septum (B). Durch fluoreszenz-markiertes Vancomycin konnte die Lokalisation der Zellwandsynthese detektiert werden. Damit kann *C. glutamicum* trotz fehlender lateraler Zellwandsynthese seine Stäbchenform bewahren. Maßstab = 1 µm.

*C. glutamicum* besitzt kein Min System, welches bei anderen stäbchenförmigen Bakterien an der korrekten Lokalisation des Septums beteiligt ist. Zudem zeigten mikroskopische Aufnahmen, dass sich *C. glutamicum* Zellen nicht immer exakt in der Mitte teilen. Proteine, welche am Chromosomenschutz beteiligt sind (Noc, SImA), konnten in *C. glutamicum* bisher nicht identifiziert werden. Somit stellt sich die Frage, wie dieser Organismus die korrekte Lokalisation des Septums reguliert und den Schutz des Chromosoms gewährleistet. Über die Chromosomensegregation in *C. glutamicum* ist bisher nichts bekannt. *C. glutamicum* besitzt allerdings ein chromosomal kodiertes Par System, welchem in jüngeren Untersuchungen in *C. crescentus* ein Einfluss auf die Platzierung der Teilungsebene zugeschrieben wurde (Wang *et al.*, 2006b). In *C. glutamicum* besteht das Par System aus zwei Typ I ATPasen mit einem Walker-Box Bindemotiv (ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>) und ParB. *ParA*<sub>1</sub> (*cg3427*) und *parB* (*cg3426*) bilden das *parA*<sub>1</sub>*B* Operon, welches 3,5 kBP links der *oriC* Region liegt und eine Leserichtung gegen den Uhrzeigersinn vorweist. 60 BP trennen die beiden Gene innerhalb des Operons, weshalb auf dem Genom von *C. glutamicum* eine zusätzliche Promotorsequenz für *parB* kodiert sein könnte. In *Mycobacterium bovis* konnten in diesem Bereich putative Promotorsequenzen identifiziert werden (Casart *et al.*, 2008). ParA<sub>2</sub> (*cg1610*) ist auf dem, dem *parA*<sub>1</sub>*B* Operon gegenüberliegenden Teil des Chromosoms, lokalisiert. Ob ParA<sub>2</sub> die Funktion einer ParA ATPase übernimmt, ist noch nicht bekannt. Auch die *parS* Domänen dieses Systems sind in *C. glutamicum* noch nicht identifiziert worden.

Bekannt ist, dass DivIVA an einer korrekten Lokalisation des Z-Rings und der Chromosomentrennung in *C. glutamicum* beteiligt ist (Letek *et al.*, 2006). DivIVA ist an den Zellpolen und am späten Teilungsseptum, welches den neuen Pol darstellt, lokalisiert. An den Polen bildet DivIVA das „Gerüst“ für die Zellwand-synthetisierenden PBPs und ist daher am apikalen Wachstum beteiligt. Man vermutet, dass das ausschließlich apikale Wachstum in *C. glutamicum* durch das fehlende MreB-Gerüst erklärbar ist, welches in *Caulobacter* durch seine helikale Struktur lateral Peptidoglykan-synthetisierende Proteine rekrutiert (Figge *et al.*, 2005). DivIVA könnte an den Polen die Aufgabe der Rekrutierung übernehmen, da eine Reduzierung der Expression dieses Proteins zu einer kokkoiden Zellform führt (Letek *et al.*, 2006). Eine Deletion von DivIVA ist nicht möglich (Ramos *et al.*, 2003). Die Überproduktion von DivIVA hat größere, flaschenförmige Zellen zur Folge (Ramos *et al.*, 2003). DivIVA scheint an den letzten Schritten der Zellteilung beteiligt

zu sein, da es sich an das späte Septum anlagert und während der gesamten Teilung dort verweilt. Weiterhin scheint das Verhältnis von DivIVA zu FtsI (PBP3) Einfluss auf die Morphologie von *C. glutamicum* zu haben. FtsI ist ein Penicillin-bindendes Protein, das an der Peptidoglykansynthese am Septum beteiligt ist (Letek *et al.*, 2006). FtsI ist im *dcw cluster* lokalisiert und eine reduzierte Expression von FtsI führt zu größeren, filamentösen Zellen (Valbuena *et al.*, 2006). Zudem interagiert DivIVA mit PBP1a, welches an der polaren Zellwandsynthese beteiligt ist (Valbuena *et al.*, 2007). Die beiden PBPs PBP1a und PBP1b könnten somit für den Erhalt der Stäbchenform in *C. glutamicum* verantwortlich sein. Durch Deletion der beiden PBPs verliert das Bakterium seine längliche Morphologie (Valbuena *et al.*, 2007). Beide interagieren auch mit RodA, welches essentiell für das Längenwachstum von *C. glutamicum* ist (Letek *et al.*, 2008a).

DivIVA könnte neben der Rekrutierung des Zellwandsyntheseapparates auch eine Rolle bei der Chromosomensegregation spielen, wie es in anderen Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *Enterococcus faecalis* oder *B. subtilis*, gezeigt werden konnte (Ramirez-Arcos *et al.*, 2005; Thomaidis *et al.*, 2001). Im Rahmen einer Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass DivIVA durch eine Serin/Threonin Kinase (PknA) phosphoryliert werden kann (Elouelji-El'Kemiri, 2008). Inwiefern diese Phosphorylierung Einfluss auf die Funktionalität des Proteins hat, ist nicht bekannt. Die Phosphorylierung hatte aber keinerlei Auswirkung auf die Lokalisation von DivIVA. Allerdings konnte in *M. tuberculosis* nachgewiesen werden, dass die beiden Serin/Threonin Kinasen PknA und PknB das Zellwachstum (Kang *et al.*, 2005) und die Zellteilung (Dasgupta *et al.*, 2006) regulieren. Serin/Threonin Kinasen besitzen in eukaryotischen Zellen eine essentielle Aufgabe bei der Signalweiterleitung und Regulation. Die Funktion der meisten bakteriellen Serin/Threonin Kinasen ist noch nicht bekannt, aber sie erfüllen vermutlich eine ähnlich wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung und Regulation wie in Eukaryoten. In *C. glutamicum* existieren vier Serin/Threonin Kinasen: PknA (*cg0059*), PknB (*cg0057*), PknG (*cg3046*) und PknL (*cg2388*). PknG ist ein lösliches Protein, während die drei anderen vermutlich Membranproteine darstellen. Zusätzlich konnte eine spezifische Serin/Threonin Phosphatase identifiziert werden (*ppp*, *cg0062*) (Kalinowski *et al.*, 2003). Für PknG konnte - neben DivIVA für PknA - in *C. glutamicum* ein Substrat identifiziert werden (Niebisch *et al.*, 2006). So wurde PknG als phosphorylierender Regulator der 2-Oxoglutarat Dehydrogenase

beschrieben, indem es Odhl phosphoryliert. Weitere Substrate der Serin/Threonin Kinasen in *C. glutamicum* wurden bisher noch nicht identifiziert. Aufgrund der genetischen Anordnung und Beteiligung der Serin/Threonin Kinasen PknA, PknB, PknG und PknL an der Zellform und Zellteilung in *M. tuberculosis* kann vermutet werden, dass diese Kinasen auch in *C. glutamicum* regulatorische Funktionen für Zellteilung und Wachstum übernehmen können.

### **1.4 Ziele der Arbeit**

Zellteilungsmechanismen sind im Wesentlichen in den stäbchenförmigen Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* untersucht worden. Für andere Organismen sind die molekularen Details der Zellteilung noch weitgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher Mechanismen der Zellteilung von *C. glutamicum* analysiert werden. Aufgrund des Fehlens des Min Systems sowie weiterer Proteine, welche in Chromosomenschutz, -segregation und Lokalisation der Zellteilungsebene involviert sind, sollte insbesondere das Par System in *C. glutamicum* untersucht werden. Es sollten Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen (GFP, CFP, YFP) konstruiert werden, um *in vivo* die subzelluläre Lokalisation der Par Proteine ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und ParB und auch FtsZ und DivIVA fluoreszenzmikroskopisch zu dokumentieren. Weiterhin sollten Auswirkungen von Deletionen und Überexpressionen dieser Proteine auf die Zellmorphologie und das Wachstum in *C. glutamicum* analysiert werden. Einen weiteren Aspekt dieser Arbeit stellte die Beschreibung der bisher unbekanntenen Funktion von ParA<sub>2</sub> dar. Zudem sollten mögliche *parS* Sequenzen auf dem Genom von *C. glutamicum* identifiziert werden, an welche ParB spezifisch bindet. Um mögliche Interaktionen von diesen Proteinen *in vitro* aufzeigen zu können, sollten die beteiligten Proteine funktional gereinigt werden. Die Funktionalität der gereinigten Proteine sollte durch verschiedene Assays (ATP-/GTPase Assay, DNS-Mobilitäts-Assays, Polymerisation) nachgewiesen werden. Eine Interaktion der Proteine ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub>, ParB, FtsZ und DivIVA sollte *in vitro* analysiert werden, um einen möglichen Mechanismus *in vivo* aufzuzeigen, der sich mit der Lokalisation der Proteine innerhalb der Zellen deckt. Letztendlich sollte ein Modell der Mechanismen der Chromosomensegregation und der Lokalisation der Zellteilungsebene in *C. glutamicum* erstellt werden.



## II. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Die Tabelle 2.1 gibt die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum* und *E. coli* Stämme sowie relevante Phäno- und Genotypen wieder.

**Tab. 2.1:** Verwendete *C. glutamicum* und *E. coli* Stämme und ihre Eigenschaften (Ap<sup>R</sup>, Resistenz gegen Ampicillin; Cm<sup>R</sup>, Resistenz gegen Chloramphenicol; Km<sup>R</sup>, Resistenz gegen Kanamycin; Tc<sup>R</sup>, Resistenz gegen Tetracyclin; Nx<sup>R</sup>, Resistenz gegen Nalidixinsäure; Sp<sup>R</sup>, Resistenz gegen Spectinomycin).

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Quelle
<i>C. glutamicum</i> RES 167	Restriktionsdefiziente Mutante von Wildtyp ATCC 13032 $\Delta(cgIIIM-cgIIIR-cgIIIR)$	Tauch <i>et al.</i> , 2002
Cg AS1	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parA</i> <sub>1</sub> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS2	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parA</i> <sub>1</sub> mit putativer Promotorsequenz, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS3	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS4	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i> mit putativer Promotorsequenz von <i>parA</i> <sub>1</sub> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS5	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parA</i> <sub>2</sub> - <i>gfp</i> mit putativer Promotorsequenz von <i>parA</i> <sub>2</sub> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS6	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parB</i> - <i>gfp</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS7	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parB</i> - <i>gfp</i> mit putativer Promotorsequenz von <i>parB</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS8	Cg RES 167 mit Insertion von <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>parB</i> - <i>gfp</i> mit putativer Promotorsequenz von <i>parA</i> <sub>1</sub> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit

Cg AS9	Cg RES 167 mit Insertion von <i>divIVA</i> mit putativer Promotorsequenz von <i>divIVA</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS10	Cg RES 167 mit Insertion von <i>tetR</i> -Kassetten zwischen cg002 und cg004. Extrachromosomale Expression von YFP-TetR, IPTG induzierbar, Km <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS11	Cg RES 167 mit Insertion von <i>ftsZ-gfp</i> , Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg AS12	Cg RES 167 mit Insertion von <i>ftsZ-gfp</i> mit putativer Promotorsequenz, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg 4711	Cg RES 167 mit Expressionsvektor pEKEX2 mit <i>gfp</i> -Insertion, IPTG induzierbar, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg RES / pEKEx2- <i>parA</i> <sub>1</sub>	Cg RES 167 mit Expressionsvektor pEKEX2 mit <i>parA</i> <sub>1</sub> Insertion, IPTG induzierbar, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg RES / pEKEx2- <i>parA</i> <sub>2</sub>	Cg RES 167 mit Expressionsvektor pEKEX2 mit <i>parA</i> <sub>2</sub> Insertion, IPTG induzierbar, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
Cg RES / pEKEx2- <i>parB</i>	Cg RES 167 mit Expressionsvektor pEKEX2 mit <i>parB</i> Insertion, IPTG induzierbar, Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α mcr	<i>endA1 subE44 thi-1 ᾱ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nx<sup>R</sup>) endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>-</sup>) relA1 supE44 recA1</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> S17-1	res-, Pro, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLysS	<i>FompT gal [dcm] [lon] hsdSB [r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>]; pLysS, Cm<sup>R</sup></i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>parA</i> <sub>1</sub>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von ParA <sub>1</sub> von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von ParA <sub>1</sub> -GFP von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>parA</i> <sub>2</sub>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von ParA <sub>2</sub> von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>parA</i> <sub>2</sub> - <i>gfp</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von ParA <sub>2</sub> -GFP von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit

<i>E. coli</i> BL21(DE3)-parB	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von ParB von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-ftsZ	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von FtsZ von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-divIVA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) für IPTG-induzierbare Überexpression von DivIVA von pET-16B-Vektor, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , pLysS	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101	Tn9 Cm <sup>R</sup> for selection of F'-plasmid, JL1434 lambda-lysogen with <i>lexA</i> operator (wt/wt) <i>sulA</i> -promoter- <i>lacZ</i> fusion, JL1434= <i>lexA71::Tn5(Def)sulA211 ΔlacU169</i> , F'[ <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZΔM15::Tn9</i> ]	Dmitrova <i>et al.</i> , 1998
<i>E. coli</i> SU202	Tn9 Cm <sup>R</sup> for selection of F'-plasmid, JL1434 lambda-lysogen with <i>lexA</i> operator (408/wt) <i>sulA</i> -promoter- <i>lacZ</i> fusion, JL1434= <i>lexA71::Tn5(Def)sulA211 ΔlacU169</i> , F'[ <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZΔM15::Tn9</i> ]	Dmitrova <i>et al.</i> , 1998
<i>E. coli</i> SU101-DPA1-MSA1	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPA1-MSA2	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPA1-MSB	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPA1-MSFZ	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPA2-MSA1	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPA2-MSA2	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

<i>E. coli</i> SU101-DPA2-MSB	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPA2-MSFZ	SU101 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPB-MSA1	SU101 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von ParB und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPB-MSA2	SU101 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von ParB und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPB-MSB	SU101 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von ParB und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPB-MSFZ	SU101 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von ParB und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPFZ-MSA1	SU101 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von FtsZ und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPFZ-MSA2	SU101 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von FtsZ und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPFZ-MSB	SU101 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von FtsZ und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU101-DPFZ-MSFZ	SU101 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von FtsZ und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA1-MSA1	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

<i>E. coli</i> SU202-DPA1-MSA2	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA1-MSB	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA1-MSFZ	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA2-MSA1	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA2-MSA2	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA2-MSB	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA2-MSFZ	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPB-MSA1	SU202 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von ParB und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPB-MSA2	SU202 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von ParB und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPB-MSB	SU202 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von ParB und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPB-MSFZ	SU202 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von ParB und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

<i>E. coli</i> SU202-DPFZ-MSA1	SU202 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>1</sub> , für Interaktionsstudien von FtsZ und ParA <sub>1</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPFZ-MSA2	SU202 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>parA</i> <sub>2</sub> , für Interaktionsstudien von FtsZ und ParA <sub>2</sub> , IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPFZ-MSB	SU202 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>parB</i> , für Interaktionsstudien von FtsZ und ParB, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPFZ-MSFZ	SU202 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>ftsZ</i> , für Interaktionsstudien von FtsZ und FtsZ, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA1-MSDiv	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>1</sub> und pMS604- <i>divIVA</i> für Interaktionsstudien von ParA <sub>1</sub> und DivIVA, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPA2-MSDiv	SU202 mit pDP804- <i>parA</i> <sub>2</sub> und pMS604- <i>divIVA</i> für Interaktionsstudien von ParA <sub>2</sub> und DivIVA, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPB-MSDiv	SU202 mit pDP804- <i>parB</i> und pMS604- <i>divIVA</i> für Interaktionsstudien von ParB und DivIVA, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> SU202-DPFZ-MSDiv	SU202 mit pDP804- <i>ftsZ</i> und pMS604- <i>divIVA</i> für Interaktionsstudien von FtsZ und DivIVA, IPTG induzierbar, Tc <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	diese Arbeit

## 2.1.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tab. 2.2:** Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden und ihre Eigenschaften. (Ap<sup>R</sup>, Resistenz gegen Ampicillin; Cm<sup>R</sup>, Resistenz gegen Chloramphenicol; Km<sup>R</sup>, Resistenz gegen Kanamycin; Tc<sup>R</sup>, Resistenz gegen Tetracyclin; Nx<sup>R</sup>, Resistenz gegen Nalidixinsäure; Sp<sup>R</sup>, Resistenz gegen Spectinomycin)

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pk18mob	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , <i>mob</i> ; <i>C. glutamicum</i> Insertionsvektor	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pk18mob- <i>parA</i> <sub>1</sub>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parA</i> <sub>1</sub>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parA</i> <sub>1</sub> +100	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parA</i> <sub>1</sub> + 100 BP <i>upstream</i> von <i>parA</i> <sub>1</sub>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parA</i> <sub>1</sub> +100- <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i> + 100 BP <i>upstream</i> von <i>parA</i> <sub>1</sub>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parA</i> <sub>2</sub> +100- <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parA</i> <sub>2</sub> - <i>gfp</i> + 100 BP <i>upstream</i> von <i>parA</i> <sub>2</sub>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parB</i> - <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parB</i> - <i>gfp</i>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parB</i> +60- <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parB</i> - <i>gfp</i> + 60 BP <i>upstream</i> von <i>parB</i>	diese Arbeit
pk18mob- <i>parA</i> <sub>1</sub> +100- <i>parB</i> - <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>parB</i> - <i>gfp</i> + 100 BP <i>upstream</i> von <i>parA</i> <sub>1</sub>	diese Arbeit
pk18mob- <i>ftsZ</i> - <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>ftsZ</i> - <i>gfp</i>	diese Arbeit
pk18mob- <i>ftsZ</i> +100- <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>ftsZ</i> - <i>gfp</i> + 100 BP <i>upstream</i> von <i>ftsZ</i>	diese Arbeit
pk18mob- <i>divIVA</i> +100- <i>gfp</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Insertionsvektor mit <i>divIVA</i> - <i>gfp</i> + 100 BP <i>upstream</i> von <i>divIVA</i>	diese Arbeit

pk18mobsacB	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> . Konstruktion von Deletionen in <i>C. glutamicum</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pk18mobsacB- $\Delta$ <i>parA</i> <sub>1</sub>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Deletionsvektor mit 800 BP <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>parA</i> <sub>1</sub>	diese Arbeit
pk18mobsacB- $\Delta$ <i>parA</i> <sub>2</sub>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Deletionsvektor mit 800 BP <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>parA</i> <sub>2</sub>	diese Arbeit
pk18mobsacB- $\Delta$ <i>parB</i>	<i>ori</i> pUC, Kan <sup>R</sup> , Deletionsvektor mit 800 BP <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von <i>parB</i>	diese Arbeit
pEKEEx2	Kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>pTac</i> , <i>ori C.g.</i> , <i>ori E.c. C. glutamicum</i> Expressionsvektor	Eikmanns <i>et al.</i> , 1994
pEKEEx2- <i>parA</i> <sub>1</sub>	Kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Expressionsvektor mit <i>parA</i> <sub>1</sub> , IPTG-induzierte Überexpression von ParA <sub>1</sub>	diese Arbeit
pEKEEx2- <i>parA</i> <sub>2</sub>	Kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Expressionsvektor mit <i>parA</i> <sub>2</sub> , IPTG-induzierte Überexpression von ParA <sub>2</sub>	diese Arbeit
pEKEEx2- <i>parB</i>	Kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Expressionsvektor mit <i>parB</i> , IPTG-induzierte Überexpression von ParB	diese Arbeit
pEKEEx2- <i>yfp-tetR</i>	Kan <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Expressionsvektor mit <i>yfp-tetR</i> , IPTG-induzierte Überexpression von YFP-TetR	Frunzke <i>et al.</i> , 2008
pET-16B	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für Überexpression in <i>E. coli</i> , mit N-terminalen 10fach His-Tag	Novagen
pET-16B- <i>parA</i> <sub>1</sub>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von ParA <sub>1</sub> in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET-16B- <i>parA</i> <sub>1</sub> - <i>gfp</i>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von ParA <sub>1</sub> -GFP in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET-16B- <i>parA</i> <sub>2</sub>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von ParA <sub>2</sub> in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET-16B- <i>parA</i> <sub>2</sub> - <i>gfp</i>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von ParA <sub>2</sub> -GFP in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET-16B- <i>parB</i>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von ParB in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET-16B- <i>ftsZ</i>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von FtsZ in <i>E. coli</i>	diese Arbeit



pET-16B- <i>divIVA</i>	Ap <sup>R</sup> ; Vektor für IPTG-induzierte Überexpression von DivIVA in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pLAU44	<i>tetO</i> , Ap <sup>R</sup>	Lau <i>et al.</i> , 2003
pLAU44- <i>integ ori</i>	Sp <sup>R</sup> , <i>tetO</i> , Region zwischen cg0002 und cg0004	diese Arbeit
pMS604	Tc <sup>R</sup> , <i>lexA<sub>1-87</sub>-wt-Fos zipper</i>	Dmitrowa <i>et al.</i> , 1998
pMS604- <i>parA<sub>1</sub></i>	Tc <sup>R</sup> , Expression von <i>parA<sub>1</sub> - lexA<sub>1-87</sub>-wt-Fos zipper</i>	diese Arbeit
pMS604- <i>parA<sub>2</sub></i>	Tc <sup>R</sup> , Expression von <i>parA<sub>2</sub> - lexA<sub>1-87</sub>-wt-Fos zipper</i>	diese Arbeit
pMS604- <i>parB</i>	Tc <sup>R</sup> , Expression von <i>parB - lexA<sub>1-87</sub>-wt-Fos zipper</i>	diese Arbeit
pMS604- <i>ftsZ</i>	Tc <sup>R</sup> , Expression von <i>ftsZ - lexA<sub>1-87</sub>-wt-Fos zipper</i>	diese Arbeit
pDP804	Ap <sup>R</sup> , <i>lexA<sub>1-87</sub>-408-Jun zipper</i>	Dmitrowa <i>et al.</i> , 1998
pDP804- <i>parA<sub>1</sub></i>	Ap <sup>R</sup> , Expression von <i>parA<sub>1</sub> - lexA<sub>1-87</sub>-408-Jun zipper</i>	diese Arbeit
pDP804- <i>parA<sub>2</sub></i>	Ap <sup>R</sup> , Expression von <i>parA<sub>2</sub> - lexA<sub>1-87</sub>-408-Jun zipper</i>	diese Arbeit
pDP804- <i>parB</i>	Ap <sup>R</sup> , Expression von <i>parB -- lexA<sub>1-87</sub>-408-Jun zipper</i>	diese Arbeit
pDP804- <i>ftsZ</i>	Ap <sup>R</sup> , Expression von <i>ftsZ - lexA<sub>1-87</sub>-408-Jun zipper</i>	diese Arbeit
pDP804- <i>divIVA</i>	Ap <sup>R</sup> , Expression von <i>divIVA - lexA<sub>1-87</sub>-408-Jun zipper</i>	diese Arbeit

### 2.1.3 Oligonukleotide

In Tabelle 2.3 sind die verwendeten Oligonukleotide inklusive deren Basensequenzen aufgeführt. Die Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies GmbH, Köln bezogen und in Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

**Tab. 2.3:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotide	Basensequenz (5´-3´)
gfp_Bam_F	CATGGATCCAAGGAGATATAGATATGAGTAAAGGAGAAG
gfp_Bam_R	CTGGGATCCCTATTTGTATAGTTCATCC
gfp_Kpn_F	GCAGGTACCGCAGCGATGAGTAAAGGAGAAG
gfp_Kpn_R	GATGGTACCTTTGTATAGTTCATCC
gfp_Bam_N_R	CTGGGATCCGACTAGTGCTTTGTATAGTTCATCC
gfp_Kpn_C_R	CTGGGTACCCTATTTGTATAGTTC
gfp 18 BamHI F	CATGGATCCAAGGAGATATAGATATGAGTAAAGGAGAAG
gfp 18 HindIII R	CTGAAGCTTCTATTTGTATAGTTCATCC
gfp 18 XbaI F	CATTCTAGAAAGGAGATATAGATATGAGTAAAGGAGAAG
gfp 18 SmaI N R	CTGCCCCGGGTTTGTATAGTTCATCCAT
gfp EX5 SmaI F	CAGCCCCGGGATGAGTAAAGGAGAAGAA
gfp EX5 Sall F	CAGGTCGACATGAGTAAAGGAGAAGAA
gfp EX5 PstI R	CAGCTGCAGCTATTTGTATAGTTCATC
gfp SacI F	CAGGAGCTCATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
gfp EcoRI R	CTGGAATTCCTATTTGTATAGTTCATCCAT
gfp (N) EX PstI F	CAGCTGCAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
gfp (N) EX Sall R	CAGGTCGACTTTGTATAGTTCATCCATGCC
gfp XhoI F	CAGCTCGAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT
gfp_Bam_F	CATGGATCCAAGGAGATATAGATATGAGTAAAGGAGAAG
gfp_Bam_R	CTGGGATCCCTATTTGTATAGTTCATCC
cfp SmaI F	CAGCCCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
cfp HindIII R mS	CAGAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
divIVA Eco91I F	GCTGGTCACCGGATGCCGTTGACTCCAGCTGATGTG
divIVA EcoRI R mS	GCTGAATTCCTACTCACCAGATGGCTTGTTGTT
divIVAcg_Bam_R	CTGGATCCTTACTCACCAGATGGCTTG
divIVAcg_Eco_F	GCGCGCGAATTCGAAGAACAGTATGATAAATGGAAA

divIVAcg_Bam_R+	GCTGGTACCCTCACCAGATGGCTTG
divIVAcg_Kpn_R	GCTGGTACCCTCACCAGATGGCTTG
divIVA ET NdeI F	GCTCATATGGAAGAACAGTATGATAAA
divIVA ET Bam R	GCTGGATCCTTACTCACCAGATGGCTT
parA1 BglII R mS	CAGAGATCTCTATTTTCGCAGGTTTTAG
parA_Eco_F	CAGGAATTCGCGGCAGCGATGGAAGACACTACTTGG
parA_Kpn_R	CTGGGTACCTTTTCGCAGGTTTTAGGCC
parA1 EX PstI F	CAGCTGCAGATGGAAGACACTACTTGG
parA1 EX KpnI R	CAGGGTACCCTATTTTCGCAGGTTTTAG
parA1 ET XhoI F	CAGCTCGAGATGGAAGACACTACTTGGGAA
parA1 ET NdeI F	CAGCATATGGAAGACACTACTTGGGAA
parA1 ET XhoI R	CAGCTCGAGCTATTTTCGCAGGTTTTAG
parA1 18 EcoRI F 100	CAGGAATTCCTACTTCGGTGGAATGGGT
parA1 18 KpnI R	CAGGGTACCGCCGCCCTTTTCGCAGGTTTTAG
parA1 ms KpnI F	CAGGGTACCTTAAGTTGAGTCGTTATA
parA1 ms R 1	CCCATCCACTAACTTAAACACGACGTCAACCATCCCTA
parA1 ms F 2	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCAGTAACTTCTTTGAAT
parA1 ms BamHI R	CAGGGATCCTACCGGACGGGAACGGCC
parA1 EX5 SacI F	CAGGAGCTCATGGAAGACACTACT
parA1 EX5 SmaI R	CAGCCCGGGCTATTTTCGCAGGTTT
parA1 EX5 SmaI R oS	CAGCCCGGGTTTTTCGCAGGTTTTAGGCC
NparA1 ms XbaI F	CAGTCTAGATTAAGTTGAGTCGTTATA
NparA1 ms ScaI R	CAGAGTACTCGACGTCAACCATCCCTA
NparA1 ms ScaI F	CAGAGTACTCAGTAACTTCTTTGAAT
NparA1 ms NheI R	CAGGCTAGCTACCGGACGGGAACGGCC
parA2 Eco91I F	CAGGGTCACCGGATGGATGCAGGGAAGAAGGAC
parA2 BglII R mS	CAGAGATCTCTAGTCGTTGACGCGGCTGAT
parA2 EX SbfI F	CCCTGCAGGATGAGTGATGCAGGGAAG
parA2 EX KpnI R	CA GGTACCCTAGTCGTTGACGCGGCT
parA2 ET XhoI F	CAGCTCGAGGTGAGTGATGCAGGGAAGAAG
parA2 ET NdeI F	CAGCATATGGATGCAGGGAAGAAGGACTCT
parA2 ET XhoI R	CAGCTCGAGCTAGTCGTTGACGCGGCT
parA2 18 EcoRI F 100	CAGGAATTCGTGAGAGCTGTAAAGTC
parA2 18 KpnI R	CAGGGTACCGCCGCCGTCGTTGACGCGGCT
parA2 ms KpnI F	CAGGGTACCCATCAAGTGCGTGCGCAG

## Material und Methoden

parA2 ms R 1	CCCATCCACTAAACTTAAACAAGTCAAACCTTCTTCCTT
parA2 ms F 2	TGTTTAAGTTTATAGTGGATGGGGTTGTTTTTCTAAAA
parA2 ms BamHI R	CAGGGATCCACTGACACCGCAACTTGG
parA2 EX5 SacI F	CAGGAGCTCGTGAGTGATGCAGGG
parA2 EX5 SmaI R	CAGCCCGGGCTAGTCGTTGACGCG
parA2 EX5 SmaI R oS	CAGCCCGGGGTCGTTGACGCGGCTGAT
NparA2 ms EcoRI F	CAGGAATTCGCTCGCAGAAGTGTGGTTTTA
NparA2 ms BamHI R	CAGGGATCCAGTCAAACCTTCTTCCTT
NparA2 ms BamHI F	CAGGGATCCGTTGTTTTTCTAAAA
NparA2 ms XbaI R	CAGTCTAGAACTGACACCGCAACTTGG
parB Eco91I F	CCCGGTCACCGGATGGCTCAGAACAAGGGT
parB XhoI F	CAGCTCGAGATGGCTCAGAACAAGGGTTCC
parB BglII R mS	CAGAGATCTTTATTGGCCCTGGATCAAGGA
parB EX SbfI F	CCCTGCAGGATGGCTCAGAACAAGGGT
parB EX BamHI R	CAGGGATCCTTATTGGCCCTGGATCAA
parB ET NdeI F	CAGCATATGGCTCAGAACAAGGGTTCC
parB ET XhoI R	CAGCTCGAGTTATTGGCCCTGGATCAA
parB 18 SmaI F	CAGCCCGGGATGGCTCAGAACAAGGGTTCC
parB60 SmaI F	CAGCCCGGGCAGTAAACTTCTTTGAATACG
parB 18 BamHI R	CAGGGATCCTTGGCCCTGGATCAA
parB 18 BamHI Stop R	CAGGGATCCTTATTGGCCCTGGATCAA
parB ms KpnI F	CAGGGTACCATTTCATGGGCTTAAAGTTCTC
parB ms R 1	CCCATCCACTAAACTTAAACACGCTCTTAGACGCACCTT
parB ms F 2	TGTTTAAGTTTATAGTGGATGGGGTTTTAAGTTTGGCGCCATGCT
parB ms BamHI R	CAGGGATCCCCAACCCCGATGACCTGG
parB EX5 SmaI F	CAGCCCGGGATGGCTCAGAACAAG
parB EX5 Sall R	CAGGTCGACTTATTGGCCCTGGAT
parB EX5 Sall R oS	CAGGTCGACTTGGCCCTGGATCAAGGA
parB EX Sall F	CAGGTCGACATGGCTCAGAACAAGGGTTCC
parB EX BamHI R	CAGGGATCCTTATTGGCCCTGGATCAAGGA
NparB ms EcoRI F	CAGGAATTCATTTCATGGGCTTAAAGTTCTC
NparB ms XbaI R	CAGTCTAGGCGCTCTTAGACGCACCTT
NparB ms XbaI F	CAGTCTAGATTTTAAGTTTGGCGCCATGCT
NparB ms PstI R	CAGCTGCAGCCAACCCCGATGACCTGG
ftsZ Eco91I F	CAGGGTCACCGGATGACCTCACCGAACAACACTAC

ftsZ XhoI F	CAGCTCGAGATGACCTCACCGAACAACTACCTC
ftsZ BglII R mS	CAGAGATCTTTACTGGAGGAAGCTGGGTACATC
ftsZ ET NdeI F	CAGCATATGACCTCACCGAACAACTAC
ftsZ ET XhoI R	CAGCTCGAGTTACTGGAGGAAGCTGGG
ftsZ 18 EcoRI F	CAGGAATTCATGACCTCACCGAACAACTAC
ftsZ 18 XbaI R	CAGTCTAGACTGGAGGAAGCTGGGTACATC
ftsZ EX5 SacI F	CAGGAGCTCATGACCTCACCGAAC
ftsZ EX5 SmaI R	CAGCCCGGGTTACTGGAGGAAGCT
ftsZ EX5 SmaI R oS	CAGCCCGGGCTGGAGGAAGCTGGGTAC
ftsZ EX SbfI F	CAGCCTGCAGGATGACCTCACCGAACAACT
ftsZ EX SacI R	GTCGAGTCTCTGGAGGAAGCTGGGTACATC
ftsZ+100 18 EcoRI F	CAGGAATTCACTTTTAGATAAGCTCTCACAGTG
dnaA+100 18 KpnI F	CAGGGTACCGCGGAATTTTGCCTGCTTTTTAG
dnaA+100 18 BamHI R	CAGGGATCCGTTACGTCCGCGCGACTTAATCAG
DNAPoll+100 SmaI F	CATCCCGGGTAGGAATGGAATTAGGGGTCTGG
DNAPoll 18 SmaI F	CATCCCGGGATGCTTATCGACGGCCACTCG
DNAPoll 18 XbaI R	CTGTCTAGATTAGTGCCTGCAGCATCCCA
ftsL_Hin_R	GCGAAGCTTTCACTGCCCTGCGCCACC
ftsL_Bam_F	CGTGGATCCATGTCGGTGCCTGGTTCG
ftsLcg_Eco_R	GTCGAATTCTCACTGCCCTGCGCC
ftsLcg_Kpn_F	CATGGTACCGCAGCGGCAATGTCGGTGCCTGG
M13 for	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
M13 re	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
cg3425 BamHI R	CAGGGATCCGATCGGGAAAAGGGAAGCCTG
parS BamHI F	CAGGGATCCCGCAATGTTTCACGTGAAACA
parS EcoRI R	GTCGAATTCTGTTTCACGTGAAACATTGCG
Integ ori XbaI F	CGCTCTAGATTGGGAAATATAGATCAA
Integ ori XbaI R	CGCTCTAGAGCCAGAATTCCGCGACTA
oHM3	AGAATGTTCCACGTGAAACAAAGA
oHM4	TCTTTGTTTCACGTGGAACATTCT
parA1 re DP	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTATTTTCGAGGTTTTAG
parA2 re DP	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTAGTCGTTGACGCGGCT
parB re DP	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCAGTTATTGGCCCTGGATCAA
gfp re DP	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTGCTATTTGTATAGTTCATCC

## **2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen**

### **2.2.1 Nährmedien für *E. coli***

Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden standardmäßig in LB (Luria Bertani)-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l; nach Sambrook *et al.*, 1989) kultiviert. Diesem Medium konnten 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden.

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde weiterhin TB-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>; mit KOH auf pH 6,7 eingestellt) und SOB-Medium (2,5 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt) benötigt. Außerdem wurde SOC-Medium (SOB mit zusätzlichen 20 mM Glukose) für die Transformation der (*E. coli*) Zellen verwendet.

### **2.2.2 Nährmedien für *C. glutamicum***

Zur Kultivierung von *C. glutamicum* wurde BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion; Difco, Detroit, USA) als Flüssigmedium (37 g/l H<sub>2</sub>O) benutzt. Für die Kultivierung auf Agarplatten wurden dem Medium 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt.

Die Anzucht zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation durch Elektroporation erfolgte in 200 ml LB-Medium, das die Wachstumsinhibitoren Isonicotinsäurehydrazid (4 g/l), Glycin (25 g/l) und Tween-80 (1 ml/l) enthielt (Haynes und Britz, 1989). Die Regeneration der Zellen erfolgte in BHIS-Medium (37 g/l Brain-Heart-Infusion, 0,5 M Sorbitol).

### **2.2.3 Antibiotika**

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker für *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme wurde den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Carbenicillin 50 µg/ml, Chloramphenicol 25 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Spectinomycin 25 µg/ml, Nalidixin 25 µg/ml und Tetracyclin 15 µg/ml. Es wurden Stammlösungen in 1000-fach höherer Konzentration für Carbenicillin, Kanamycin und Spectinomycin in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> bzw. für

Chloramphenicol und Tetracyclin in 70% Ethanol hergestellt, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

## **2.2.4 Kultivierungsbedingungen**

*E. coli* Stämme wurden bei 37°C und *C. glutamicum* Stämme bei 30°C als Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen angesetzt und auf dem Schütteltisch bei 135 bzw. 125 rpm angezogen. Das Zellwachstum konnte durch die Messung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) ermittelt werden.

Zur Präparation chemischkompetenter *E. coli* und elektrokompetenter *C. glutamicum* Zellen wurde eine 5 ml Vorkultur in Reagenzgläsern in LB- bzw. in LB-Medium mit 2% Glukose hergestellt und weiter nach Punkt 2.5.1 für *E. coli* und 2.5.2 für *C. glutamicum* vorgegangen. Die Isolierung von Plasmid-DNS erfolgte wie unter Punkt 2.4.5 beschrieben, nachdem die *E. coli* Zellen zuvor in 5 ml LB-Medium in Reagenzgläsern vorkultiviert wurden.

Für die heterologe Expression von Proteinen wurden *E. coli* Zellen über Nacht in Reagenzgläsern in 5 ml LB-Medium vorkultiviert. Morgens wurden 500 ml LB-Medium und entsprechenden Antibiotika mit der Übernachtskultur auf OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bis OD<sub>600</sub> von 0,6 unter Schütteln inkubiert. Die Expression des gewünschten Proteins erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG für 3 bis 5 Stunden. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet und wie unter Punkt 2.3.1 beschrieben, aufgearbeitet.

## **2.3 Biochemische Techniken**

### **2.3.1 Proteinpräparation aus Zellextrakten**

Für die Proteinpräparationen wurden die *C. glutamicum* bzw. *E. coli* Zellen (Kultivierung siehe Punkt 2.2.4) nach Inkubation durch Zentrifugation für 30 min, mit 4500 x g bei 4°C geerntet. Die Zellpellets wurden in 5 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris (pH (HCl) = 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, Protease Inhibitor (Complete; Roche, Mannheim) resuspendiert. Die Suspension wurde in 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen (Durchmesser 0,2 bis 0,3 mm) pipettiert. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-

Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) für 4 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 x g, 4°C, 25 min) sedimentiert. Der Überstand, die Proteinfraction, wurde abpipettiert und konnte bei -20°C gelagert werden.

### **2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Lowry**

Die Proteinkonzentrationen von Zellextrakten aus *C. glutamicum* oder von Fraktionen aus Proteinreinigungen aus *E. coli* wurden mit der Methode nach Lowry (modifiziert nach Dulley & Grieve, 1975) bestimmt. Für die Eichgerade wurden 0, 4, 8, 12, 16 und 20 µg Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Die Proteinproben wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 1:10 verdünnt. Zu 100 µl verdünnter Probe wurden 20 µl 100 mM SDS pipettiert. Das Färbereagenz wurde jeweils frisch angesetzt, 1 ml Färbereagenz zur Probenlösung gegeben, gemischt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Zu jeder Probe wurden dann 100 µl Folinreagenz (Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, unverdünnt) pipettiert, sofort gut gemischt und die Proben für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 650 nm gegen die Nullprobe der Eichgeraden bestimmt und die Konzentrationen mit Hilfe der BSA-Eichgeraden ermittelt.

#### Färbereagenz:

100 ml Lösung A (2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,4 g NaOH / 100 ml)  
+ 2 ml Lösung B (2 % Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-Tartrat)  
+ 2 ml Lösung C (1 % CuSO<sub>4</sub>)

### **2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Zur Auftrennung der Proteinfractionen bzw. als Nachweis einer Proteinreinigung wurden der Zellextrakt bzw. die Elutionsfraktionen auf 10 bis 12 %ige denaturierende Polyacrylamid-Gele (SDS-PAGE) aufgetragen (Schägger & von Jagow, 1987). Die Gele enthielten Harnstoff und SDS, durch die die Proteine denaturiert wurden. Die Proben wurden mit denaturierendem 5 x Gelladepuffer verdünnt, für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und zusammen mit einem Protein-Marker aufgetragen (Prestained Protein Marker Broad Range, 10 bis 180 kDa, MBI Fermentas, Wilna). Als Laufpuffer wurde Kathoden- und Anodenpuffer eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 50 V



gestartet und die Spannung auf 150 V erhöht, sobald die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten.

Jeweils unmittelbar vor dem Gießen wurden 50 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 5 µl TEMED zum Trenngel und Sammelgel pipettiert. Als *overlay solution* für die Trenngele wurde 2-Propanol verwendet.

Für ein 10%-iges Trenngel wurden benötigt:

4 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (48 % / 1,5 %)

5 ml Gelpuffer

5,4 g Harnstoff

1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Für ein Sammelgel wurden benötigt:

0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (48 % / 1,5 %)

1,55 ml Gelpuffer

4 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Kathodenpuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % SDS

Anodenpuffer:

0,2 M Tris, pH (HCl) = 8,9

Gelpuffer:

0,3 M Tris, 0,1 M HCl, 0,03 % SDS

Gelladepuffer (5x):

20 % SDS, 60 % (w/v) Glycerin, 250 mM Tris, 2 % Mercaptoethanol, 0,01 % Servablau G, pH (HCl) = 6,8

### **2.3.4 Färbung mit Coomassie *Brilliant Blue***

Auf SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.3) aufgetrennte Proteine wurden nach der Gelelektrophorese mit Coomassie *Brilliant Blue* nach Sambrook *et al.* (1989) sichtbar gemacht. Dafür wurden die Gele eine Stunde in einer Fixier- und Färbelösung

inkubiert (0,1 % Servablau G, 10 % Eisessig, 45 % Methanol). Die Entfärbung erfolgte über mehrere Stunden in 10 %iger Essigsäure. Zur Lagerung wurden die Gele in Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

### **2.3.5 Immunoblot**

Zur Detektion von Proteinen wurde ein Antikörpernachweis durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese aus den SDS-Gelen (siehe Punkt 2.3.3) in einem "semi-dry-Blot" auf eine PVDF-Membran (Millipore Immobilon P, Roth, Karlsruhe) übertragen. Dazu wurde die Membran kurz in 60 %igem Methanol inkubiert und in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde anschließend auf einen Stapel aus fünf in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) in eine "semi-dry-Blot"-Apparatur gelegt. Auf die Membran wurde dann sofort luftblasenfrei das Proteingel gelegt. Zum Schluss wurde auf das Gel noch ein weiterer Stapel aus fünf in Transferpuffer getränkten Filterpapieren gelegt und der Proteintransfer auf die Membran bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Oberfläche für eine Stunde durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt und dann für eine weitere Stunde in dem gleichen Puffer mit dem ersten Antikörper (ParA<sub>1</sub>-, ParB-, FtsZ-, GFP- oder His-Antiserum) in einer Verdünnung von 1:2.000 inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 Minuten wurde die Membran für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur geschüttelt. Als zweiter Antikörper wurde Anti-Kaninchen IgG (für ParA<sub>1</sub>-, ParB- und GFP-Antiserum), Anti-Meerschweinchen IgG (für FtsZ-Antiserum) oder Anti-Maus IgG (für His-Antiserum) Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma, Steinheim) verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte über Präzipitation eines Farbstoffs auf der Membran. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 20 Minuten wurden 60 µl NBT-Stammlösung (NBT Pulver, Roth, Karlsruhe) und 60 µl BCIP-Stammlösung (BCIP-Pulver, Roth, Karlsruhe) in 10 ml Inkubationspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde bis zur gewünschten Signalstärke im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> abgestoppt. Zuletzt wurde die Membran auf Filterpapieren getrocknet.

Transferpuffer:

10 mM CAPS, 1,5 M NaCl, 10 % Methanol, pH (NaOH) = 11

Waschpuffer:

50 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH (HCl) = 7,5

Blockierungspuffer:

Waschpuffer mit 5 % Milchpulver

Inkubationspuffer:

100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris, pH (NaOH) = 9,5

NBT-Stammlösung:

0,5 g p-Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT) wurden in 10 ml 70 % Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

BCIP-Stammlösung:

0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) wurde in 10 ml 100 %igem Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C lichtgeschützt gelagert.

### **2.3.6 Proteinreinigung**

Die Proteine ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP, ParA<sub>2</sub>, ParA<sub>2</sub>-GFP, ParB, FtsZ und DivIVA wurden in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) / pLysS mit Hilfe des pET-16B-Vektors überexprimiert. Dafür wurde 500 ml LB-Kultur (mit Carbenicillin und Chloramphenicol) aus einer 5 ml LB-Vorkultur mit dem entsprechenden Stamm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 (nach ca. 1 bis 2 h) mit 1 mM IPTG induziert und weitere 3 bis 5 h inkubiert. Für die Zellernte wurde die Kultur 20 bis 30 min, mit 4500 x g bei 4° C zentrifugiert. Das Zellextrakt wurde wie in 2.3.1 beschrieben, gewonnen. Die gewünschten Proteine wurden mittels Metallaffinitätschromatographie im Batch-Verfahren gewonnen, wofür Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) verwendet wurde. Die 5 ml mit Zellextrakt wurden in ein 15 ml Falcon mit 0,5 ml äquilibrierter Ni-NTA-Agarose gegeben und für 30 min, bei 4°C drehend inkubiert. Dadurch konnten sich die überexprimierten Proteine mit

His-Tag an die Matrix anlagern. Danach wurde zentrifugiert (4 min, 2000 x g, 4°C). Nach Verwerfen des Überstands, wurde mit 10 ml Waschpuffer mit 25 mM Imidazol gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert (4 min, 2000 x g, 4°C). Der Überstand wurde wieder verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit Waschpuffer mit 50 mM Imidazol und anschließender Zentrifugation (4 min, 2000 x g, 4°C) und Verwerfung des Überstands. Nachdem die unspezifischen Bindungen so entfernt wurden, folgten 4 bis 5 Elutionsschritte mit steigender Imidazolkonzentration. Für die Elution wurde je 1 ml Elutionspuffer mit 250 mM bis 1 M Imidazol zu der Agarose gegeben und anschließend, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 4° bzw. -20°C aufbewahrt.

Die Proteine ParA<sub>1</sub>, ParB und FtsZ wurden zusätzlich für die spezifische Antikörperherstellung genutzt. Dafür wurden die 0,5 bis 1 mg der Proteine aus einem SDS-Gel ausgeschnitten bzw. die Proteine wurden lyophilisiert und dann zu Eurogentec (Brüssel) gesandt, welche die Antikörper herstellten. Für ParA<sub>1</sub> und ParB wurden Kaninchen und für FtsZ Meerschweinchen für die Synthese eingesetzt.

### Aufschlußpuffer:

50 mM Tris (pH (HCl) = 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 %igem (v/v) Glycerol, Protease Inhibitor (Complete, Roche)

### Waschpuffer:

50 mM Tris (pH (HCl) = 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 - 80 mM Imidazol

### Elutionspuffer:

50 mM Tris (pH (HCl) = 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 250 mM - 1 M Imidazol

### Äquibrierung der Ni-NTA-Agarose:

Es wurde 1 ml der Ni-NTA-Agarose in ein 15 ml Falcon gegeben und zentrifugiert (4 min, 2000 x g, 4°C). Danach wurde der Überstand verworfen und 0,5 ml H<sub>2</sub>O dazu gegeben. Nach kurzem Schütteln und wurde wieder zentrifugiert (4 min, 2000 x g, 4°C). Der Überstand wurde abermals verworfen und 0,5 ml Aufschlußpuffer

hinzugefügt, danach kurz geschüttelt und zentrifugiert (4 min, 2000 x g, 4°C). Der Vorgang wurde nochmals wiederholt. Danach konnte auf die Ni-NTA-Agarose das vorbereitete Zellextrakt gegeben werden.

### **2.3.7 DNS-Mobilitäts-Assay**

Zum Nachweis einer Bindung von Par Proteinen an die DNS wurde ein Mobilitäts-Assay durchgeführt. Dafür wurden 20 bis 50 µg Protein mit jeweils 5 bis 10 µg DNS bei 30°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (siehe 2.4.4).

### **2.3.8 Polymerisations-Assay**

Die Polymerisation bzw. deren Inhibition der GTPase FtsZ und der ATPasen ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP, ParA<sub>2</sub> und ParA<sub>2</sub>-GFP wurde mittels dieses Assays nachgewiesen. Dafür wurde jeweils 50 µg des gewünschten Proteins eingesetzt. Um nur Monomere für die Anfangsreaktion zu verwenden, wurden die gereinigten Proteine zuerst zentrifugiert (20 min, 80.000 x g, 20°C) und nur der Überstand für den Assay verwendet. Danach wurde zu den Proteinen Polymerisationspuffer (50 mM Mes/NaOH, 50 mM KCl, pH 6,5) und 20 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Dann wurde für 5 min bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils 20 µl des gewünschten Nukleotids aus einem 10 mM Stock bzw. 20 µl Polymerisationspuffer zugegeben, um ein Endvolumen von 200 µl zu erhalten. Nach weiteren 5 min Inkubation bei 30°C wurde jeweils 5 µl DEAE Dextran hinzugefügt, um die Polymere zu stabilisieren. 20 µl wurden dieser Fraktion (Monomere und Polymere) entnommen und mit 20 µl 2 x Ladepuffer verdünnt. Die übrige Probe wurde ultrazentrifugiert (20 min, 80.000 x g, 20°C). Anschließend wurden 20 µl des Überstands (Monomerfraktion) mit 20 µl 2 x Ladepuffer gemischt und das Pellet (Polymerfraktion) in 60 µl 1 x Ladepuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden dann für 1 min bei 95°C denaturiert und 20 µl auf ein SDS-Gel (2.3.3) aufgetragen.

Um eine Inhibition der Polymerisation nachweisen zu können, wurde FtsZ mit ParA<sub>1</sub> bzw. ParA<sub>2</sub> und mit unterschiedlichen Nukleotiden inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei immer 200 µl.

### 2.3.9 Nachweis der enzymatischen Aktivität von GTP- und ATPasen

Die ATPase- / GTPase-Aktivität von ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP, ParA<sub>2</sub>, ParA<sub>2</sub>-GFP und FtsZ wurde mit dem EnzCheck® Phosphate Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) analysiert. Der Enzymtest wurde, wie im Protokoll des Kits beschrieben, durchgeführt. Es wurden jeweils 25 bis 50 µg Enzym eingesetzt.

### 2.3.10 β-Galactosidase-Assay

Es wurden 5 ml LB + Antibiotika und 1 bis 2 mM IPTG mit *E. coli* SU101 bzw. SU202 aus einer Vorkultur (ebenfalls mit 1 bis 2 mM IPTG) auf OD<sub>600</sub> 0,01 angeimpft und einige Stunden bei 37° C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6, wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und notiert. Jeweils 20 µl pro Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit vorgelegten 80 µl Permeabilisierungslösung gegeben und kurz gemischt. Die Proben sind dann für einige Stunden stabil, wodurch Zeitanalysen möglich sind. Nachdem die letzte Probe genommen wurde, wurden alle Proben 30 min bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 600 µl Substratlösung (auf 30°C vorgewärmt) zugegeben, kurz gemischt und der Zeitpunkt der Zugabe notiert. Sobald sich eine Gelbfärbung der Proben feststellen ließ, wurden 700 µl Stopplösung zugegeben und gemischt. Der Zeitpunkt des Abstoppens wurde notiert. Nachdem alle Proben abgestoppt wurden (meist 30 bis 90 min), wurden die Proben 10 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde gegen H<sub>2</sub>O die OD<sub>420</sub> vom Überstand ermittelt. Anschließend konnten die Miller Einheiten mit folgender Formel ausgerechnet werden:

$$1000 * (OD_{420} / (OD_{600} * \text{Volumen (0,02 ml)} * \text{Reaktionszeit [min]}))$$

#### Permeabilisierungslösung:

100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,8 mg/ml CTAB, 0,4 mg/ml Deoxycholsäure Natriumsalz, 5,4 µl/ml β-Mercaptoethanol

#### Substrat-Lösung:

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mg/ml o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (ONPG), 2 µl/ml β-Mercaptoethanol

#### Stopp-Lösung: 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

## **2.4 Molekularbiologische Techniken**

### **2.4.1 DNS Techniken**

#### **2.4.1.1 Präparation chromosomaler DNS aus *C. glutamicum***

Die Präparation chromosomaler DNS erfolgte mit Hilfe der Phenol-Chloroform Extraktion. *C. glutamicum* Zellen wurden über Nacht in 5 ml BHI-Medium (siehe Punkt 2.2.2) angezogen. Morgens wurden die Zellen abzentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Es wurden 200 µl Phenol zugegeben, der Ansatz gut gemischt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Vor Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz zunächst für 2 Minuten auf Eis gekühlt, um ein Verdampfen des Lösungsmittels zu verhindern. Dann wurde der Ansatz gemischt und zentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase verworfen. Zum Ansatz wurden erneut 200 µl Chloroform pipettiert und dieser zentrifugiert (13.000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand mit der gelösten DNS wurde von der organischen Phase getrennt, die DNS 1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für eine PCR-Reaktion (siehe Punkt 2.4.3) wurde 1 µl chromosomale DNS als Matrize in einem 20 µl Ansatz eingesetzt.

#### **2.4.1.2 Konzentrationsbestimmung der DNS**

Mit Hilfe des Photometers (Novaspec II, Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden) wurde eine Konzentrationsbestimmung der in Wasser gelösten DNS durchgeführt. Dazu wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt die Verunreinigung der Probe mit Proteinen an. Er sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,3 liegen. Die Konzentration der DNS in der Lösung kann nach folgender Formel ermittelt werden:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times V \times F$$

(V = Verdünnungsfaktor; F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNS))

Die Trennung von Proteinen aus DNS-Lösungen oder die Aufkonzentrierung von gereinigter DNS erfolgte durch Fällung mit Hilfe eines Ethanol-Essigsäure-

Gemisches. Dafür wurde dem Nukleinsäureansatz 1/10-Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,3 und das 3-fache Volumen 100% Ethanol zugesetzt. Nach Inkubation für mindestens eine Stunde bei -20°C wurde die präzipitierte Nukleinsäure zentrifugiert (13.000 x g, 30 min, 4°C), das Pellet zweimal mit 70% Ethanol (13.000 x g, 5 min, 4°C) gewaschen und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Sediment in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH (HCl) = 7,5

### 2.4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNS-Fragmenten *in vitro* wurde die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) eingesetzt. Dazu wurden jeweils zwei Primer (*forward*, *reverse*) benutzt, die den zu amplifizierenden DNS Bereich flankierten. Ein wiederholter Zyklus aus DNS-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung über eine DNS-Polymerase ermöglichte die Synthese des gewünschten DNS-Fragments. Die Primer wurden von Operon (Köln) bezogen und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Routine-Amplifikationen von DNS-Fragmenten in einem Größenbereich von 0,1 bis 2 kb wurden mit der Taq-Polymerase aus dem Master-Mix Kit (VWR, Darmstadt) vervielfältigt. Größere DNS Fragmente, insbesondere vollständige Gene, wurden mit der Phusion-Polymerase aus dem High-Fidelity-PCR Kit (NEB, Frankfurt/Main) amplifiziert, die zusätzlich *proofreading*-Aktivität besitzt. Die *Annealing*-Temperatur wurde auf die beiden Primer (*forward*, *reverse*) abgestimmt. Als *template* diente chromosomale DNS, Plasmid-DNS oder eine 10 Minuten bei 95°C gekochte Suspension von Zellen in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>. Die PCR-Reaktion wurde in Thermocyclern Mastercycler. gradient (Eppendorf, Hamburg) oder in Gene Amp. PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, USA) durchgeführt. Ein 20 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl Master-Mix (Qiagen, Hilden)

1 µl Primer *forward* [10 µM]

1 µl Primer *reverse* [10 µM]

1 µl DNS Matrize

7 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>



Zur Amplifikation wurde das *template* zunächst 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation des Fragmentes durch eine Wiederholung der folgenden Schritte: Jeder Zyklus begann mit einer kurzen Denaturierungsphase bei 95°C für 30 Sekunden. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der beiden Primersequenzen (*forward*, *reverse*) an die komplementären Sequenzen des DNS-Fragmentes, indem die Temperatur für 30 Sekunden auf die *Annealing*-Temperatur erniedrigt wurde. Es erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 72°C für eine Minute pro kB zu synthetisierendes DNS-Fragment. Durch die Polymerase wurde das Fragment synthetisiert bis ein vollständiger Doppelstrang gebildet war (*Extension*). Eine Wiederholung der letzten drei Schritte amplifizierte das DNS-Fragment in 30 Temperaturzyklen. Zuletzt wurde die Temperatur auf 72°C für 10 Minuten gehalten und die Synthese beendet. Bis zur Entnahme des fertigen PCR Produkts konnte dieses bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden, um die Entstehung von Einzelsträngen zu vermeiden. Zur Analyse der Größe der amplifizierten DNS-Fragmente wurden die PCR-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Elektrophorese in TAE-Puffer (siehe Punkt 2.4.1.4) durchgeführt. Für einen 20 µl PCR-Ansatz mit der Phusion-Polymerase wurde folgendes pipettiert:

4 µl 5X Phusion-HF-Puffer (NEB, Frankfurt/Main)  
0,4 µl dNTPs [10 mM]  
0,2 µl Phusion-DNS-Polymerase [2 U/µl] (NEB, Frankfurt/Main)  
1 µl Primer *forward* [1 µM]  
1 µl Primer *reverse* [1 µM]  
1 µl DNS Matrize  
12,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Für den Ansatz mit der Phusion-Polymerase wurde das *template* zunächst für 30 Sekunden bei 98°C denaturiert. Das DNS-Fragment wurde wie folgt amplifiziert: Der Denaturierungsphase bei 98°C für 8 Sekunden folgte die Hybridisierung der beiden Primersequenzen (*forward*, *reverse*) bei 63°C für 20 Sekunden. Durch eine Temperaturerhöhung auf 72°C für 30 Sekunden pro kB wurde das Fragment synthetisiert. Die Wiederholung der letzten drei Schritte führte zu einer Amplifikation des DNS-Fragmentes in 30 Temperaturzyklen. Die übrigen Schritte erfolgten wie für die PCR-Reaktion mit der Taq-Polymerase beschrieben.

#### **2.4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNS aus Agarosegelen**

Zur Präparation von DNS und für Restriktionsanalysen wurde die DNS in TAE-Agarosegelen (0,8 bis 2 %ig) aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Spannung bei der elektrophoretischen Auftrennung betrug 10 V/cm (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proben wurden mit einem 6 x Gelladepuffer (0,25 % Bromphenol Blau, 40 % (w/v) Saccharose in H<sub>2</sub>O) 1:5 vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente in der Regel der Lambda DNA/Eco91I (BstEII) Marker 15 oder GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) von denen 5 µl aufgetragen wurden. Die Färbung der Nukleinsäure erfolgte in einem Ethidiumbromidbad und konnte durch einen Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNS und die Detektion der DNS Banden erfolgt durch Fluoreszenz-anregung von Ethidiumbromid mit UV-Licht (366 nm). Die DNS wurde bei Bedarf mit Hilfe des NucleoSpin. Extract (Macherey & Nagel, Düren) nach der Anleitung der Hersteller aus dem Agarosegel isoliert und in 30 µl (zur Konzentrierung) oder in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

##### TAE-Puffer 50X:

242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt und die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt.

##### Ladepuffer 6X:

0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % (w/v) Glycerin

#### **2.4.1.5 Plasmidpräparation aus *E. coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli* wurde mit Hilfe des Nucleo-Spin Plasmid Kits (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Diese Methode kombiniert die alkalische Lyse der Bakterienzelle mit der Aufreinigung der Plasmid-DNS durch Bindung an eine Kieselgel-Membran, die sich in einer kleinen Säule befindet. Die Präparation erfolgte nach Arbeitsanweisung, allerdings erfolgte die Elution in 30 bis 50 µl H<sub>2</sub>O. Die auf diese Weise erhaltene DNS konnte aufgrund ihrer Sauberkeit für weitere Experimente verwendet werden.

#### **2.4.1.6 Plasmidpräparation aus *C. glutamicum***

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus *C. glutamicum* wurde ebenfalls mit Hilfe des Nucleo-Spin Plasmid Kits (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Abweichend zum Protokoll des Kits wurde das Zellpellet erst in 500 µl A1-Puffer mit 10 mg/ml Lysozym resuspendiert und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen zentrifugiert wurden (11000 x g, 1 min) und der Überstand verworfen wurde, wurde das Protokoll des Kits durchgeführt. Die Elution erfolgte auch bei dieser Plasmid-Präparation in 30 bis 50 µl H<sub>2</sub>O.

#### **2.4.1.7 Restriktion und Ligation von Plasmiden und PCR-Fragmenten**

Die Restriktion von DNS wurde mit Restriktionsenzymen von NEB (Frankfurt/Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden entweder mit dem NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) direkt oder durch Agarose-Gelelektrophorese in TAE-Puffer (siehe Punkt 2.4.1.4) gereinigt. Aus den Agarosegelen wurden die interessierenden DNS-Banden nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und die DNS wurde unter Verwendung des NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Die Ligation von DNS-Fragmenten wurde mit einer T4 Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Um die Anzahl der Kolonien pro Platte zu maximieren, wurden die Ansätze so gewählt, dass das Insert-Fragment in fünfmal höherer Konzentration eingesetzt wurde als das Vektor-Fragment. Für eine Transformation von 200 µl chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden 1 µl Ligationsansatz eingesetzt. Der Ansatz wurde für 2 bis 3 h bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert.

#### Ein Ligationsansatz wurde wie folgt angesetzt:

2 µl T4 Ligase

2 µl T4 Ligasepuffer

2 µl Plasmid

10 µl PCR-Fragment

#### **2.4.1.8 Interaktionsstudien mit einem Zwei-Hybrid-System**

Interaktionsstudien von Proteinen wurden mit einem bakteriellem Zwei-Hybrid-System durchgeführt. Das verwendete System basiert auf dem LexA-Repressor (Dmitrowa *et al.* 1998). LexA besitzt N-terminal eine DNS-Bindedomäne und C-terminal die Dimerisierungsdomäne und kann nur als Dimer die Transskription in *E. coli* reprimieren. Um Interaktionen von den Zielproteinen nachzuweisen, wurden die Zielgene *parA*<sub>1</sub>, *parA*<sub>2</sub>, *parB*, *ftsZ* und *divIVA* in das Plasmid pMS604 kloniert, welches als Fusionsgen die Bindedomäne des *lexA* Gens enthält. Desweiteren wurden die Gene *parA*<sub>1</sub>, *parA*<sub>2</sub>, *parB* und *ftsZ* in das Plasmid pDP804 inseriert, welches ebenfalls als Fusionsgen eine modulierte Bindedomäne des *lexA* Gens enthält, so dass eine Dimerisierung möglich ist, und die Fusionsproteine als Repressor agieren können. Dann wurde jeweils ein pMS604- und ein pDP804-Derivat in allen Kombinationen in die *E. coli* Stämme SU101 und SU202 transformiert. Sobald beide Fusionsproteine in einer *E. coli* Zelle exprimiert werden, kann eine Interaktion über die Funktionsfähigkeit des LexA-Repressors nachgewiesen werden. Wenn die LexA-Bindedomänen als Repressor fungieren, sind die beiden Zielproteine eine Interaktion eingegangen, die es erlaubt, dass die LexA-Bindedomänen dimerisieren. Die Aktivität des Repressors kann mit Hilfe des *lacZ* Gens dokumentiert werden, welches in das Genom der beiden Reporterstämme SU101 und SU202 kloniert wurde und unter Kontrolle von LexA steht. So ließ sich mit einem  $\beta$ -Galactosidase-Assay (2.3.9) eine Homo- (mit *E. coli* SU101) und eine Heterodimerisierung (mit *E. coli* SU202) der verschiedenen Proteine detektieren. Zusätzlich konnte auf MacConkey-Platten (Remel, Lenexa) mit 10% Lactose und 1 mM IPTG eine Interaktion der Proteine gezeigt werden. Bei Rotfärbung der Kolonien konnten die LexA-Bindedomänen nicht interagieren, es fand also keine Interaktion der Proteine statt.

#### **2.4.2 RNS Techniken**

##### **2.4.2.1 Präparation von Gesamt-RNS aus *C. glutamicum* und RNS-Gelelektrophorese**

Zur Präparation von Gesamt-RNS aus *C. glutamicum* wurde das NucleoSpin RNAIIKit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Zellen wurden tagsüber in 5 ml BHI bei 30 °C schüttelnd angezogen. Für die Übernacht-Kultur wurden 20 ml MMI mit

1 ml Vorkultur angeimpft und bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Übernacht-Kultur wurden 20 ml frisches MMI morgens auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 1 angeimpft und die Zellsuspension bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 5 bis 6 weiter inkubiert. Anschließend erfolgte die Probenentnahme, je 1 ml Zellsuspension in vorgekühlten 2 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (14.000 x g, 1 min, 4°C). Das Pellet wurde sofort in 350 µl RA1-Puffer, der vorher mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt wurde, resuspendiert, in einem 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Nach Auftauen der Zellsuspension auf Eis erfolgte der Zellaufschluss durch hochfrequentes Schütteln der Zellen im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) für 2 x 30 sek bei 6,5 m/sek. Zwischen den beiden Durchgängen wurden die Röhrchen für 2 min auf Eis abgekühlt, um eine starke Erwärmung der Zellsuspension zu verhindern. Anschließend wurden die entstandenen Zelltrümmer in einer 3 minütigen Zentrifugation bei 14.000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde mit 350 µl 70 %igen Ethanol versetzt und nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet. Während der Präparation wurde die RNS routinemäßig mit DNase behandelt. Zur Kontrolle der Präparation wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel unter UV-Licht betrachtet. Die Konzentration der erhaltenen RNS wurde über das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm im Photometer ermittelt. Die RNS wurde bei -80°C eingefroren.

### Gelladepuffer:

250 µl 100 %iges Formamid, deionisiert, 83 µl 37 %iges Formaldehyd, 50 µl 10 x MOPS-Puffer, 10 µl 2,5 % Bromphenolblau, 50 µl 100 % Glycerin, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml), ad 500 µl RNase-freies Wasser

### **2.4.2.2 RNS-Hybridisierung mittels Slot-Blots**

Zur Untersuchung der Transkription von Genen wurden Slot-Blots durchgeführt. Ca. 3 µg Gesamt-RNS pro Slot wurden mit 100 µl 10x SSC verdünnt und mittels einer Slot-Blot-Apparatur (Hybridisation Manifold SHM-48, Fisherbrand) unter langsamen Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBond<sup>TM</sup> Nylon Membrane, Sigma, Taufkirchen) aufgetragen. Nach Trocknen der Membran wurde die RNS

durch UV-Bestrahlung in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) fixiert ( $125 \text{ mJ/cm}^2$ ) Membran wurde dann 1 h bei  $50^\circ\text{C}$  in 15 ml Hybridisierungslösung blockiert. Nach Erwärmen auf  $68^\circ\text{C}$  wurde 1  $\mu\text{l}$  DIG-markierte RNS-Sonde zugegeben und bei dieser Temperatur die Hybridisierung über Nacht durchgeführt. Zur Entwicklung der Blots wurde die Membran zweimal in 20 ml Waschlösung 1 bei  $20^\circ\text{C}$  für je 15 min gewaschen, dann zweimal in 20 ml Waschlösung 2 bei  $68^\circ\text{C}$  für je 25 min. Nach kurzem Waschen mit Waschpuffer bei  $20^\circ\text{C}$  wurde die Membran durch 30 min Inkubation bei  $20^\circ\text{C}$  in 20 ml 1x Blocking-Reagenz blockiert. Hierauf wurden 2  $\mu\text{l}$  Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim; Verdünnung 1:10.000) zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 20 min wurde die Membran für 3 min in Detektionspuffer inkubiert, mit CSPD-Lösung benetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nach 15 min Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  konnten die Signale mittels eines Fuji luminescent image analyzer LAS 100 (Raytest, Straubenhardt) detektiert werden. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte mit Hilfe der Software AIDA 2.0 (Raytest, Straubenhardt).

### Hybridisierungslösung:

pro 100 ml: 50 ml Formamid, 20 ml 10x Blocking-Reagenz, 25 ml 20x SSC, 1 ml 10 %iges Na-Lauroylsarkoniat, 200  $\mu\text{l}$  10 %iges SDS, ad 100 ml Wasser.

### 20x SSC:

3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat, pH (HCl) = 7,0.

### Waschlösung 1:

2x SSC, 0,1 % SDS.

### Waschlösung 2:

0,2x SSC, 0,1 % SDS.

### Maleinsäurepuffer:

0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) = 7,5.

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20.

10x Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim) wurden auf 100 ml mit Maleinsäurepuffer aufgefüllt und durch Erwärmen auf 60°C in der Mikrowelle unter Rühren gelöst. Bei Bedarf wurde die fertige Lösung mit Maleinsäurepuffer weiter verdünnt.

Detektionspuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH (NaOH) = 9,0.

CSPD-Lösung:

1:100-Verdünnung von CSPD-Reagenz (Roche, Mannheim) in Detektionspuffer.

#### **2.4.2.3 Präparation von RNS-Sonden durch *in vitro* Transkription**

Zur Untersuchung der Expression einzelner Gene wurden Digoxigenin-markierte antisense-RNS-Sonden verwendet. Zur Herstellung dieser Sonden wurde ein ca. 0,5 bis 1 kb großes Fragment des entsprechenden Gens mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde an den downstream-Primer die Promotorsequenz für die RNA-Polymerase T7 gehängt. Für eine optimale Transkription benötigt die RNA-Polymerase zudem noch 6 weitere Basen *upstream* der Promotorsequenz. Daher wurden die Basen 5'-GCGCGC ebenfalls an diesen Primer gehangen. Nach der Amplifikation mittels PCR wurde das DNS-Fragment über eine Gelelektrophorese gereinigt und als *template* in einem *in vitro* Transkriptionsansatz eingesetzt. Zur Markierung der entstehenden RNS-Sonden diente Digoxigenin-11-dUTP. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µg PCR-Fragment in RNase-freiem Wasser
- 2 µl DIG RNA Labeling Mix (Roche, Mannheim)
- 2 µl 10x Transcription Buffer (Roche, Mannheim)
- 1 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- 2 µl T7 RNA-Polymerase (Roche, Mannheim)

Die *in vitro* Transkription wurde 2 h bei 37°C durchgeführt. Das *template* wurde durch Zugabe von 1 µl DNase (Roche, Mannheim) und 30 min Inkubation bei 37°C entfernt. Die Sonde wurde schließlich bei -80°C aufbewahrt. Zur Hybridisierung wurde 1 µl des Ansatzes verwendet.

#### **2.4.2.4 Southern Blot**

Für den Southern Blot wurde DNS, wie in 2.4.1.1 beschrieben, aus den Stämmen AS6, AS7 und AS8 isoliert und mit ca. 1 µg der DNS mit EcoRI eine Restriktion durchgeführt. Die verdaute DNS wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Dafür wurde das Gel für 30 min denaturiert und danach für 30 min neutralisiert. Danach wurde das Gel einmal für 5 min in 10 x SSC gespült. Das mit 10 x SSC befeuchtete Gel wurde durch langsames Durchsaugen mittels eines Vakuums (50mbar, für 2 bis drei Stunden) auf eine Nylonmembran (BioBond™ Nylon Membrane, Sigma, Taufkirchen) übertragen. Anschließend wurde die Nylonmembran mit der fixierten DNS in einem Hybridisierungsröhrchen für mindestens 1 h mit Hybridisierungslösung bei 68°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Die markierte DNS wurde für 10 min denaturiert und in das Hybridisierungsröhrchen hinzugegeben und ÜN bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Sonde abgossen und die Membran für 2 x 15 min mit 2 x SSC (mit 0,1 % SDS) bei RT gewaschen und danach noch 2 x für 15 min bei 68°C mit 0,1 x SSC (0,1 % SDS). Die Membran wurde für den immunologischen Nachweis für 1 min in 10 ml Puffer 1 gewaschen und dann für 30 min in 10 ml Puffer 2 inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 10 ml Puffer 1 für 5 min gewaschen und wiederum für 30 min mit 10 ml Antikörper-Konjugatlösung inkubiert. Nach folgenden zweimaligen Waschen mit jeweils 10 ml Puffer 1, wurde die Membran mit 10 ml Puffer 3 für 2 min equilibriert. Für die Detektion wurde die Membran mit 10 ml Puffer 3 mit NBT und BCIP im Dunkeln inkubiert, bis sich sichtbare Signale entwickelt haben.

Für die Herstellung der DNS-Sonden wurde das DIG DNA Labeling and Detection Kit von Roche, Mannheim verwendet. Dafür wurde nach dem im Kit vorhandenen Protokoll verfahren.

#### Denaturierungspuffer:

0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl



Neutralisationspuffer:

M Tris, 2 M NaCl, pH 7,5

10 x SSC:

1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Citrat, pH7,0

Hybridisierungslösung:

5 x SSC; 1 % Blocking Reagenz (2.4.2.2); 0,1 % N-Laurylsarkosin, Na-Salz; 0,02 % SDS

Puffer 1:

100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5

Puffer 2:

0,5 % Blocking-Reagenz (2.4.2.2)

Puffer 3:

100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5

## **2.5 Techniken zur Manipulation von Zellen**

### **2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen**

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Zunächst wurden *E. coli* Zellen tagsüber in 20 ml LB-Medium kultiviert; von dieser Vorkultur wurde abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) in einen 2 l Schüttelkolben gegeben und die Zellen unter Schütteln über Nacht bei 22°C angezogen. Morgens, als die Zellen ungefähr eine optische Dichte von 0,6 hatten, wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4°C) und in 6,4 ml TB-Puffer resuspendiert. Langsam wurden 0,4 ml 100% DMSO zugegeben, die Zellen in 200 µl Portionen

aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

TB-Puffer:

10 mM Pipes, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl, 55 mM  $\text{MnCl}_2$ , pH (KOH) = 6,7

SOB-Medium:

5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,125 g NaCl, 625  $\mu\text{l}$  1 M KCl wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst und auf 250 ml aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren für 20 Minuten bei  $121^{\circ}\text{C}$  wurden 1,25 ml steriles 2 M  $\text{MgCl}_2$  zugegeben.

### **2.5.2 Herstellung kompetenter *C. glutamicum* Zellen**

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl *et al.* (1989) hergestellt. Die Zellen wurden tagsüber in 5 ml LB-Medium mit 2 % Glukose vorkultiviert. Aus dieser Vorkultur wurden abends 200 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren in einem 2 l Schüttelkolben auf eine optische Dichte von 0,2 bis 0,3 angeimpft. Die Zellen wurden dann unter Schütteln (200 rpm) über Nacht bei  $22^{\circ}\text{C}$  angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach 10-minütiger Kühlung auf Eis abzentrifugiert (4.000 x g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und in 80 ml 10 %igem (v/v) sterilem, eiskaltem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (4.000 x g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und die Waschprozedur in 10 %igem (v/v) sterilem, eiskaltem Glycerin viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellpellets in 1 ml 10 %igem (v/v) sterilem, eiskaltem Glycerin resuspendiert, in 100  $\mu\text{l}$  Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren:

2 g Trypton, 1 g Hefeextrakt, 1 g NaCl, 5 g Glycin, 0,8 g Isonicotinsäurehydrazid, 200  $\mu\text{l}$  Tween 80 wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst und auf 200 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

### **2.5.3 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen**

Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte mit Hilfe des Hitzeschockverfahrens. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zu 200  $\mu\text{l}$  Zellen 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNS bzw.

Ligationsansatz gegeben, der Ansatz gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNS erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 30 Sekunden. Die Zellen wurden erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach zur Regeneration nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) für eine Stunde bei 37°C und 135 rpm geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 x g, 1 min, 37°C) das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf eine Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum auf LB-Agar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte einen Tag bei 37°C.

#### SOC-Medium:

5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 0,125 g NaCl, 0,9 g Glukose, 625 µl 1 M KCl, 1,25 ml steriles 2 M MgCl<sub>2</sub> wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 250 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

#### **2.5.4 TSS-Transformation von *E. coli* BL21 Zellen**

Eine Überexpression von Proteinen erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) / pLysS Zellen, die mit dem pET-16B-Plasmid über die TSS-Methode nach Chung *et al.* (1989) transformiert wurden. Die Zellen wurden morgens in 5 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden 1,5 ml Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13.000 x g, 1 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl TSS-Lösung resuspendiert. Für den Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2 µl Plasmid-DNS vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 135 rpm zur Regeneration geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 x g, 1 min, 37°C), das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte einen Tag bei 37°C.

#### TSS-Lösung:

10 g Polyethylenglykol, 5 ml 100 %iges DMSO, 5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 50 ml 2x LB-Medium wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

### **2.5.5 Elektroporation von kompetenten *C. glutamicum* Zellen**

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen von *C. glutamicum* auf Eis aufgetaut und 50 µl der Zellen in eisgekühlte, sterile Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) pipettiert. Es wurden 3 µl Plasmid-DNS zugegeben und die Ansätze vorsichtig gemischt. Unter Einsatz von Hochspannungspulsen wurden die Zellen im BIORAD Gene-Pulser (BIORAD GmbH, München) bei 2,5 kV Spannung, 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Die Zeitkonstanten lagen bei optimaler Durchführung im Bereich von 12 ms. Sofort nach dem Elektroschock wurde 1 ml BHIS-Medium zugegeben, die Zellen wurden gründlich resuspendiert, die Zellsuspension wurde in sterile Kulturröhrchen überführt und zur Regeneration im Rundschüttler (125 rpm) bei 30°C für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde zentrifugiert (13.000 x g, 1 min, 30°C), das Pellet im Rückfluss resuspendiert und auf BHI-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte 1 bis 2 Tage bei 30°C.

#### BHIS-Medium:

1,8 g BHI-Medium und 4,55 g D-Sorbitol wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 50 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Filtration.

### **2.5.6 DNS-Transfer mittels Konjugation**

Die Konjugation wurde als Alternative zur Elektroporation eingesetzt. Zunächst wurde das entsprechende Plasmid in den *E. coli* Stamm S17-1 transformiert. Dafür wurden 5 ml LB Kultur am Morgen auf OD<sub>600</sub> 0,01 angeimpft und unter schütteln bei 37°C bis zu einer OD von bis OD 0,3 bis 0,4 inkubiert. Nach Zentrifugation (8000 x g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in TSS-Medium resuspendiert (2.5.4) und 4 bis 6 µl des gewünschten Plasmids zugegeben. Danach wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und über Nacht auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotikum bei 37° C inkubiert.

Für eine Konjugation wurden 20 ml LB-Medium mit Antibiotikum mit einer Vorkultur von transformierten S17-1 Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1 wurden die S17-1 Zellen auf Eis gelagert. Währenddessen wurden 100 ml LB-Medium mit einer Vorkultur von Cg RES 167 auf eine OD<sub>600</sub> von 1 angeimpft und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 5

inkubiert. Anschließend wurden 10 ml dieser Kultur einem Hitzeschock bei 48,5°C für mindestens 9 min unterzogen. Dann wurden 3 ml der Cg RES 167 Kultur mit 1 ml *E. coli* S17-1 Zellen gemischt, zentrifugiert (4000 x g, 5 min, RT) und in ca. 100 µl Rückfluß resuspendiert. Es wurden sterile Filter (2,2 cm, Millipore, Billerica) auf LB-Platten gelegt (ohne Antibiotikum) und je 100 µl der Zellsuspension auf die Filter pipettiert. Nach Inkubation für 20 Stunden bei 30° C wurden die Filter mit den Zellen in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelegt und mit 600 µl BHI-Medium abgeschwemmt. Die Zellsuspension wurde auf BHI-Platten mit Nalidixinsäure und entsprechendem Anitbiotikum bei 30° C inkubiert.

### **2.5.7 Konstruktion von Insertionsmutanten**

Eine Insertionsmutante wurde konstruiert, um ein Gen spezifisch zu duplizieren. Es wurden zunächst Primer verwendet, die Start und Stop des gewünschten Gens binden können. Nach einer PCR wurde das entstandene Fragment in den Vektor pk18mob ligiert, der ein Kanamycin-Resistenz-Gen enthält. Die elektrokompetenten *C. glutamicum* Zellen wurden nun durch das Plasmid per Elektroporation transformiert. Durch homologe Rekombination wurde das Fragment mit dem Plasmid in die genomische DNS der Zelle eingebaut. So erhielt die Zelle ihre Resistenz. Die Sequenz des Gens war durch das Plasmid mit der selben Sequenz unterbrochen und begann hinter dem Plasmid wieder mit den Basen des ursprünglichen PCR-Fragments. Damit war das Gen hinter dem ursprünglichen Gen inseriert. Zellen des Insertionsstamms mussten immer mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert werden, da sonst das eingefügte Plasmid nicht in dem Konstrukt bleibt und wieder der Wildtyp entsteht. Auf diese Weise konnten Gene mit eigener Promotorsequenz und auch Fusionen mit Genen, die für fluoreszierende Proteine kodieren, inseriert werden. Für die Konstruktion translationaler Fusionproteine, darf für eine N-terminale Fusion das Gen für das fluoreszierende Protein kein Stop-Kodon besitzen. Für eine C-terminale Fusion darf das Gen aus *C. glutamicum* kein Stop-Kodon besitzen, damit jeweils die gesamten Fusionsproteine synthetisiert werden können. Deletionen von Zellteilungsproteinen sind meist lethal und Fusionsproteine können in ihrer Funktionalität eingeschränkt sein. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz gewählt, um Auswirkungen verschiedener Proteine auf den Phänotyp der Zellen, aber auch eine subzelluläre Lokalisation der Proteine durch N- oder C-terminale GFP-Fusion analysieren zu können.

### **2.5.8 Konstruktion von Deletionsmutanten**

Für eine Konstruktion von Deletionsmutanten von *C. glutamicum* wurde der Vektor pk18mobsacB verwendet. Es wurden jeweils 600 bis 800 Basen *upstream* und *downstream* des gewünschten Gens amplifiziert, ligiert und in den Vektor inseriert. Durch Elektroporation wurde das Plasmid in die Zellen eingebracht. Durch homologe Rekombination inseriert das Plasmid um das gewünschte Gen. Nach Selektion auf Saccharose rekombiniert der Vektor mit dem Gen aus dem Genom, wodurch das gewünschte Gen deletiert wird. Dafür wurden positive *C. glutamicum* Klone einer Vorkultur in BHI-Medium mit Kanamycin geerntet und in CGXII-Medium mit 0,5 % Glukose und ohne weitere N+P-Quellen resuspendiert. Es erfolgte eine anschließende Inkubation für ca. 6 h bei 30°C / 175 rpm. Die Zellen wurden dann auf BHI-Agarplatten mit 10 % Saccharose ausplattiert und mind. 2 Tage 30°C inkubiert.

#### CGXII-Medium:

42 g/l MOPS, 20 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/l Harnstoff, 1,26 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## **2.6 Fluoreszenzmikroskopie**

### **2.6.1 Subzelluläre Lokalisation von fluoreszierenden Fusionsproteinen**

Die konstruierten *C. glutamicum* bzw. *E. coli* Stämme, welche GFP- oder YFP-Fusionsproteine exprimieren, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Mit dieser Methode konnte die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine innerhalb der Zellen auch über längere Zeiträume hinweg (siehe 2.6.2) verfolgt werden. Für Aufnahmen der Präparate wurde das Fluoreszenzmikroskop Zeiss AxioImager M1, das mit der Kamera Zeiss AxioCam HRm ausgestattet war, benutzt. Als Objektiv dienten EC Plan-Neofluar 100x/1,3 Oil Ph3 für Phasenkontrastaufnahmen oder ein Planapochromat 100x/1,4 DIC (=Differentialinterferenzkontrast) für DIC-Aufnahmen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Filterset bestehend aus einem DIC-Filter, HE eGFP-Filter (38), HE Cy3-Filter (43), DAPI-Filter (49), HE YFP-Filter (46) und HE CFP-Filter (47). Die genauen Angaben sind in Tabelle 2.6.1 zusammengefasst.

**Tab. 2.6.1:** Daten der verwendeten Filtersätze.

Filtersatz (shift free)	Anregung (EX)	Strahlteiler (FT)	Emission (EM)
HE eGFP (38)	470/40	495	525/50
HE Cy 3 (43)	550/25	570	605/70
HE YFP (46)	500/25	515	535/30
HE CFP (47)	436/25	455	480/40
DAPI (49)	365	395	445/50

Es wurden 2  $\mu$ l einer Zellkultur auf Objektträger pipettiert, welche zuvor mit 1 ml 1,5 %iger Agarose dünn beschichtet wurde. Dies diente zur Fixierung der Zellen während der Mikroskopie. Für Mitomycin-Experimente wurden die Zellen zuvor 2 bis 4 h mit 2  $\mu$ g/ml Mitomycin inkubiert. Zur Färbung der DNS wurden 10  $\mu$ l Kultur mit 1  $\mu$ l DAPI (1  $\mu$ g/ml; Sigma, Deisendorf) und für die Membranfärbung mit 1  $\mu$ l Nile Red (12,5  $\mu$ g/ml; Molecular Probes, Carlsbad, USA) gemischt. Für die Detektion der GFP- oder YFP-fusionierten Proteine bzw. der FITC-gebundenen Antikörper, wurde ein GFP-Filter benutzt. Eine DAPI-Färbung der DNS wurde durch einen Blau-Filter und die Membranfärbung sowie die an TRITC-gebundenen Antikörper konnten durch einen Rot-Filter sichtbar gemacht werden. Alle Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M1 (Carl Zeiss, Jena) aufgenommen und wurden mit der Software AxioVision version 4.6 analysiert. Die Weiterbearbeitung der Bilder wurde mit Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Incorporated) vorgenommen.

### 2.6.2 Zeitreihenaufnahmen

Für Zeitreihenaufnahmen wurden 2  $\mu$ l einer Zellkultur auf Objektträger pipettiert, welche zuvor mit 1 ml 1,5 %iger Agarose, in R2A-Agar gelöst, dünn beschichtet wurde. Der R2A-Agar diente zur Nährstoffversorgung der Zellen, während das Minimalmedium die Mikroskopie nicht beeinträchtigte. Die Zellen konnten so mehrere Stunden bei 20 bis 30°C mikroskopiert werden. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen (1 bis 30 min) dokumentiert, wodurch eine Mobilität von Fusionsproteinen über die Zeit, aber auch Längenwachstum und Teilung der Zellen verfolgt werden konnte.

R2A-Medium:

0,5 g Hefeextrakt, 0,5 g Pepton, 0,5 g Casein Hydrolysat, 0,5 g Glukose, 0,5 g lösliche Stärke, 0,3 g Na-Pyruvat, 0,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g MgSO<sub>4</sub>, pH auf 7,2 eingestellt

**2.6.3 Immunofluoreszenz**

Die Immunofluoreszenz wurde eingesetzt, um die Lokalisation von bestimmten Proteinen innerhalb von fixierten Zellen sichtbar zu machen. Dafür wurden 500 µl einer in der exponentiellen Phase befindlichen Zellkultur geerntet. Für Mitomycin Experimente wurden die Zellen zuvor 2 bis 4 h mit 2 µg/ml Mitomycin inkubiert. Das Pellet wurde in 250 µl Fixierlösung aufgenommen und erst 10 min bei RT und anschließend 50 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurde das Pellet in GTE-Lösung mit Lysozym (2 mg/ml) und 0,4 %igem CTAB gemischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Dann wurde jeweils 10 µl der Probe in *wells* der Objektträger (mit poly-L-Lysin, Menzel GmbH, Braunschweig) pipettiert und trocknen gelassen, damit sich die Zellen anhaften konnten. Nachdem die Objektträger trocken waren, wurden sie erst 5 min mit –20°C kaltem Methanol und danach für 30 sek in –20°C kaltem Aceton behandelt. Nach dem Trocknen wurde auf die Kavitäten jeweils 10 µl Blockierlösung pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Objektträger wieder getrocknet. Anschließend wurde auf die Proben jeweils der 1. Antikörper (1:500 in Blockierlösung) dazugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde jeweils 2 x mit 200 µl PBS gewaschen und dann jeweils 10 µl des 2. Antikörpers (1:2000 in Blockierlösung) hinzugefügt. Nach 1 h Inkubation wurde abermals 2 x mit jeweils 200 µl PBS gewaschen. Dann wurde jeweils 10 µl 1 x DAPI auf die Proben pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Nach anschließenden einmaligen Waschen mit PBS wurden die Proben mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame) beschichtet und mit einem Deckglas bedeckt.

Fixierlösung:

2,4 % (v/v) Formaldehyd, 0,04 % (v/v) Glutaraldehyd, 30 mM Na-PO<sub>4</sub> (pH 7,5)

GTE-Lösung:

50 mM Glukose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym (frisch ansetzen)



PBS-Puffer:

8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH = 7,4

Blockierlösung :

2 % BSA in PBS

### **2.6.4 Mikroskopie von Proteinpolymeren**

Das Fluoreszenzmikroskop wurde eingesetzt, um Polymerstrukturen der Proteine zu untersuchen. Für FtsZ, ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> wurde der Phasenkontrast verwendet, während für die GFP-Fusionsproteine zusätzlich der GFP-Filter benutzt wurde.

Für einen 10 µl-Ansatz wurde folgendes gemischt:

4 µl Polymerisationspuffer (50 mM Mes/NaOH, 50 mM KCl; pH 6.5)

1 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub>

1 µl 10 mM ATP / GTP

4 µl gereinigtes Protein in Elutionspuffer (2.3.6)

Nach einer Inkubation von 10 min bei RT hatten sich sichtbare Filamente gebildet, welche analysiert und dokumentiert werden konnten.

### III. Ergebnisse

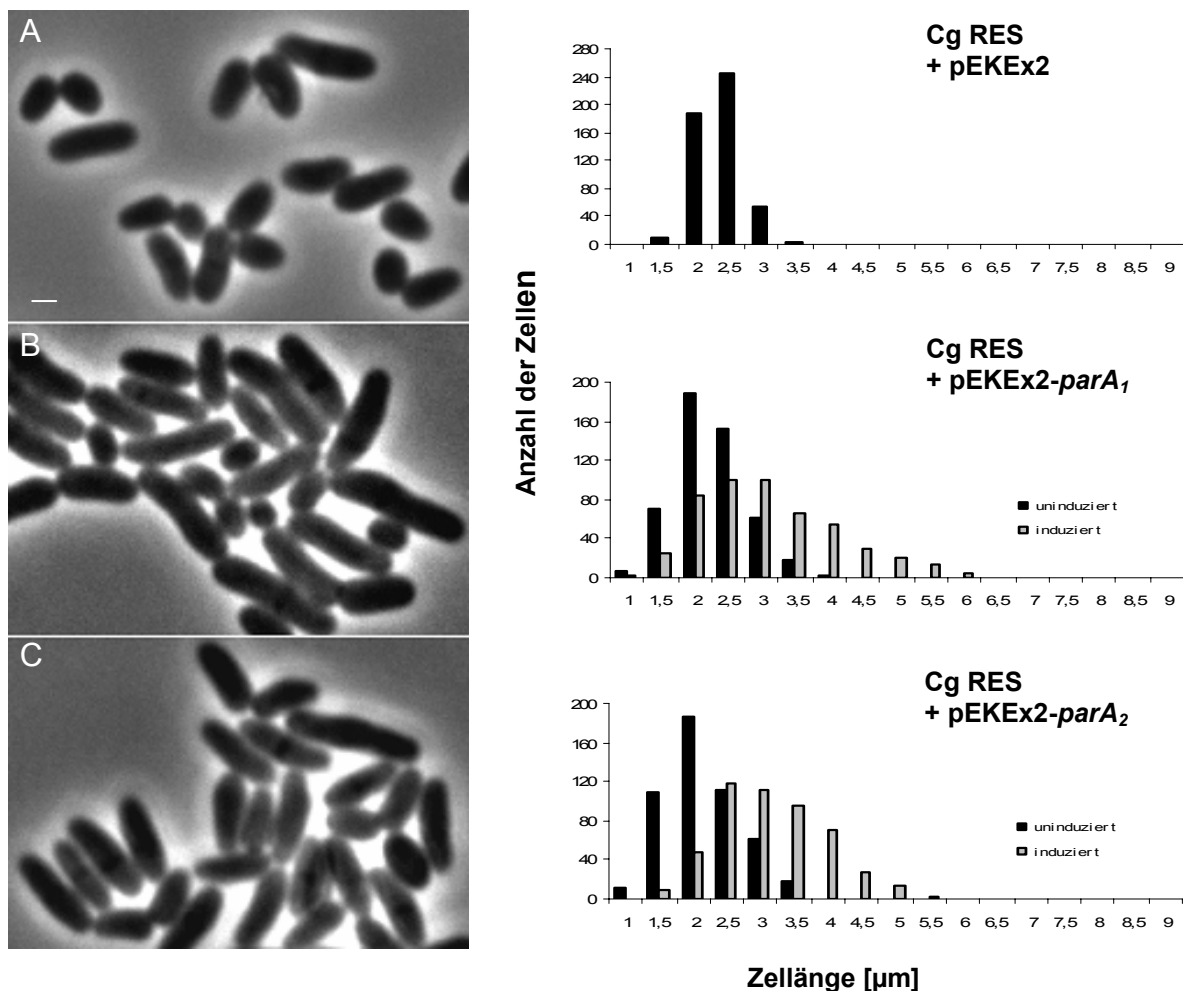
Genomweite BLAST-Analysen zeigten, dass *C. glutamicum* viele Gene fehlen, die in anderen bakteriellen Modellorganismen für essentielle Zellteilungsproteine kodieren. Besonders auffällig ist dabei, dass in *C. glutamicum* bisher keine Proteine identifiziert werden konnten, die in verschiedenen stäbchenförmigen Bakterien, wie *B. subtilis* oder *E. coli*, positive oder negative Regulatoren der FtsZ Polymerisation darstellen. Häufig besitzen diese Modellorganismen ein Min System, welches durch Inhibition der Polymerisation von FtsZ die Lokalisation der Zellteilungsebene negativ reguliert. Da MinD, ein Protein des Min Systems, eine Verwandtschaft zu den ParA Proteinen aufweist, wurde das Par System hinsichtlich einer möglichen Funktion als Regulator der Lokalisation der Zellteilungsebene in *C. glutamicum* untersucht. Das Par System besteht in *C. glutamicum* aus dem *parA<sub>1</sub>B* Operon (*cg3426* und *cg3427*), welches nahe dem *oriC* gelegen ist, und einer zweiten ATPase ParA<sub>2</sub> (*cg1610*). Zudem sollte überprüft werden, ob das Par System die Funktion der Chromosomensegregation übernimmt, wie es für z.B. *V. cholerae* beschrieben ist (Fogel & Waldor, 2006) oder andere, weitere Funktionen erfüllt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte, neben der Identifizierung potentieller *parS* Domänen für die spezifische Bindung von ParB, die Funktion von ParA<sub>2</sub> innerhalb des Par Systems charakterisiert werden.

#### **3.1 Überexpression und Lokalisation von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>**

##### **3.1.1 Extrachromosomale Überexpression von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>**

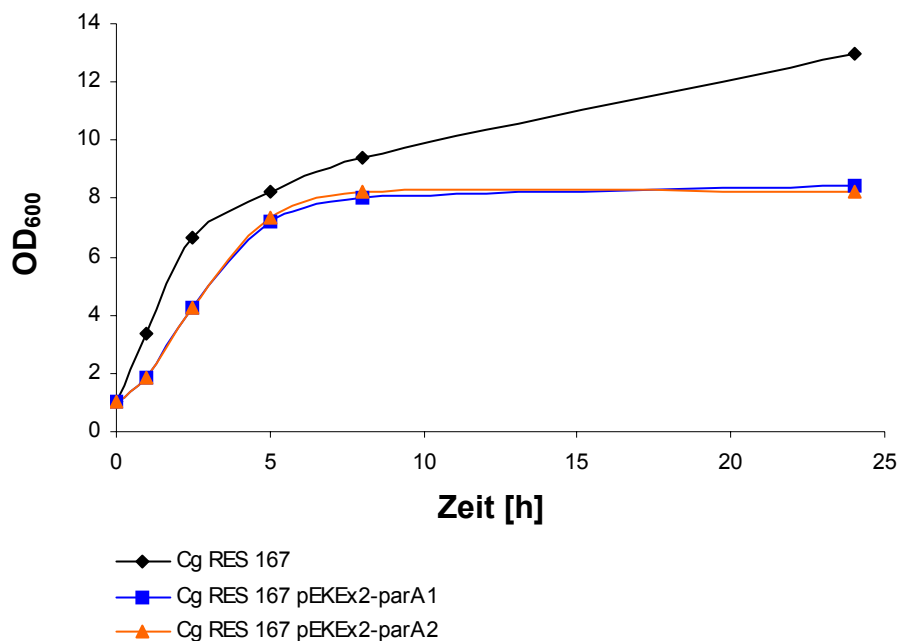
Um eine mögliche Funktion der drei Par Proteine, ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und ParB, in *C. glutamicum* aufzeigen zu können, wurde versucht, die drei Gene zu deletieren. Da es nach vielen Versuchen mit unterschiedlichen Methoden nicht gelungen ist, diese Gene mittels des Deletionsvektors *pk18mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) aus dem Genom zu entfernen bzw. durch Insertion zu inaktivieren, wurde davon ausgegangen, dass alle drei Proteine in *C. glutamicum* essentiell sind. So liegt die Vermutung nahe, dass im Falle der beiden ATPasen keine Redundanz vorliegt und ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> während der Zellteilung unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Aufgrund der Tatsache, dass keine Nullmutanten konstruiert werden konnten, wurden mögliche Auswirkungen einer erhöhten intrazellulären Konzentration der

Proteine ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> zunächst durch Überexpression mittels induzierbarer Plasmide untersucht. Dafür wurden jeweils die Gene *parA*<sub>1</sub> und *parA*<sub>2</sub> in den Vektor pEKEx2 kloniert. Der Expressionsvektor pEKEx2 besitzt, neben einer Kanamycin Resistenzkassette, einen *lac* Promotor, weshalb die gewünschten Gene IPTG abhängig extrachromosomal exprimiert werden können. Um Auswirkungen dieser Expression auf den Phänotyp der Zellen beobachten zu können, wurden der Wildtyp mit Leerplasmid und die beiden Cg RES Stämme Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> bzw. Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub>, jeweils einmal induziert und einmal uninduziert, inkubiert und anschließend die Zelllängen ermittelt. Die Induktion erfolgte für drei bis vier Stunden mit 1 mM IPTG. In Abbildung 3.1 sind Phasenkontrastbilder der induzierten Stämme sowie die gemessenen Zelllängen aufgeführt.



**Abb. 3.1:** Links Phasenkontrastaufnahmen und rechts die jeweiligen Zelllängenverteilungen von Cg RES (A), Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> (B) und Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub> (C). Die Zellen wuchsen in BHI-Vollmedium und die induzierten Zellen wurden parallel mit 1 mM IPTG für 4 Stunden inkubiert. Die Induktion führte zu einer deutlichen Verlängerung der Zellen. Maßstabballen = 1 µm.

Die Induktion des Leerplasmids hatte keinerlei Veränderung des Phänotyps von Cg RES zur Folge (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation der Stämme Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> und Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub> ohne Induktion führte zu einer geringfügigen Veränderung der Zellängenverteilung gegenüber dem Wildtyp. So konnten insbesondere im Fall von Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub> vermehrt kürzere Zellen gemessen werden. Durch eine Induktion der Expression von ParA<sub>1</sub> bzw. ParA<sub>2</sub> hingegen wurden die Zellen signifikant länger. Zellen des Wildtyps besaßen eine durchschnittliche Länge von 2,09 +/- 0,32 µm. Wurde der Stamm Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> induziert, verlängerten sich die Zellen auf durchschnittlich 3,36 +/- 1,05 µm und Zellen von Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub> auf 3,41 +/- 0,79 µm. Neben dieser Verlängerung um über 60 %, entstanden insbesondere im Fall von Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> nach Induktion verkürzte Zellen. Zusätzlich war das Wachstum der beiden Stämme Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> und Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub> beeinträchtigt (Abbildung 3.2).



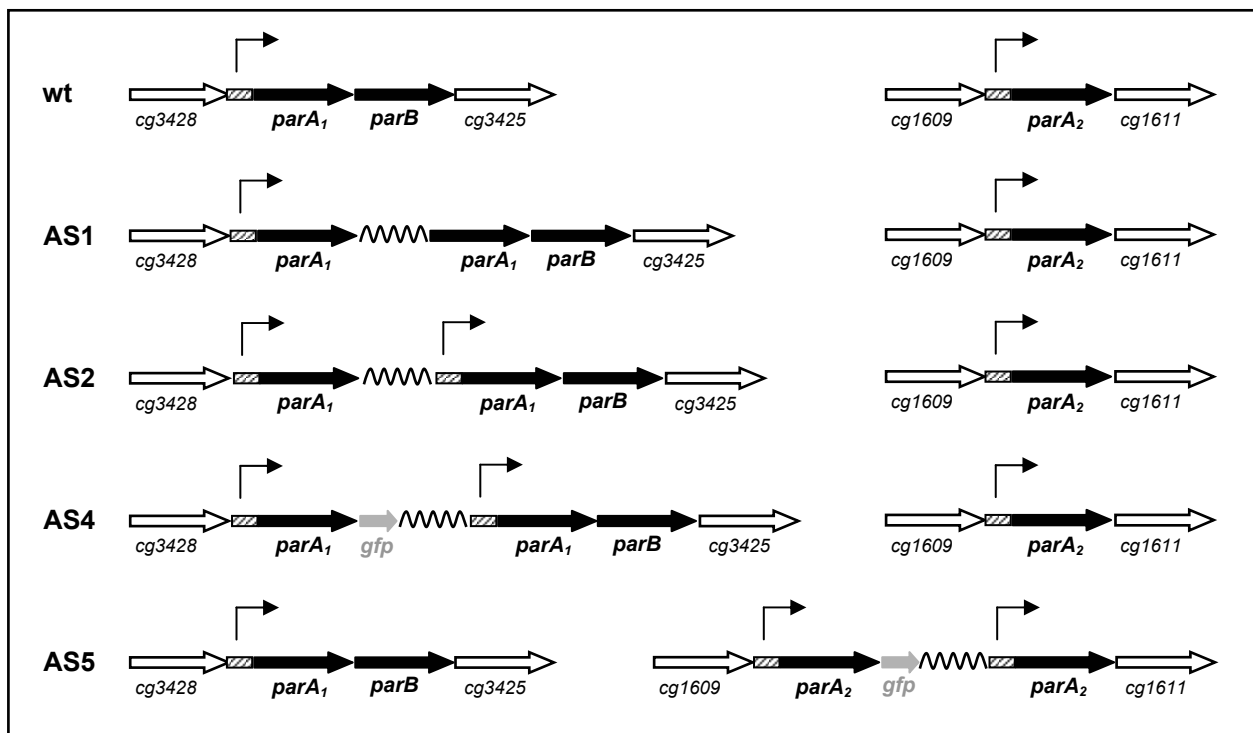
**Abb. 3.2:** Wachstumskurven von Cg RES, Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> und Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub>, jeweils in BHI-Vollmedium. Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub> und Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>2</sub> wurden jeweils mit 1 mM IPTG induziert.

Die Zellverlängerungen nach Überexpression von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> deuteten darauf hin, dass beide ATPasen, direkt oder indirekt, einen Einfluss auf die Platzierung des Septums in *C. glutamicum* ausüben könnten. Um den Einfluss der beiden Proteine

genauer zu untersuchen, wurde jeweils eine zusätzliche Kopie der Gene *parA<sub>1</sub>* und *parA<sub>2</sub>* unter Kontrolle des Wildtyp Promotors in das Genom von *C. glutamicum* inseriert.

### 3.1.2 Chromosomale Überexpression von ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP

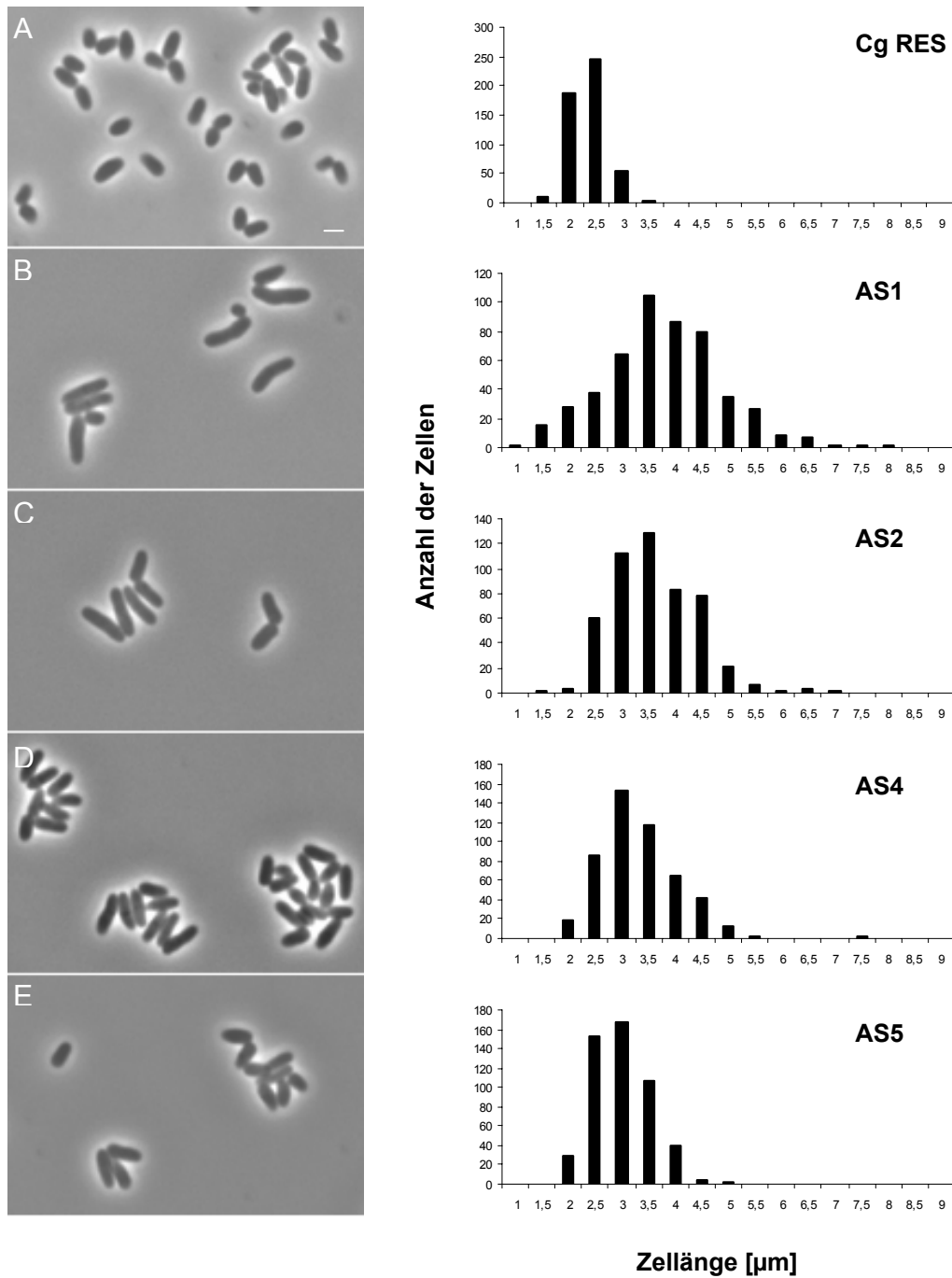
Ein Effekt der extrachromosomalen Überexpression von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> auf die Zellmorphologie konnte bereits aufgezeigt werden. Für weitere Untersuchungen wurde eine zweite Kopie der Gene *parA<sub>1</sub>* bzw. *parA<sub>2</sub>* in den entsprechenden Lokus in das Genom von *C. glutamicum* inseriert. Zusätzlich wurde jeweils *parA<sub>1</sub>-gfp* bzw. *parA<sub>2</sub>-gfp* mit der jeweiligen putativen Promotorsequenz neben das entsprechende Gen inseriert, um eine subzelluläre Lokalisation der Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich zu machen. Die Anordnung der *par*-Loki dieser Stämme, nach Integration der gewünschten Gene, ist in Abbildung 3.3 aufgeführt.



**Abb. 3.3:** Anordnung der *par*-Loki der Stämme Cg RES, AS1, AS2, AS4 und AS5. Die schraffierten Bereiche stehen für die Wildtyp-Promotoren.

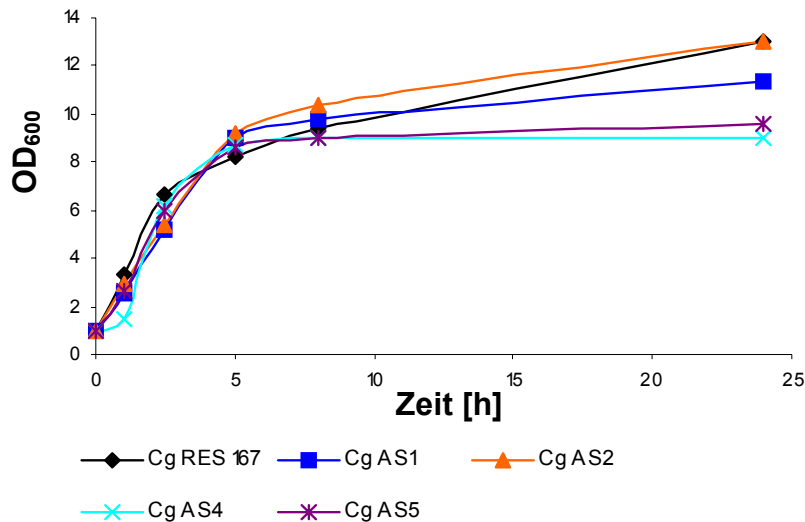
Die Insertionen wurden jeweils genetisch mittels PCR bzw. die Fusionsproteine auf Proteinebene durch Immunoblots nachgewiesen (Anhang 1). Die chromosomale Überexpression von *parA<sub>1</sub>* oder *parA<sub>2</sub>* bzw. *parA<sub>1</sub>-gfp* oder *parA<sub>2</sub>-gfp* führte ebenfalls

zu einer signifikanten Verlängerung der Zellen. Phasenkontrastbilder und die Zelllängenverteilungen sind in Abbildung 3.4 aufgeführt.



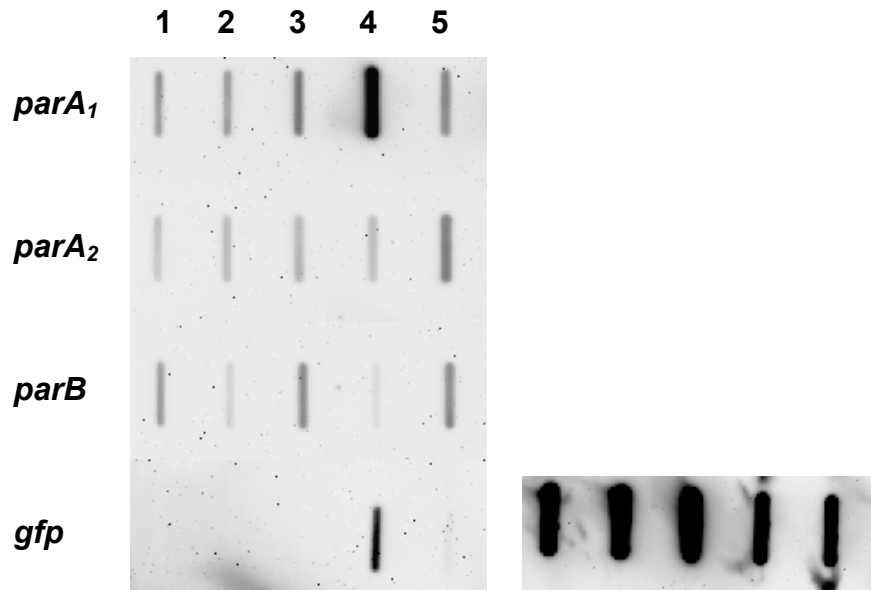
**Abb. 3.4:** Links Phasenkontrastaufnahmen und rechts die jeweiligen Zelllängenverteilungen von Cg RES (A), AS1 (B), AS2 (C), AS4 (D) und AS5 (E). Die Zellen wuchsen in BHI-Vollmedium. Die Insertion einer zweiten Kopie von *parA<sub>1</sub>* oder *parA<sub>2</sub>* führte zu einer deutlichen Verlängerung der Zellen. Maßstabbalken = 2 µm.

Stämme, welche eine zweite Kopie *parA*<sub>1</sub> besaßen (AS1, AS2 und AS4), wurden über 60 % länger als Wildtypzellen (Cg RES 2,09 +/- 0,32 µm, AS1 3,53 +/- 1,11 µm, AS2 3,36 +/- 0,79 µm und AS4 3,16 +/- 1,95 µm), während sie ein annähernd gleiches Wachstumsverhalten aufwiesen (Abbildung 3.5).



**Abb. 3.5:** Wachstumskurven von Cg RES, AS1 (+ *parA*<sub>1</sub>), AS2 (+ *parA*<sub>1</sub> mit Promotorsequenz), AS4 (+ *parA*<sub>1</sub>-*gfp* mit Promotorsequenz) und AS5 (+ *parA*<sub>2</sub>-*gfp* mit Promotorsequenz), jeweils in BHI-Vollmedium inkubiert. Die Mutanten zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp.

Den größten Teilungsdefekt zeigte der Stamm AS1. Die Zellängenverteilung dieses Stamms deckte ein breites Spektrum an Zellängen ab, da neben sehr langen Zellen auch Minizellen dokumentiert werden konnten. Dieser Phänotyp könnte einen polaren Effekt auf *parB* widerspiegeln, welche durch Insertion eines zweiten *parA*<sub>1</sub> Gens ohne putative Promotorsequenz in das *parA*<sub>1</sub>*B* Operon entstanden sein könnte. Dadurch wäre bei gleichzeitiger Steigerung der Expression von ParA<sub>1</sub> die Expression von ParB verringert. Es wurde bereits gezeigt, dass das Verhältnis von ParA zu ParB in anderen Organismen von großer Bedeutung ist (Mohl *et al.*, 2001). Diese Vermutung wurde durch RNS-Analysen bestätigt (Abbildung 3.6). Der Stamm AS1 enthielt deutlich geringere Konzentrationen an mRNA von ParB als der Wildtyp oder der Stamm AS2. In AS2 hingegen war diese Konzentration verglichen mit dem Wildtyp unverändert und dieser Stamm bildete keine Minizellen aus. Demnach entstehen durch Verringerung von ParB Zellteilungsdefekte, während die Überexpression von *parA*<sub>1</sub> zu Verlängerung der Zellen führt.



**Abb. 3.6:** Links: Slot-Blot der Gesamt-RNS aus Cg RES (1), AS1 (2), AS2 (3), AS4 (4) und AS5 (5). Die Insertion von *parA<sub>1</sub>* in das *parA<sub>1</sub>B* Operon ohne putative Promotorsequenz verminderte die Transkription von *parB* (2), während eine zusätzlich Promotorsequenz keinen negativen Einfluss auf *parB* aufwies (3). Die Integration von *parA<sub>1</sub>-gfp* in das *parA<sub>1</sub>B*-Operon mit putativer Promotorsequenz hingegen führte zu einer deutlichen Erhöhung der Transkription von *parA<sub>1</sub>* (4) und zeigte zudem einen polaren Effekt auf *parB*. In AS5 ist die Transkription von *parA<sub>2</sub>*, durch Integration von *parA<sub>2</sub>-gfp* mit putativer Promotorsequenz in den *parA<sub>2</sub>* Locus, erhöht (5). Die RNS Konzentration von *parA<sub>1</sub>-gfp* in AS4 ist deutlich höher als *parA<sub>2</sub>-gfp* in AS5. Rechts: Positiv-Kontrolle mit S16-RNS.

Zellen des Stammes AS5, in welche eine zweite Kopie *parA<sub>2</sub>-gfp* inseriert wurde, wiesen durchschnittliche Zelllängen von  $2,73 \pm 0,53 \mu\text{m}$  auf. Damit sind die Zellen bis zu 30 % länger als Wildtyp-Zellen ( $2,09 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ) und sind deutlich kürzer als extrachromosomal induzierte Zellen (Cg RES / pEKEx2-*parA<sub>2</sub>* mit  $3,41 \pm 0,79 \mu\text{m}$ ). Wahrscheinlich wurde in diesem Stamm unter Kontrolle des nativen Promotors weniger ParA<sub>2</sub> exprimiert, als in dem induzierten Stamm Cg RES / pEKEx2-*parA<sub>2</sub>*. Eine Kontrolle dieser Konzentration an ParA<sub>2</sub> durch einen Immunoblot konnte nicht durchgeführt werden, da kein ParA<sub>2</sub> Antikörper zur Verfügung stand.

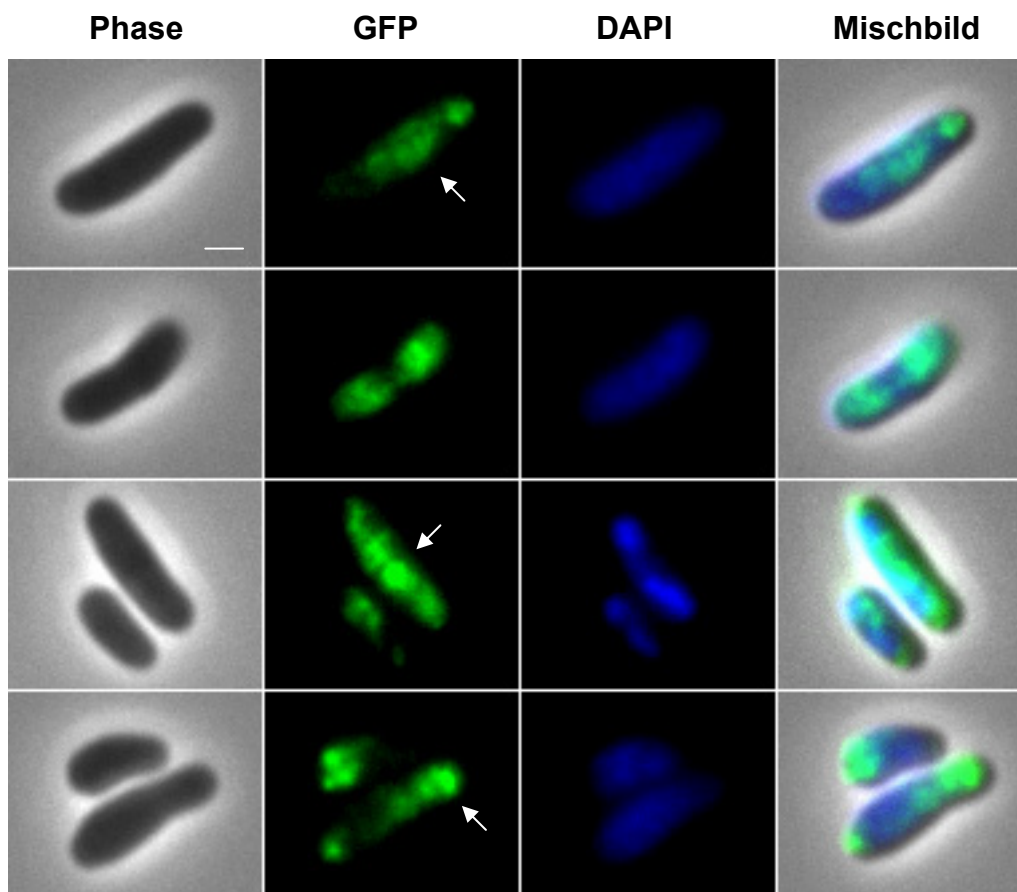
Die Ergebnisse zeigten, dass die Insertion einer zweiten Kopie der Gene *parA<sub>1</sub>* oder *parA<sub>2</sub>* in den jeweiligen Locus in das Genom von *C. glutamicum* zu einer deutlichen Verlängerung der Zellen führte. Denselben Phänotyp zeigte *C. glutamicum*, wenn ein Inhibitor der FtsZ Polymerisation, DivS, überexprimiert wurde (Ogino *et al.*, 2008). DivS wird in *C. glutamicum* während der SOS-Antwort nach DNS-Schädigung exprimiert. So könnte der Phänotyp der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Stämme dadurch zustande kommen, dass die beiden ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> in



*C. glutamicum* die FtsZ Polymerisation inhibieren. Dann könnte FtsZ nur durch eine Zellverlängerung, in Abhängigkeit von der Konzentration von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>, in der Mitte der Zellen polymerisieren. Um eine mögliche Funktion der beiden ATPasen während der Zellteilung bzw. die räumliche Kontrolle der Platzierung des zytokinetischen Rings ergründen zu können, wurde die Lokalisation der beiden Fusionsproteine ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP in den beiden Stämmen AS4 und AS5 analysiert.

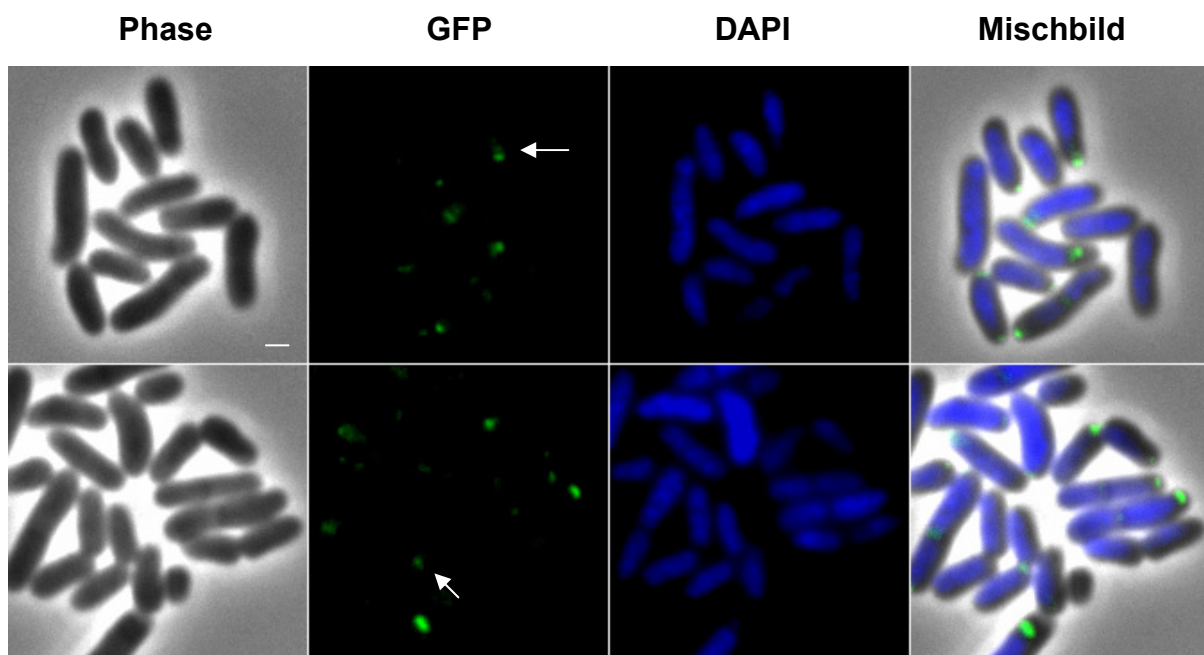
### 3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP

Die subzelluläre Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP in AS4 und ParA<sub>2</sub>-GFP in AS5 konnte fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert werden. In Abbildung 3.7 sind Bilder des Stammes AS4 aufgeführt.



**Abb. 3.7:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS4 für die Analyse der subzellulären Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP. Phase: Phasenkontrastbild, GFP: ParA<sub>1</sub>-GFP, DAPI: DNS. ParA<sub>1</sub>-GFP konnte ausschließlich auf dem Chromosom detektiert werden, welches nicht vollständig kondensiert vorlag. ParA<sub>1</sub>-GFP ist häufig polar oder an dem Septum lokalisiert, bildet aber auch große Strukturen über großen Teilen des Chromosoms aus (Pfeile). Maßstab Balken = 1 µm.

Auffallend ist, dass das Chromosom in den Zellen nicht kondensiert vorliegt und so einen großen Raum in den Zellen einnimmt. ParA<sub>1</sub>-GFP war ausschließlich über dem DNS detektierbar und wies die höchsten Konzentrationen an den Polen oder am Septum auf. ParA<sub>1</sub>-GFP konnte in kleineren Bereichen an den Polen lokalisiert sein, aber auch große Strukturen über weite Teile des Chromosoms ausbilden. Diese großen Strukturen besaßen die höchste Konzentration an den Polen oder am Septum. Die ausschließliche Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP über dem Chromosom konnte ebenfalls durch Expression in *E. coli* Zellen bestätigt werden (Anhang 2). ParA<sub>2</sub>-GFP ist ebenfalls an den Polen und dem Septum lokalisiert, wie man anhand der aufgeführten Bilder in Abbildung 3.8 erkennen kann. Allerdings bildete ParA<sub>2</sub>-GFP keine großen Strukturen aus, sondern ist nur in distinkten, kleinen Bereichen zu detektieren. Dabei liegen diese Bereiche immer am Pol oder am Septum der Zelle oder an einem polwärts gerichteten Bereich des Chromosoms.



**Abb. 3.8:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS5 für die Analyse der subzellulären Lokalisation von ParA<sub>2</sub>-GFP. Phase: Phasenkontrastbild, GFP: ParA<sub>2</sub>-GFP, DAPI: DNS. ParA<sub>2</sub>-GFP ist in distinkten Bereichen polar oder am Septum lokalisiert (Pfeile) oder an einem polaren Bereich des Chromosoms, welches nicht vollständig kondensiert vorliegt. Maßstabbalken = 1  $\mu\text{m}$ .

Die Ausbildung unterschiedlicher Strukturen deutet auf unterschiedliche Funktionen der beiden ATPasen hin. Um diese Funktionen näher zu untersuchen, wurden Zeitreihenaufnahmen von Zellen der Stämme AS4 und AS5 vorgenommen, um eine mögliche Mobilität dieser Proteine verfolgen zu können. Die Lokalisation von

ParA<sub>1</sub>-GFP bzw. ParA<sub>2</sub>-GFP innerhalb der Zellen der Stämme AS4 und AS5 konnte allerdings nicht über einen längeren Zeitraum dokumentiert werden, da die Fusionsproteine nach relativ kurzer Zeit ausbleichten (meist nach 3 Aufnahmen). Anhand der erhaltenen Bilder konnte allerdings kaum Mobilität von ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), die auch in Folge der Überexpression entstanden sein kann.

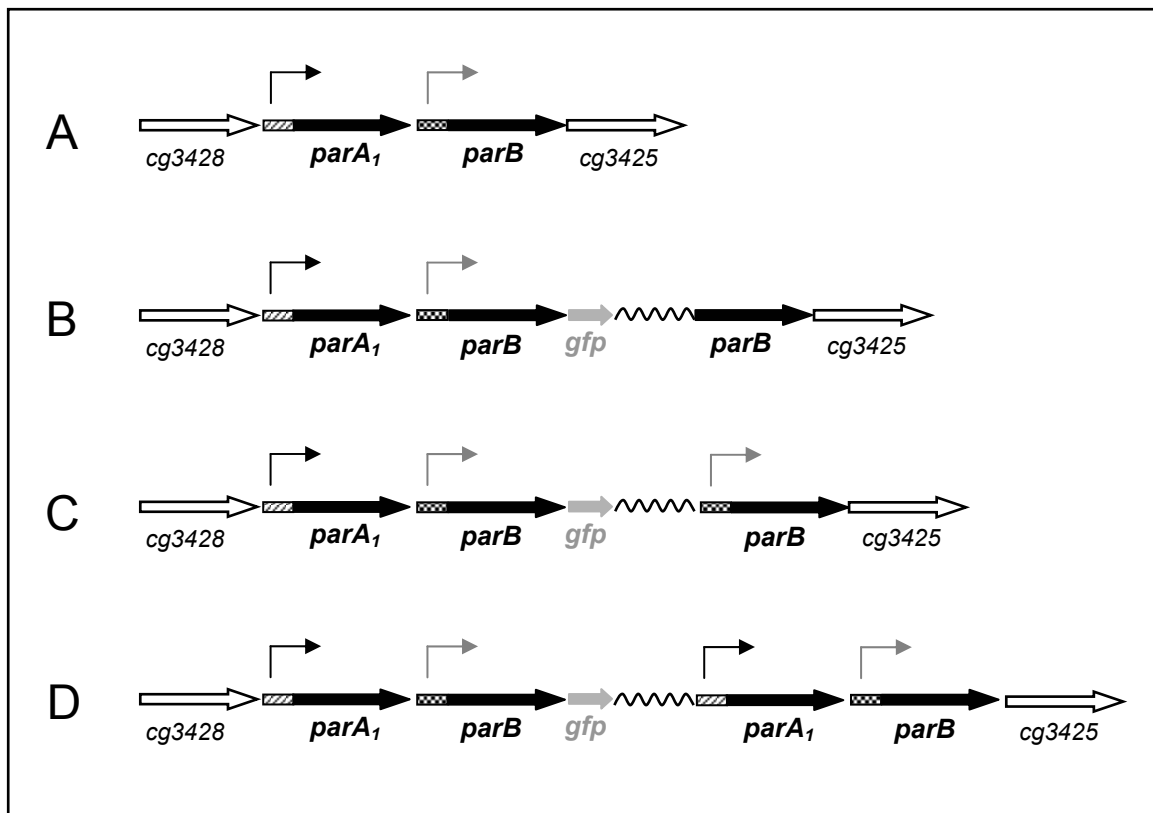
In klassischen ParAB Systemen wird durch die Bindung von ParB an das Chromosom die Rekrutierung von ParA an das Chromosom initiiert, wodurch die Segregation gestartet wird (Hester & Lutkenhaus, 2007). Für eine weitere Charakterisierung des Par Systems in *C. glutamicum* war es demnach wichtig, die Lokalisation von ParB zu untersuchen.

### **3.2 Lokalisation von ParB**

#### **3.2.1 Integration von *parB-gfp*, *parB+60-gfp* und *parA<sub>1</sub>+100-parB-gfp***

ParB bindet hochspezifisch an eine oder mehrere *parS* Sequenz(en), welche nahe des *oriC* gelegen sind (Autret *et al.*, 2001). So wäre zu erwarten, dass ParB des Par Systems aus *C. glutamicum* in einem Spot, bzw. während der Replikation und Segregation des Chromosoms, in zwei Spots auf dem Chromosom innerhalb der Zellen lokalisiert wäre, da *C. glutamicum* lediglich ein Chromosom besitzt. Um die Lokalisation von ParB fluoreszenzmikroskopisch verfolgen zu können, wurde ein *parB-gfp* Fusionsgen in das *parA<sub>1</sub>B* Operon inseriert. Da nicht bekannt war, ob eine ParB-GFP Fusion funktional sein würde, wurden drei verschiedene Plasmide konstruiert. Casart und Kollegen fanden heraus, dass in *Mycobacterium bovis* 60 Basenpaare zwischen den Genen *parA* und *parB* liegen. Diese 60 Basenpaare sind unüblich, da bisher beschrieben wurde, dass die beiden Gene *parA* und *parB*, z.B. in *B. subtilis*, überlappend im Operon liegen (Casart *et al.*, 2008). So konnten Casart und Kollegen in diesem Bereich putative Promotorsequenzen für *parB* identifizieren. Da in *C. glutamicum* ebenfalls 60 Basenpaare zwischen *parA<sub>1</sub>* und *parB* liegen, könnten dementsprechend auch Promotorsequenzen für *parB* in diesem Bereich kodiert sein. So wurde zum einen *parB-gfp* ohne putative Promotorsequenz in das Genom von *C. glutamicum* inseriert, wodurch die Expression von ParB beeinträchtigt sein könnte (Abbildung 3.9 B). Des weiteren wurde *parB-gfp* mit putativer Promotorsequenz (3.9 C) bzw. das gesamte Operon fusioniert mit *gfp*

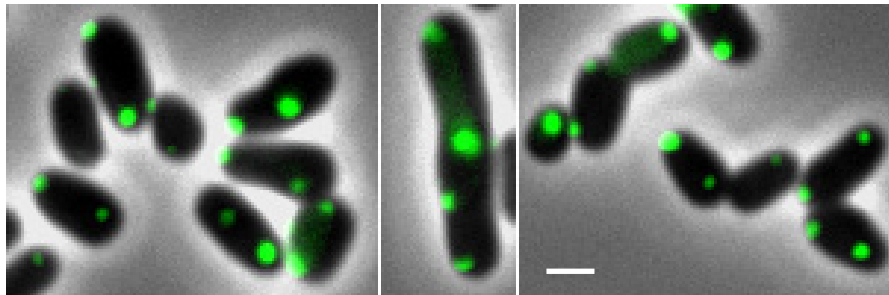
(3.9 D) in das Genom inseriert, um mögliche polare Effekte auf die Wildtypkopie von *parB* zu vermeiden.



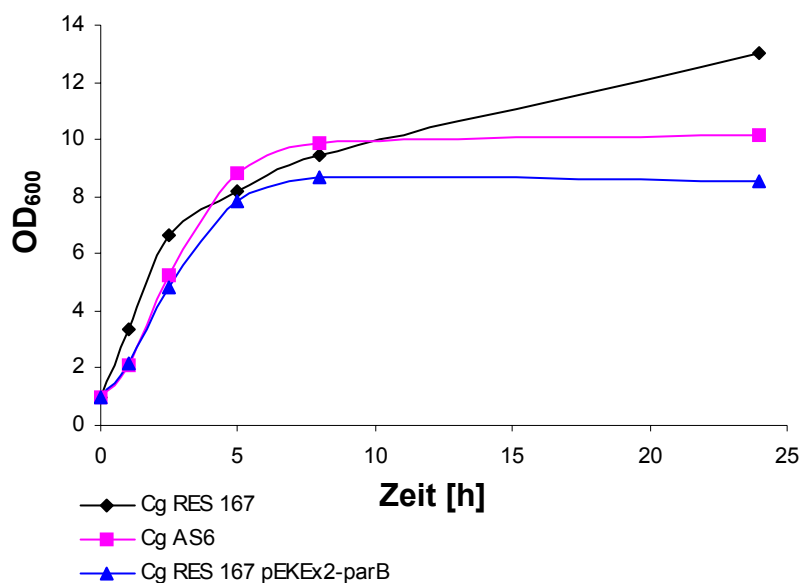
**Abb. 3.9:** Anordnung des *parA<sub>1</sub>B* Operons in Cg RES (A) und nach Transformation der Plasmide *pk18mob-parB-gfp* (B, AS6), *pk18mob-parB+60-gfp* (C, AS7) und *pk18mob-parA<sub>1</sub>+100-parB-gfp* (D, AS8) in Cg RES. Die schraffierte Bereiche stehen für den Wildtyp-Promotor für *parA<sub>1</sub>*. Schachbrettmuster stehen für eine putative Promotorsequenz vor *parB*.

Alle drei Stämme zeigten denselben Phänotyp, weshalb fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen stellvertretend von den Stämmen AS6 und AS8 in Abbildung 3.10 aufgeführt sind. Diese Ähnlichkeit lässt vermuten, dass ParB-GFP funktional ist, da keine phänotypischen Unterschiede zwischen dem Stamm AS6 und den Stämmen AS7 und AS8, die jeweils eine zweite, putative Promotorsequenz von *parB* besitzen, nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich waren Zellen des Stammes AS8, in welchen ein komplettes zweites *parA<sub>1</sub>B* Operon inseriert ist, nicht verlängert. Das unterstützt die Annahme, dass das Verhältnis von ParA zu ParB von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität des Par Systems ist (Mohl *et al.*, 2001). Es ist deutlich zu erkennen, dass in den Zellen GFP in distinkten Bereichen polar oder am Septum detektiert werden konnte. Damit zeigte ParB in *C. glutamicum* dieselbe Lokalisation wie z. B. ParB in *C. crescentus* (Thanbichler & Shapiro, 2006). Keine Zelle wies mehr

als vier Spots auf. Da ParB spezifisch an die *parS* Sequenzen nahe des Replikationsursprunges bindet, bedeutet das, dass bis zu vier Replikationsursprünge in einer Zelle vorhanden sein können. So kann in der exponentiellen Wachstumsphase schon eine weitere Replikation vor einer vollständigen Zellteilung initiiert worden sein, wodurch bis zu vier Spots in einer Zelle erklärbar wären.



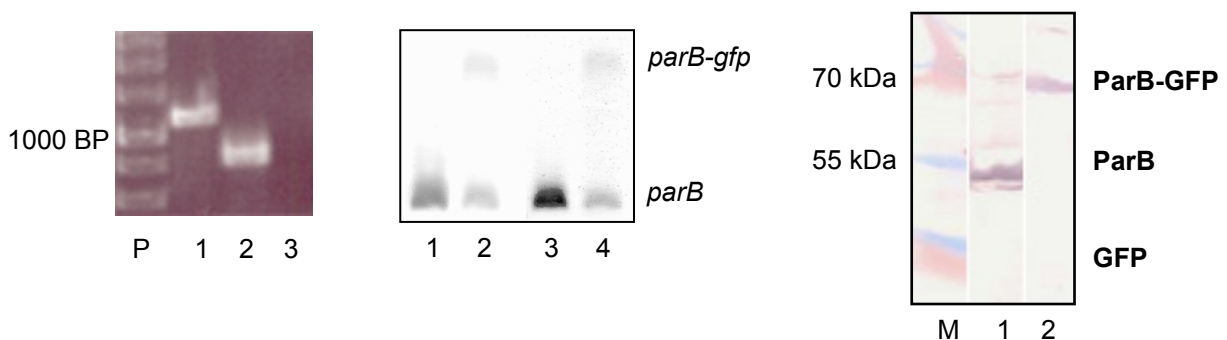
**Abb. 3.10:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS6 (links und mitte) und AS8 (rechts) während der exponentiellen Wachstumsphase. Die GFP-Spots sind hauptsächlich an den Polen und dem Septum lokalisiert. Keine Zelle hat mehr als vier Spots. Maßstabballen = 1µm.



**Abb. 3.11:** Wachstumskurven von Cg RES, Cg RES / pEKEx2-*parB* und AS6, jeweils in BHI-Vollmedium, Cg RES / pEKEx2-*parB* wurde mit 1 mM IPTG induziert. Insbesondere die extrachromosomale Expression von ParB führte zu einem schlechteren Wachstum der Zellen verglichen mit dem Wildtyp.

Durch die Insertionen wurde das Wachstumsverhalten der Zellen beeinträchtigt (Abbildung 3.11) und zudem wiesen die Mutanten verkürzte Zelllängen auf (Cg RES:

2,09 +/- 0,32  $\mu\text{m}$ , AS6: 1,87 +/- 0,45  $\mu\text{m}$ ). Durch eine IPTG induzierte, extrachromosomale Überexpression von ParB im Stamm Cg RES / pEKEx2-*parB* kam es, verglichen mit dem Wildtyp, ebenfalls zu leicht kürzeren Zellen (Cg RES: 2,09 +/- 0,32  $\mu\text{m}$ , Cg RES / pEKEx2-*parB* uninduziert: 2,05 +/- 0,32  $\mu\text{m}$ , induziert: 1,99 +/- 0,22  $\mu\text{m}$ ). Zellen des Stamms Cg RES / pEKEx2-*parB* wiesen allerdings ein schlechteres Wachstum auf (Abbildung 3.11). So scheint eine intrazelluläre Erhöhung der ParB Konzentration die FtsZ Polymerisation nicht negativ zu beeinflussen, sondern eher zu einer Initiation der Teilung der Zellen zu führen, wodurch sie im Durchschnitt eine geringere Zelllänge vorweisen. Obwohl alle drei Stämmen AS6, AS7 und AS8 den gleichen Phänotyp aufwiesen und die GFP Lokalisation der aus anderen Modellorganismen beschriebenen entspricht, konnte das integrierte Konstrukt im Genom nicht mittels PCR nachgewiesen werden. Es konnten lediglich *parB* und *gfp* amplifiziert werden, *parB-gfp* hingegen nicht (Abbildung 3.12).



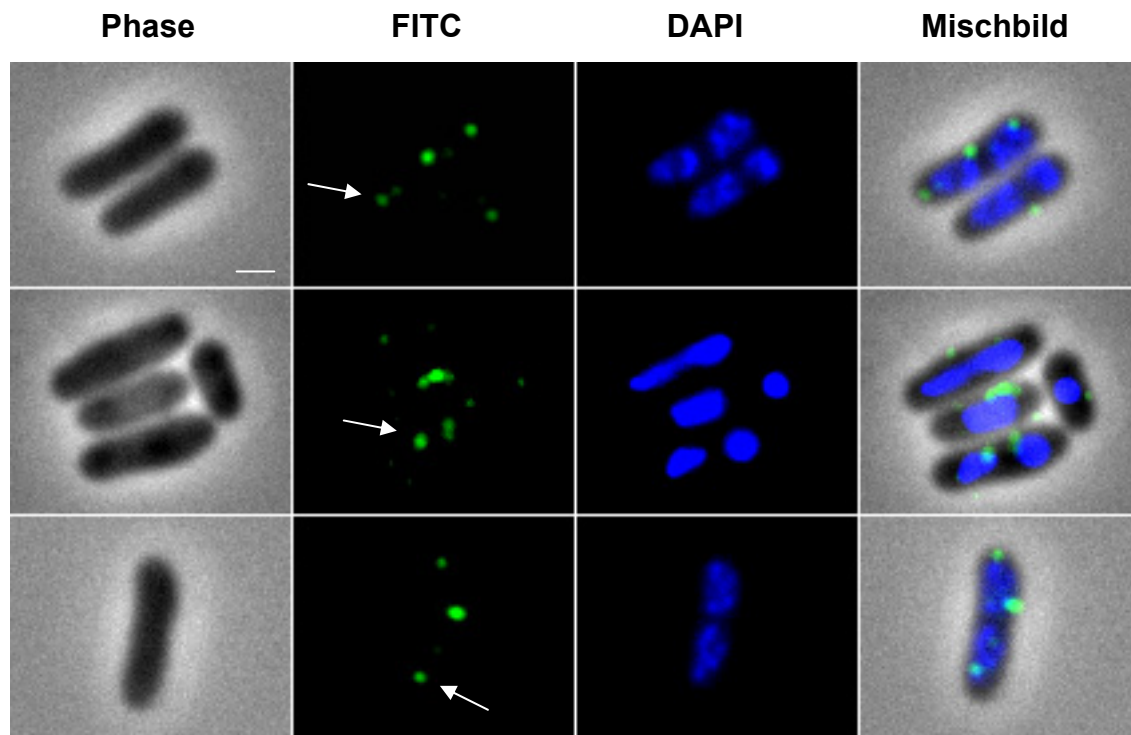
**Abb. 3.12:** Links: Nachweis der Integration des *parB-gfp*-Konstruktes in das Genom mittels PCR. *ParB* = 1160 BP (1), *gfp* = 720 BP (2) und *parB-gfp* = 1980 BP (3); M = Marker. Nur *parB* und *gfp* konnten nachgewiesen werden. Mitte: Nachweis der Integration des *parB-gfp*-Konstruktes in das Genom mittels Southern Blot. 1 + 2: *parB* in Cg RES (1) und AS6 (2). 3 + 4: *parB-gfp* in Cg RES (3) und AS6 (4). In beiden Fällen konnte das *parB-gfp*-Konstrukt innerhalb des Genoms von AS6 nachgewiesen werden. Rechts: Immunoblot mit Zellysate von Cg AS6: M = Marker, 1 =  $\alpha$ -ParB und 2 =  $\alpha$ -GFP. Es konnte ParB bei ca. 50 kDa detektiert werden. Zusätzlich war eine leichte Bande bei ca. 70 kDa sichtbar. Mit GFP konnte eine deutliche Bande bei ca. 70 und eine leichtere bei ca. 140 kDa nachgewiesen werden.

Allerdings konnte durch einen Southern Blot die Integration des Konstruktes *parB-gfp* in den Stämmen bestätigt werden. Darüberhinaus konnte durch einen Immunoblot der Nachweis erbracht werden, dass sowohl ParB (ca. 45 kDa) als auch ein GFP-Fusionsprotein (ca. 70 kDa) in den Zellen vorhanden war. Freies GFP (ca. 27 kDa)

konnte nicht detektiert werden. Freies GFP wäre auch fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar, da sich GFP gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt (Anhang 3). Um die Lokalisation von ParB unabhängig von einer Insertion aufzeigen zu können, wurde ParB in fixierten Wildtypzellen mittels Immunofluoreszenz markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### **3.2.2 Immunofluoreszenz von ParB in Cg RES 167**

Die Lokalisation von ParB in Wildtypzellen wurde mittels Immunofluoreszenz (IMF) nachgewiesen. Diese Methode hat den Nachteil, dass nur fixierte Zellen analysiert werden können, während sich durch eine Integration eines Fusionsgenes die Lokalisation des Proteins in lebenden Zellen, auch über einen längeren Zeitraum hinweg, verfolgen lassen. Allerdings bietet die IMF den Vorteil, dass die Lokalisation des nativen ParB unter nativer Expression dokumentiert wird. Zu diesem Zweck mussten die gängigen Protokolle für die IMF optimiert werden (Harry *et al.*, 1995). Die Schwierigkeit bestand darin, trotz der speziellen Zellwand von *C. glutamicum*, einer genügend hohen Anzahl an Antikörpern ein Eindringen in die Zellen zu ermöglichen, ohne die Zellen zu stark zu schädigen. Die optimale Behandlung der Zellen konnte durch 0,4 %iges CTAB mit 2 mg/ml Lysozym, inkubiert für 30 Minuten bei 30°C, erreicht werden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der IMF von ParB in Cg RES sind in Abbildung 3.13 gezeigt. ParB konnte maßgeblich an drei verschiedenen Positionen detektiert werden: am Pol der Zelle, unabhängig von der Präsenz der DNS oder auf dem Chromosom entweder am Septum oder der zum Pol orientierten Seite des Chromosoms. Diese Lokalisation entspricht weitgehend den GFP-Spots der Stämme AS6, AS7 und AS8. Auch mittels IMF konnte dokumentiert werden, dass kein Chromosom mehr als zwei GFP-Spots aufwies und pro Zelle nicht mehr als vier Spots detektiert werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von AS6, AS7 und AS8, wodurch die Annahme bestätigt wird, dass in *C. glutamicum* in der exponentiellen Wachstumsphase bis zu vier Replikationsursprünge vorhanden sein können, an welche ParB bindet. Diese Spots scheinen mit der Zellmembran zu assoziieren, da sie entweder an den Polen, oder aber auch an der lateralen Zellmembran in Höhe der Zellteilungsebene, lokalisiert waren.

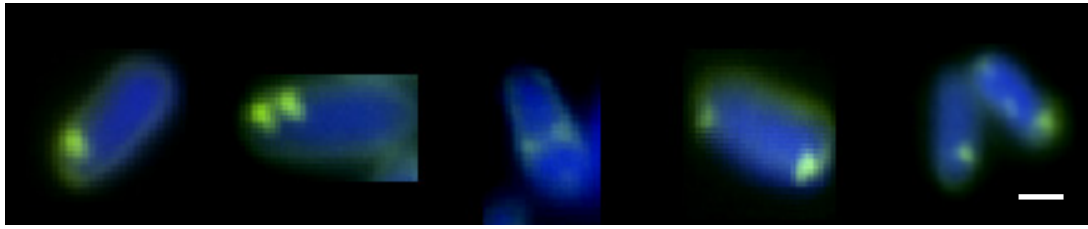


**Abb. 3.13:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cg RES in der exponentiellen Phase mit Immunofluoreszenz von ParB. Blau: DNS (DAPI), grün: ParB (FITC). ParB ist maßgeblich an drei verschiedenen Positionen detektierbar: in distinkten Bereichen polar oder am Septum oder an einem polaren Bereich des Chromosoms (Pfeile). Dabei konnten in keiner Zelle mehr als vier Spots nachgewiesen werden. Maßstab Balken = 1  $\mu$ m.

### 3.3 Lokalisation des *oriC*

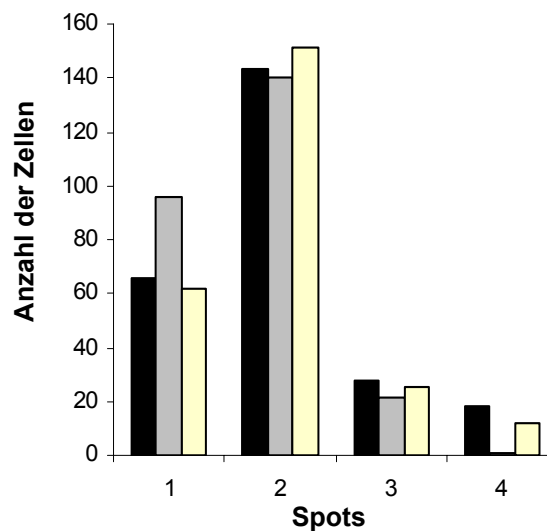
Nachdem die Lokalisation von ParB in *C. glutamicum* gezeigt werden konnte, sollte nun die Lage des *oriC* innerhalb der Zellen analysiert werden. Wenn ParB nahe des *oriC* an die *parS* Sequenz(en) bindet, sollte eine Kolokalisation nachweisbar sein. Um die Lokalisation des *oriC* fluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können, wurden zuerst *tetO*-Kassetten nahe des *oriC* zwischen die Gene *cg0002* und *cg0004* inseriert. In die entstandene Mutante, welche keinen veränderten morphologischen oder Wachstumsphänotyp aufwies, wurde das Plasmid *pEKEx2-yfp-tetR* transformiert, welches IPTG abhängig YFP-TetR exprimierte. YFP-TetR kann an die inserierten *tetO*-Kassetten binden und so die *oriC* Region in *C. glutamicum* fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen. Dafür wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase für drei Stunden mit 1 mM IPTG induziert. Bilder dieses Stammes (AS10) sind in Abbildung 3.14 aufgeführt.





**Abb. 3.14:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS10 (*tetO* Kassetten nahe des *oriC* inseriert, extrachromosomale Expression von YFP-TetR) in der exponentiellen Phase, mit 1 mM IPTG für 3 Stunden induziert. Blau: DNS (DAPI), gelb: *oriC* (YFP-TetR). Die *oriC* Region ist in distinkten Bereichen polar oder am Septum lokalisiert. Maßstabbalken = 1 µm.

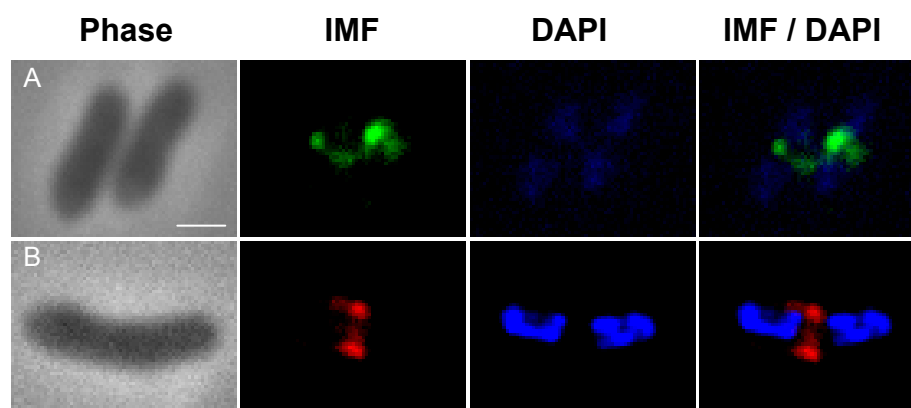
Die *oriC* Region von *C. glutamicum* war ebenfalls an den Polen und auch am Septum lokalisiert, wodurch sie dieselbe Lokalisation wie ParB, aber auch ParA<sub>2</sub> aufwies. Eine graphische Darstellung der Häufigkeit und Verteilung der Spots von ParB (IMF), ParB-GFP in AS6 und des *oriC* (Abbildung 3.15) verdeutlicht die hohe Übereinstimmung der Lokalisation. Damit ist eine *in vivo* Kolo-kalisation des *oriC* und ParB sehr wahrscheinlich.



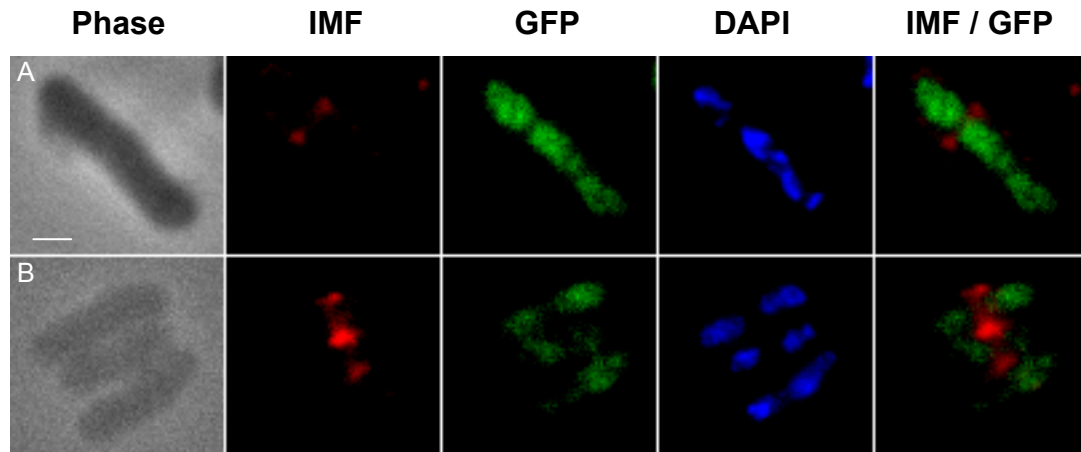
**Abb. 3.15:** Häufigkeit der ParB-Spots, welche in Wildtypzellen durch IMF ermittelt wurden, der ParB-GFP Spots aus AS6 und AS8 und der *oriC* Spots in dem Stamm AS10. Schwarze Balken: *oriC*; graue Balken: ParB, gelbe Balken: ParB-GFP. ParB, ParB-GFP und der *oriC* zeigten eine hohe Übereinstimmung an Häufigkeit und Lokalisation.

### 3.4 Immunofluoreszenz von FtsZ

Die beschriebenen Phänotypen und auch die Lokalisation der Par Proteine lassen ein Modell zu, in dem die beiden ParA Proteine des Par Systems in *C. glutamicum* die Funktion des *nucleoid occlusion* Systems übernehmen könnten. Demnach würden ParA<sub>1</sub> und / oder ParA<sub>2</sub> die FtsZ Polymerisation über dem Chromosom verhindern. Um dieses Modell *in vivo* zu unterstützen, sollte die subzelluläre Lokalisation von FtsZ ermittelt werden. Trotz Insertion des Fusionskonstrukts *ftsZ-gfp* in den *ftsZ* Locus wurde das Fusionsgen *ftsZ-gfp* nicht exprimiert (Anhang 3), sondern lediglich freies GFP. Um trotzdem die Lokalisation von FtsZ innerhalb von Wildtypzellen, aber auch innerhalb der Mutanten AS4 und AS5 analysieren zu können, wurden FtsZ Antikörper für eine IMF genutzt. Wenn die beiden ParA ATPasen die Assemblierung von FtsZ inhibieren, dann sollte FtsZ nur zwischen den Chromosomen bzw. nur zwischen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> polymerisieren können. In Abbildung 3.16 sind Ergebnisse einer IMF von FtsZ in Cg RES aufgeführt. FtsZ bildete in den Wildtypzellen einen Ring zwischen den beiden segregierten Chromosomen aus. Dieser Ring wurde nie über dem Chromosom oder an den Polen beobachtet. Zur Analyse der Lage des Z-Rings innerhalb der beiden Stämme AS4 und AS5, wurde ein zweiter TRITC-konjugierter Antikörper für die IMF von FtsZ gewählt, um mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff nicht mit den grün-fluoreszierenden Fusionsproteinen ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP zu überlagern. Ergebnisse der IMF mit Zellen von AS4 und AS5 sind in Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.16:** Immunofluoreszenz von FtsZ in Cg RES. Blau: DNS (DAPI), grün: FtsZ (FITC), rot: FtsZ (TRITC). Sowohl mit FITC gekoppelten Antikörpern (A) als auch mit TRITC gekoppelten Antikörpern (B) ist FtsZ in Wildtypzellen dokumentierbar. FtsZ bildete Ringe zwischen den segregierten Chromosomen aus - niemals über dem Chromosom - oder an den Polen. Maßstabbalken = 1  $\mu$ m.



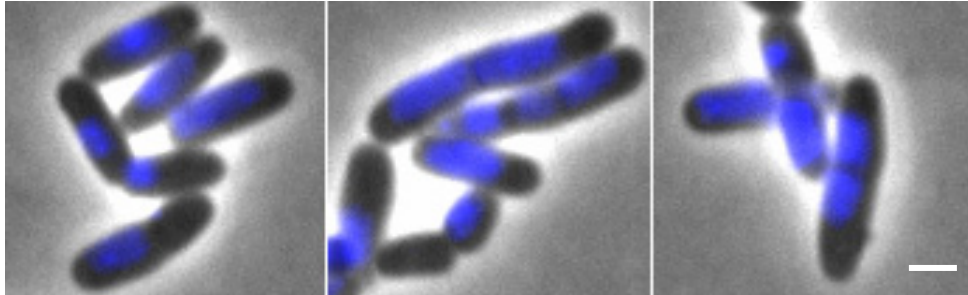
**Abb. 3.17:** Immunofluoreszenz von FtsZ in AS4 (A) und AS5 (B). Blau: DNS (DAPI), grün: ParA<sub>1</sub>-GFP (AS4) oder ParA<sub>2</sub>-GFP (AS5), rot: FtsZ (TRITC). FtsZ bildete Ringe zwischen den segregierten Chromosomen aus, was nicht zwangsläufig der Mitte der Zellen entsprach. ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP sind über den Chromosomen lokalisiert. Damit formierte sich der Z-Ring dort, wo kein Chromosom, und damit auch die geringste Konzentration an ParA-Proteinen, vorhanden war. Maßstabbalken = 1  $\mu\text{m}$ .

Anhand der Aufnahmen in Abbildung 3.17 konnte dokumentiert werden, dass auch in den beiden Stämmen AS4 und AS5 die FtsZ Polymerisation nur zwischen den segregierten Chromosomen stattfindet. Zudem wurde gezeigt, dass beide Fusionsproteine ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP, durch die Fixierung der Zellen für die IMF, nicht geschädigt wurden. ParA<sub>1</sub>-GFP in AS4 und ParA<sub>2</sub>-GFP in AS5 waren ausschließlich über dem Chromosom lokalisiert, während die Z-Ringe nur zwischen den beiden segregierten Chromosomen, und damit zwischen den ParA Proteinen, assemblieren konnten. So könnte die Verlängerung der Zellen in den beiden Stämmen AS4 und AS5 dadurch ausgelöst werden, dass eine höhere Konzentration an Polymerisationsinhibitoren in den Zellen vorhanden ist und dadurch FtsZ erst in verlängerten Zellen zwischen den Chromosomen polymerisieren kann.

### 3.5 Mitomycin-Experimente

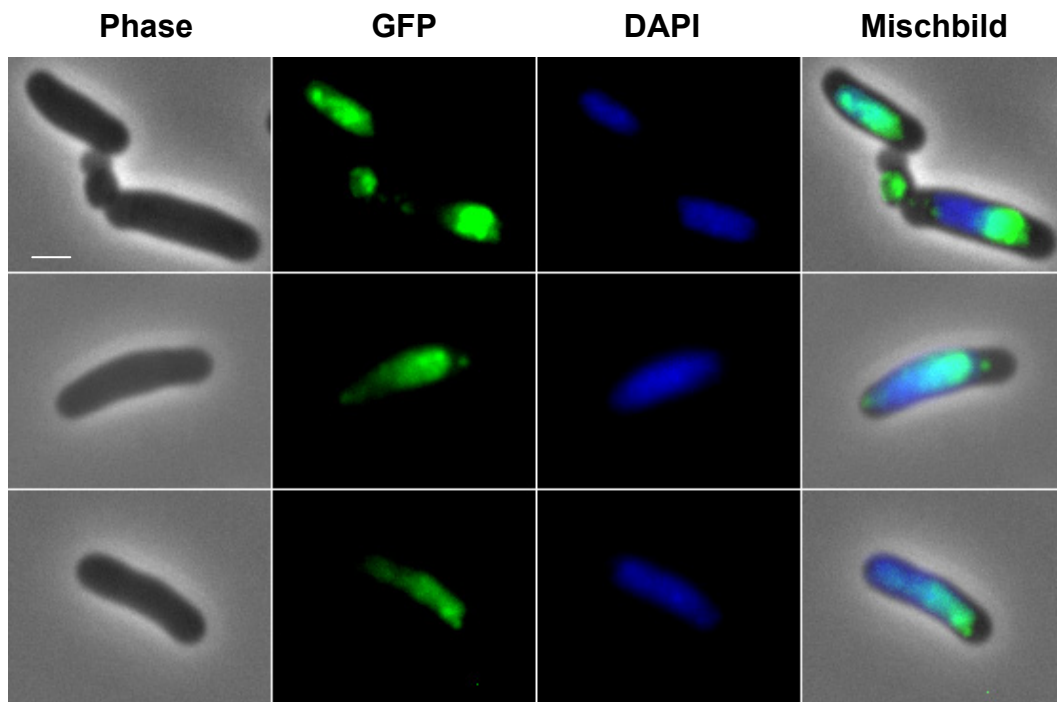
Um die Lokalisation der Par Proteine zu bestätigen und deren Funktion weitergehend *in vivo* zu untersuchen, wurden Mitomycin-Experimente durchgeführt. Mitomycin C inhibiert die Replikation der DNS (Ogino *et al.*, 2008). Somit wird durch Inkubation von Zellen mit Mitomycin die Replikation in unterschiedlichen Stadien unterbrochen.

In diesen Zellen kann die Position der jeweiligen Par Proteine analysiert werden, um ihre Abhängigkeit von der Lage der DNS detektieren zu können. Zunächst wurde der Wildtyp untersucht, um eine optimale Mitomycinkonzentration zu bestimmen, bzw. um festzustellen, ob Mitomycin durch die Zellwand von *C. glutamicum* dringen kann. Bilder dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.18 zusammengestellt.

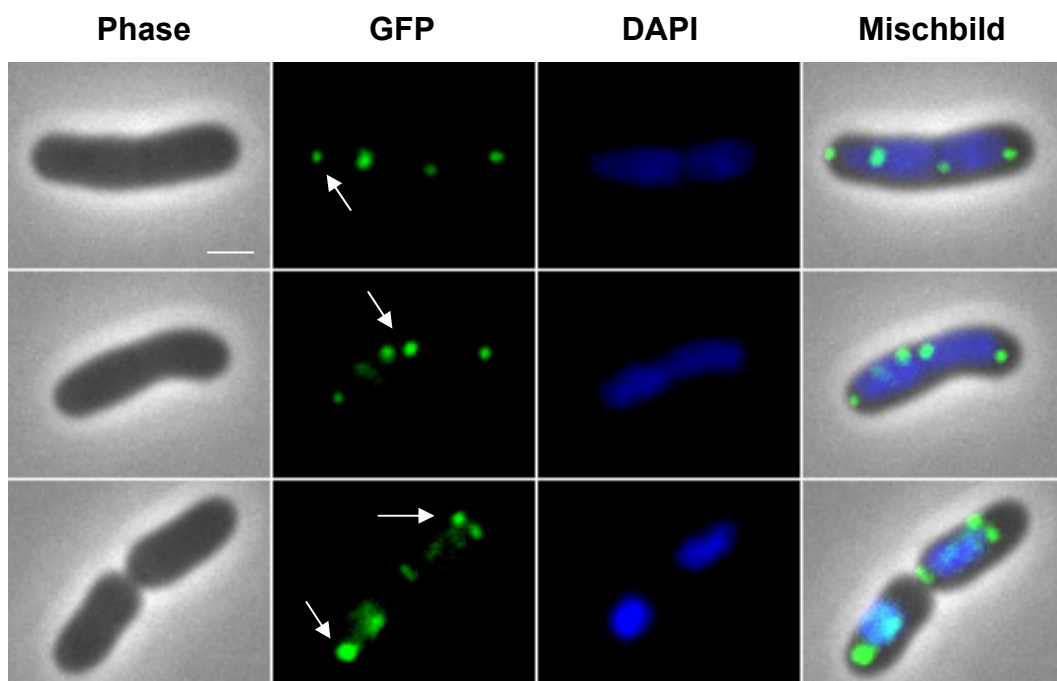


**Abb. 3.18:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cg RES, welche für 2 Stunden mit 2 µg/ml Mitomycin C inkubiert wurden. Blau: DNS (DAPI). Die Zellen sind deutlich verlängert, da das apikale Wachstum noch stattgefunden hat, sich die Zellen aber wegen der unterbrochenen Replikation nicht mehr teilen. Die Chromosomen sind in den verschiedenen Stadien der Replikation blockiert. Maßstab Balken = 1 µm.

Die Inkubation von *C. glutamicum* für zwei Stunden mit 2 µg/ml Mitomycin C führte zu verlängerten Zellen. Die Zellen wuchsen apikal weiter, während die Zellteilung wegen der unterbrochenen Replikation und Segregation inhibiert ist. So konnte die Lokalisation von ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und ParB auf Chromosomen, die in verschiedenen Stadien der Replikation und Segregation verharrten, analysiert werden. In Abbildung 3.19 sind Zellen des Stammes AS4 und in Abbildung 3.20 Zellen des Stammes AS5 abgebildet. ParA<sub>1</sub>-GFP in AS4 kolokalisierte mit der DNS und bildete große Strukturen über dem Chromosom aus. Dabei akkumulierte es meist polar, ist aber auch am Septum zu finden (Abbildung 3.19). ParA<sub>2</sub>-GFP in AS5 hingegen war in kleinen Foki detektierbar, welche am Septum oder den Polen bzw. am polwärts gerichteten Ende des Chromosoms lokalisiert waren. Interessanterweise war ParA<sub>2</sub>-GFP auch am Zellpol ohne Chromosom nachweisbar. Damit zeigten beide Fusionsproteine eine ähnliche Positionierung, wie in Zellen, die nicht mit Mitomycin behandelt wurden. So ist die Lokalisation von ParA<sub>1</sub> abhängig von der DNS, während ParA<sub>2</sub> auch an den Pol rekrutiert werden kann.












**Abb. 3.19:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS4. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 2 µg/ml Mitomycin inkubiert. Blau: DNS (DAPI), grün: ParA<sub>1</sub>-GFP. ParA<sub>1</sub>-GFP war ausschließlich auf dem Chromosom lokalisiert und bildete meist polar große Strukturen über der DNS aus. Maßstabbalken = 1 µm.



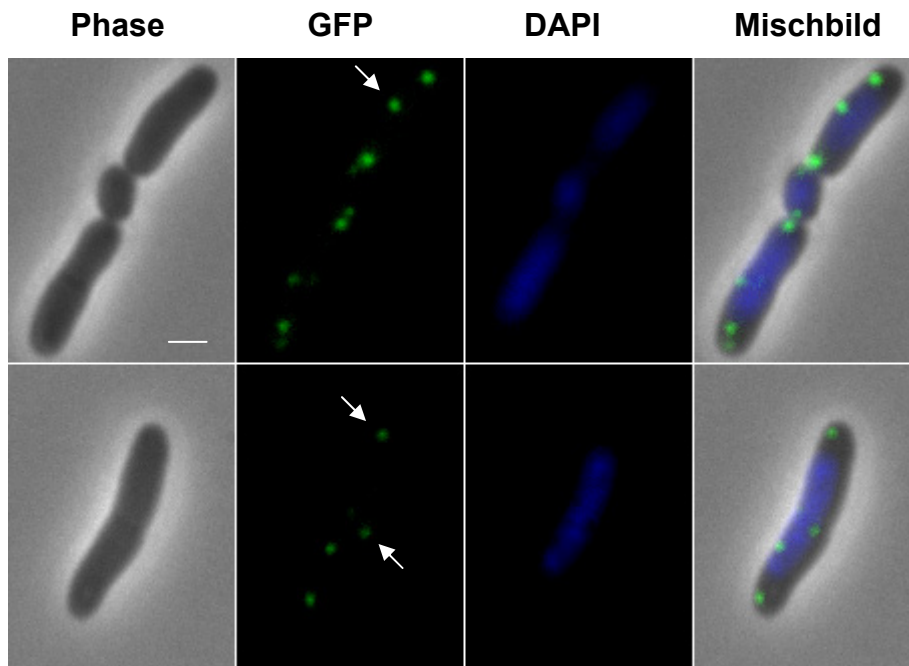
**Abb. 3.20:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS5. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 2 µg/ml Mitomycin inkubiert. Blau: DNS (DAPI), grün: ParA<sub>2</sub>-GFP. ParA<sub>2</sub>-GFP bildete, meist polar und an den Septen, distinkte Spots aus. Dabei waren die Spots an den polar gelegenden Enden der Chromosome oder am Zellpol lokalisiert (Pfeile). Maßstabbalken = 1 µm.

Wenn man die Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP mit oder ohne Inkubation mit Mitomycin vergleicht, (Abbildung 3.21) kann man feststellen, dass ParA<sub>1</sub>-GFP seltener am Septum lokalisiert war, allerdings vermehrt polar große Bereiche des Chromosoms bedeckte. So war ParA<sub>1</sub>-GFP zu 14 % in Zellen ohne Mitomycinbehandlung am Septum lokalisiert, während es nach Mitomycinbehandlung nur noch zu einem Prozent dort lokalisierte. Dies könnte an einer verminderten Ausbildung an Septen, in den mit Mitomycin behandelten Zellen, liegen. Zusätzlich ist ParA<sub>1</sub>-GFP zu über 60 % an einem Pol in Mitomycinbehandelten Zellen lokalisiert, was die Vermutung zulässt, dass eine bipolare Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP in den Zellen in Abhängigkeit von der Septumbildung steht. ParA<sub>2</sub>-GFP hingegen war hauptsächlich in kleinen Spots detektierbar (fast 95 %), welche vermehrt in der Mitte der Zelle auftauchten bzw. zwei Spots an den Polen des Chromosoms oder der Zelle formierten. Dadurch, dass weniger Septen in den behandelten Zellen ausgebildet wurden, wurden die ParA<sub>2</sub>-Spots nicht mehr am Septum positioniert, sondern bildeten meist zwei Spots nahe der Mitte der Zellen aus. Das kann darauf hinweisen, dass das Chromosom am Septum verankert wird.

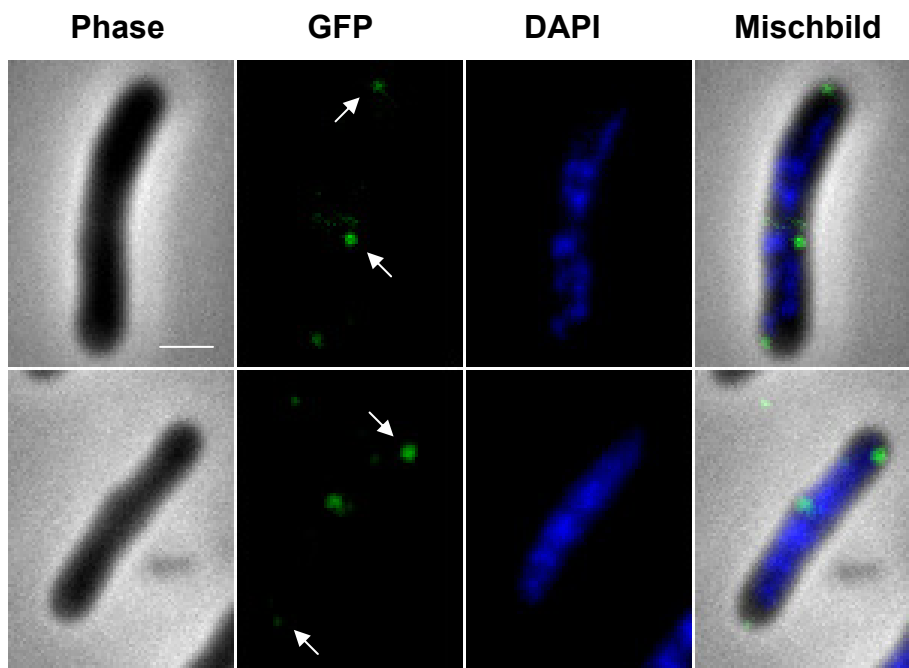
ParA <sub>1</sub>					ParA <sub>2</sub>					
- Mitomycin	37 %	22 %	27 %	14 %	- Mitomycin	9 %	26 %	0 %	35 %	30 %
+ Mitomycin	63 %	21 %	15 %	1 %	+ Mitomycin	2 %	2 %	48 %	44 %	4 %

**Abb. 3.21:** Vergleich der Lokalisation von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP in Zellen, welche mit und ohne Mitomycin inkubiert wurden (n = 300). ParA<sub>1</sub>-GFP war kaum noch am Septum zu finden, bildete fast ausschließlich polar große Strukturen über der DNS aus. ParA<sub>2</sub>-GFP hingegen bildete kaum noch größere Strukturen aus und war fast ausschließlich in kleinen Spots an den Polen und am Septum lokalisiert.

Die Lokalisation von ParB in Mitomycin C behandelten Zellen wurde in dem Stamm AS6 untersucht. Zusätzlich wurde die Lokalisation durch IMF von ParB in Wildtypzellen, welche mit Mitomycin C behandelt wurden, analysiert. In Abbildung 3.22 sind Zellen von AS6 dargestellt und in Abbildung 3.23 die IMF von ParB in Cg RES nach Mitomycinbehandlung.



**Abb. 3.22:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS6. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 2 µg/ml Mitomycin inkubiert. Blau: DNS (DAPI), grün: ParB-GFP. ParB-GFP konnte hauptsächlich an den Polen detektiert werden, unabhängig von der Gegenwart der DNS. ParB-GFP lokalisierte auch in Bereichen zukünftiger Septen oder auf den polwärts gerichteten Seiten der DNS (Pfeile). Maßstab Balken = 1 µm.



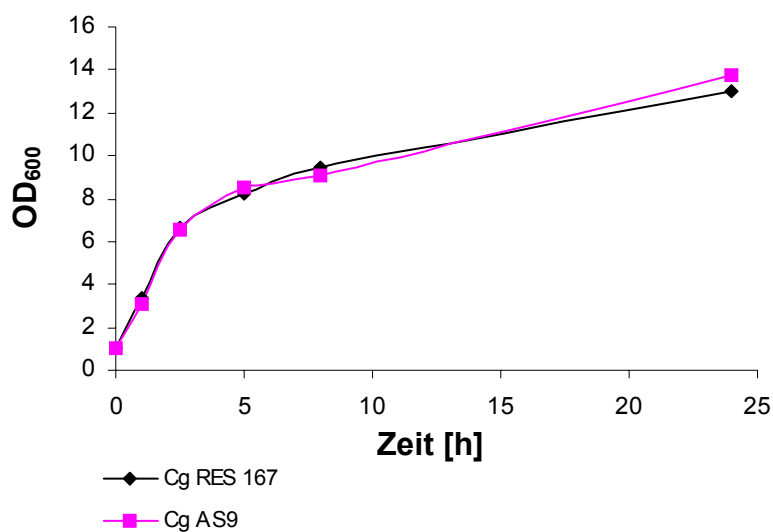
**Abb. 3.23:** Immunofluoreszenz von ParB in Cg RES. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 2 µg/ml Mitomycin inkubiert. Blau: DNS (DAPI), grün: ParB (FITC). ParB konnte an den Polen und im Bereich der Septen detektiert werden. ParB war nicht ausschließlich auf dem Chromosom lokalisiert, sondern konnte auch unabhängig von der DNS am Pol lokalisiert sein (Pfeile). Maßstab Balken = 1 µm.



ParB ist ebenfalls an den Polen und im Bereich des Septums lokalisiert. Dabei ist es nicht ausschließlich auf dem Chromosom, sondern kann auch an den Polen, ohne Chromosom, verankert sein. Damit zeigte ParB die gleiche Positionierung innerhalb der Zellen wie ParA<sub>2</sub>-GFP auf. Allerdings hatte auch ParA<sub>1</sub>-GFP, chromosomengebunden, die höchste Konzentration an einem Pol. Somit stellte sich die Frage, was insbesondere ParB und ParA<sub>2</sub>, aber auch das Chromosom, an die Pole rekrutiert. Ein möglicher topologischer Faktor könnte DivIVA darstellen. DivIVA ist in *C. glutamicum* ausschließlich an den Polen und dem späten Septum lokalisiert (Letek *et al.*, 2006), weshalb es als möglicher Interaktionspartner mit dem Par System genauer untersucht wurde.

### 3.6 Lokalisation von DivIVA

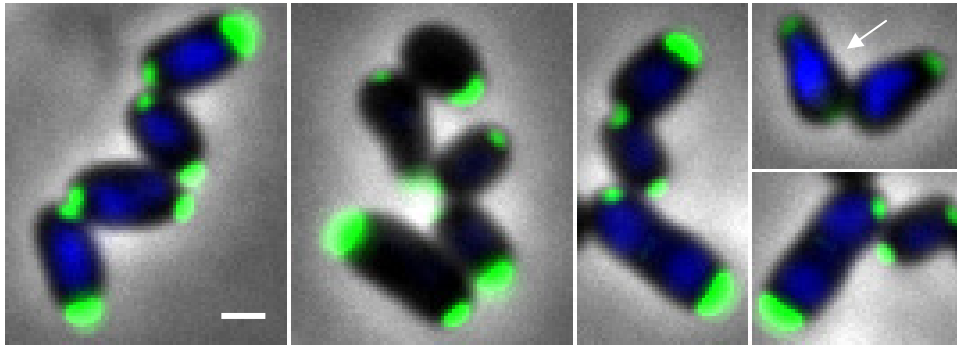
Die Lokalisation von DivIVA in *C. glutamicum* war bereits beschrieben (Letek *et al.*, 2006) und wurde durch die Konstruktion einer weiteren Insertionsmutante im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Hierfür wurde eine zweite *gfp*-fusionierte Kopie des Gens unter Kontrolle des nativen Promotors in den *divIVA*-Lokus inseriert (AS9). Die Insertion führte zu keinerlei Beeinträchtigung des Wachstums (Abbildung 3.24), allerdings bekamen die Zellen durch die Überexpression einen flaschenförmigen Phänotyp, der ebenfalls von Letek und Kollegen beschrieben wurde.



**Abb. 3.24:** Wachstumskurven von Cg RES und AS9, jeweils in BHI-Vollmedium inkubiert. Die Insertion einer zweiten, *gfp*-fusionierten Kopie von *divIVA* mit putativer Promotorsequenz führte zu keinem veränderten Wachstumsverhalten.



Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von AS9 konnten nachweisen, dass DivIVA-GFP ausschließlich an die Pole und das Septum lokalisiert (Abbildung 3.25).



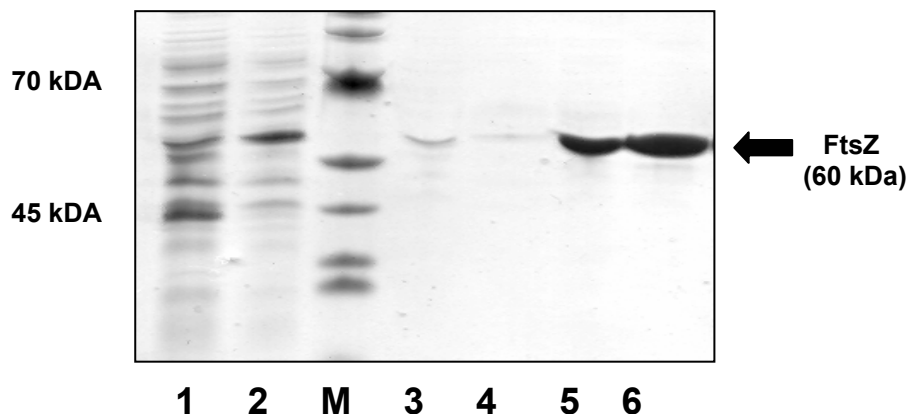
**Abb. 3.25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AS9. Die Zellen wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in Minimal-Medium inkubiert. Blau: DNS (DAPI), grün: DivIVA-GFP. AS9 besitzt eine zweite, *gfp*-fusionierte, Kopie von *divIVA* mit putativer Promotorsequenz. Die Überexpression von DivIVA führte zu einem eher flaschenförmigen Phänotyp (Pfeil). DivIVA-GFP ist ausschließlich an den Polen und am Septum lokalisiert. Maßstabsbalken = 1  $\mu$ m.

Zusätzlich konnte in im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass dort wo DivIVA lokalisiert ist, Zellwandsynthese stattfindet (Elouelji-El'Kemiri, 2008). So rekrutiert DivIVA die Zellwandsynthesemaschinerie an die Pole, wodurch das apikale Wachstum von *C. glutamicum* stattfindet (Letek *et al.*, 2008a). In der Arbeit konnte ebenfalls beschrieben werden, dass eine der vier in *C. glutamicum* vorhandenen Serin/Threonin Kinasen (PknA, PknB, PknL und PknG) DivIVA phosphorylieren kann (PknA), wodurch allerdings die Positionierung von DivIVA nicht beeinflusst wurde. Weiterführend wurde in dieser Arbeit die Lokalisation von DivIVA-GFP innerhalb verschiedener Einzel-, Doppel- und Dreifach-Kinasedeletionsmutanten analysiert, indem das Plasmid *pk18mob-divIVA+100-gfp* in die Deletionsmutanten inseriert und anschließend die Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet wurden. Die Lokalisation von DivIVA war allerdings in allen Kinasedeletionsmutanten unverändert (Daten nicht gezeigt). Da alle Stämme einem dem Wildtyp sehr ähnlichen Phänotyp aufwiesen, schien eine Phosphorylierung von DivIVA weder die Lokalisation noch die Rekrutierung der Zellwandmaschinerie zu beeinträchtigen. Allerdings konnte keine Doppel- bzw. Dreifachmutante mit PknA und PknB hergestellt werden, da diese Kombination lethal ist (Christian Schultz, persönliche Mitteilung). Demnach könnte bei den beiden Kinasen eine Redundanz vorliegen, so dass PknB die Phosphorylierung in PknA

Deletionsmutanten übernimmt und *vice versa*, wodurch kein Phänotyp sichtbar wäre. DivIVA bildet größere, oligomere Strukturen an den Polen, die von anderen Proteinen zur Verankerung an die Pole genutzt werden könnte (Stahlberg *et al.*, 2004), wodurch DivIVA ein möglicher Interaktionspartner für das Par System darstellt.

### 3.7 DNS-Mobilitäts-Assays

Das Modell, dass das Par System in *C. glutamicum* an der Inhibition der FtsZ Polymerisation beteiligt ist und dadurch die Lokalisation der Zellteilungsebene räumlich reguliert, sollte durch *in vitro* Daten bestätigt werden. Für die biochemische Analyse mussten alle beteiligten Proteine gereinigt und zunächst auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Die Reinigung der Proteine ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub>, ParB, FtsZ, DivIVA, ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP erfolgte, nach Klonierung der jeweiligen Gene in den Vektor pET-16B (Novagen) und anschließender Transformation in *E. coli* BL21(DE3) / pLysS, aus den entsprechenden *E. coli* Stämmen. Dafür wurden die exprimierten His-Tag-Proteine durch Metall-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose im *Batch* Verfahren aus den Zellysaten isoliert. Ein Beispiel für die Ergebnisse einer Reinigung ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

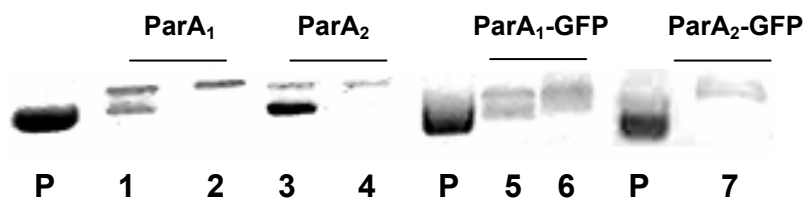


**Abb. 3.26:** SDS-Gel einer Reinigung von FtsZ. 1 = Zellysat vor Induktion, 2 = Zellysat nach Induktion, M = Marker, 3 = Waschfraktion mit 10 mM Imidazol, 4 = Waschfraktion mit 20 mM Imidazol, 5 + 6 = Elutionsfraktionen (jeweils mit 250 mM Imidazol eluiert).

Die die Korrektheit und Vollständigkeit der Aminosäuresequenzen der gereinigten Proteine wurde durch das ZMMK (Universität zu Köln), mittels *Peptide Mass Fingerprinting* bestätigt.

### 3.7.1 DNS-Bindung von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>

Es wurde kürzlich beschrieben, dass die ATPasen des Par Systems unspezifisch an DNS binden und dadurch das Chromosom schützen (Thanbichler & Shapiro, 2006) oder die Plasmidsegregation vermitteln (Hester & Lutkenhaus, 2007). Dies sollte, nachdem ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> und deren Fusionsproteine mit einem His-Tag gereinigt werden konnten, ebenfalls für die ATPasen des Par Systems aus *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Zunächst sollte gezeigt werden, dass beide ATPasen DNS unspezifisch binden, da diese für die ParA Proteine beschrieben wurde (Ebersbach *et al.*, 2005). Dafür wurden die Proteine in verschiedenen Konzentrationen mit unterschiedlichen Plasmiden und doppelsträngigen PCR-Produkten inkubiert und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Ein Ergebnis ist in Abbildung 3.27 aufgeführt. Alle Ansätze zeigten, dass die ATPasen an jede DNS konzentrationsabhängig gebunden hatten, und dadurch eine Veränderung der Mobilität der DNS innerhalb des Gels verursachte. Solche Mobilitätsänderungen konnten nicht mit denaturierten Protein erreicht werden (Daten nicht aufgeführt). Alle vier Proteine konnten demnach unspezifisch an DNS binden, was durch die *in vivo* Lokalisation unterstützt wurde.

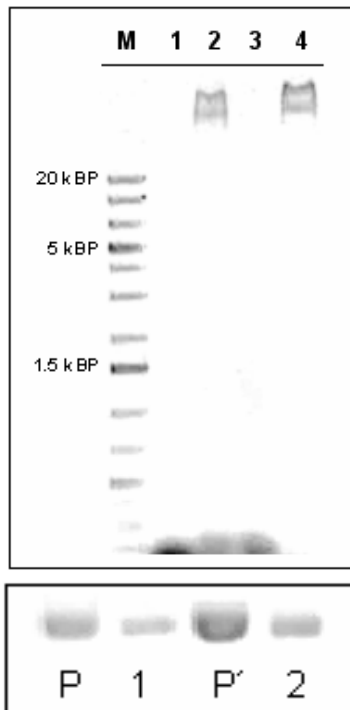


**Abb. 3.27:** Mobilitäts-Assays mit ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und den Fusionsproteinen ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP in 1 %igen TAE Agarosegelen. P = 10 µg Plasmid, 1 + 2 = Plasmid + 30 bzw. 50 µg ParA<sub>1</sub>, 3 + 4 = Plasmid + 30 bzw. 50 µg ParA<sub>2</sub>, 5 + 6 = Plasmid + 30 bzw. 50 µg ParA<sub>1</sub>-GFP und 7 = Plasmid + 50 µg ParA<sub>2</sub>. ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> sowie die Fusionproteine binden mit steigender Konzentration vermehrt unspezifisch DNS (weitere Beispiele nicht aufgeführt).

### 3.7.2 DNS-Bindung von ParB

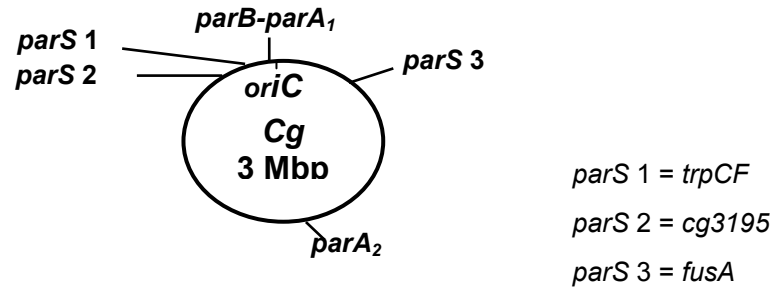
Die bisher aus anderen Modellorganismen beschriebene spezifische Bindung von ParB an *parS* Sequenzen (Autret *et al.*, 2001; Jakimowicz *et al.*, 2002), sollte in *C. glutamicum* ebenfalls gezeigt werden. Bisher waren die *parS* Sequenzen und deren Verteilung auf dem Chromosom in *C. glutamicum* noch nicht beschrieben. Um

die Spezifität einer Bindung von ParB nachzuweisen und um eine *parS* Sequenz zu identifizieren, wurde ParB mit unterschiedlichen Plasmiden und PCR-Produkten sowie einer hochkonservierten *parS* Sequenz aus *B. subtilis* (Murray *et al.*, 2006) inkubiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 30°C wurden die Proben auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 3.28 wiedergegeben.



**Abb. 3.28:** Oben: Gelshiftassay von ParB mit der *parS* Sequenz (jeweils 10 µg). **M** = Marker, **1** = doppelsträngige *parS* Sequenz, **2** = *parS* Sequenz + 30 µg ParB, **3** = *parS* Sequenz + 30 µg denaturiertes ParB, **4** = *parS* Sequenz + 50 µg ParB. Funktionales ParB konnte die Mobilität der *parS* Sequenz innerhalb des Gels verändern, wohingegen sich denaturiertes ParB nicht mehr an das Fragment anlagern konnte. Unten: P, P' = zwei unterschiedliche Plasmide (10 µg), 1 + 2 = Plasmide + 50 µg ParB. ParB konnte sich nicht unspezifisch an DNS anlagern.

Anhand der Ergebnisse der Mobilitäts-Assays mit ParB konnte gezeigt werden, dass ParB aus *C. glutamicum* spezifisch an eine hochkonservierte *parS* Sequenz anlagerte. Homologe Sequenzen (GTTCCACGTGAA aus oHM3, siehe Material und Methoden) konnte dreimal im Genom von *C. glutamicum* identifiziert werden: innerhalb der Gene *trpCF*, *cg3195* und *fusA*. Insbesondere die ersten zwei Gene liegen nahe des *oriC* (Abbildung 3.29). Weiterhin zeigt diese Sequenz große Homologie zu der *parS* Sequenz aus *M. smegmatis* (GTTTCACGTGAAAC; Jakimowicz *et al.*, 2007), das nahe mit *C. glutamicum* verwandt ist.

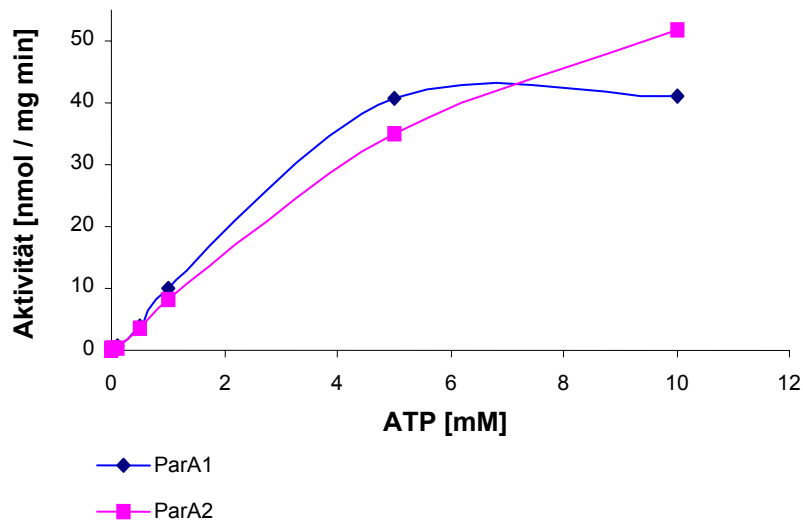


**Abb. 3.29:** Lokalisation der drei homologen *parS* Sequenzen (GTTCCACGTGAA) auf dem Genom von *C. glutamicum*.

### 3.8 Enzymatische Aktivität von ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und FtsZ

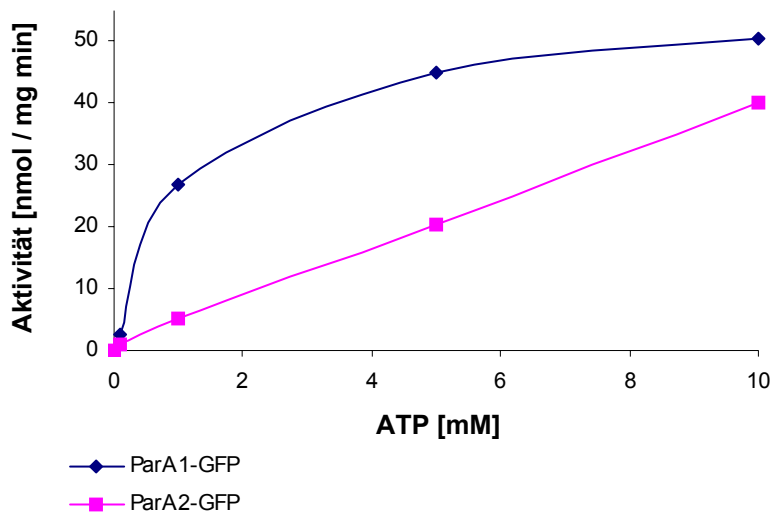
#### 3.8.1 ATPase Aktivität von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>

Eine weitere Charakterisierung der beiden ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> und der GTPase FtsZ wurde durch Analyse ihrer enzymatischen Aktivität vorgenommen. Eine mögliche Nukleotidhydrolyse wurde mit Hilfe eines gekoppelten Enzymtests (EnzChek® Assay, Molecular Probes, Carlsbad, USA) analysiert. Der Test beruht auf einem indirekten Nachweis einer hydrolytischen Aktivität, indem Phosphat, das durch Nukleotidverbrauch frei wird, enzymatisch auf ein Substrat übertragen wird, das dadurch sein Absorptionsmaximum verändert. Diese Veränderung wird über die Zeit gemessen. In jeden Ansatz wurden jeweils 50 µg Protein bei RT inkubiert und die Reaktion durch Zugabe variierender Konzentrationen an ATP gestartet. Die ATP Hydrolyse wurde pro Ansatz über 15 Minuten gemessen. Ergebnisse dieser Messungen mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> sind in den Abbildung 3.30 aufgeführt. Während ParA<sub>1</sub> bei 5 mM ATP eine Sättigung von 40 [nmol Pi / min mg] erreicht hat, ist bei ParA<sub>2</sub> in diesem Bereich noch eine lineare Aktivitätszunahme (über 50 [nmol Pi / min mg]) messbar. Demnach besitzen die beiden ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> bis zu einer Substratkonzentration von 5 mM eine ähnliche enzymatische Aktivität. Die beiden Fusionsproteine ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP zeigten ebenfalls enzymatische Aktivität (Abbildung 3.31). So erreichte ParA<sub>1</sub>-GFP eine Aktivität von 50 [nmol Pi / min mg] und wies damit eine höhere Aktivität als ParA<sub>1</sub> auf. Die ATPase Aktivität von ParA<sub>2</sub>-GFP hingegen war deutlich geringer als die von ParA<sub>2</sub>.



**Abb. 3.30:** ATP Hydrolyse durch ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>.

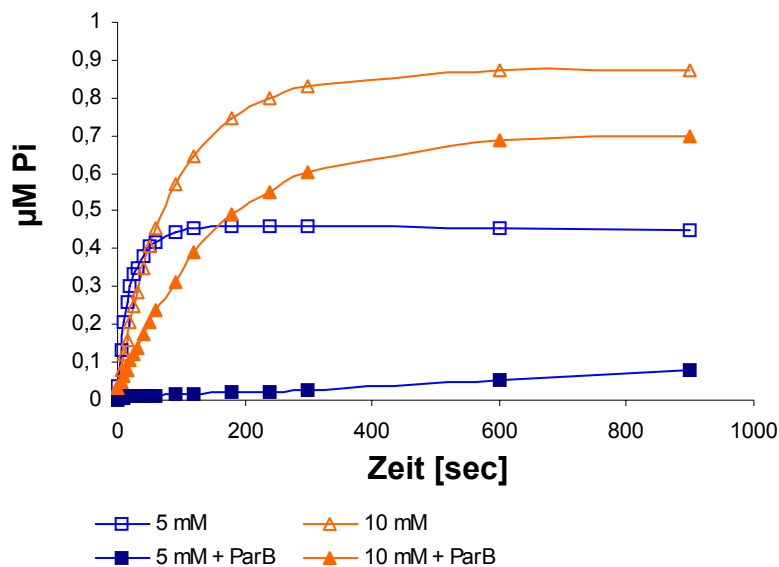
So hatte bei 5 mM ATP ParA<sub>2</sub> eine Aktivität von 35 [nmol Pi / min mg], während ParA<sub>2</sub>-GFP eine Aktivität von 20 [nmol Pi / min mg] aufwies. Allerdings zeigte die hydrolytische Aktivität von ParA<sub>2</sub>-GFP denselben linearen Charakter der Aktivität wie ParA<sub>2</sub>. Damit scheint die GFP-Fusion die ATP Hydrolyse von ParA<sub>2</sub>, im Gegensatz zu ParA<sub>1</sub>, zu beeinträchtigen.



**Abb. 3.31:** ATP Hydrolyse durch ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP.

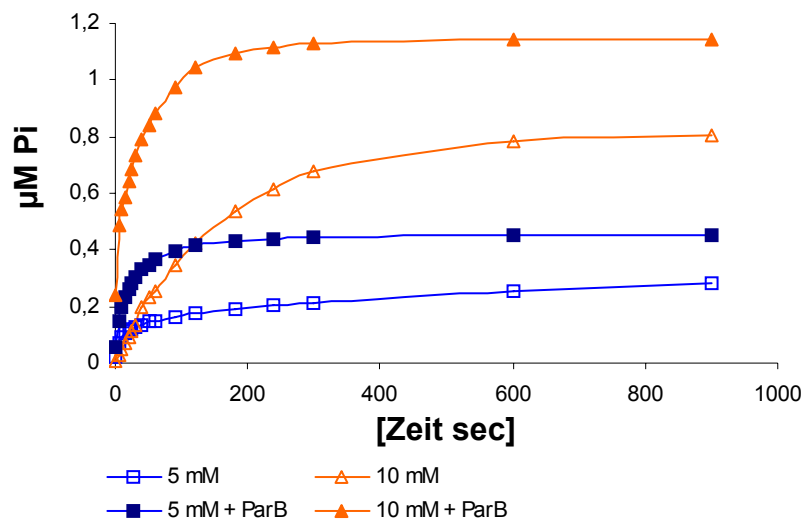
### 3.8.2 Einfluss von ParB auf die enzymatischen Aktivitäten

Es ist beschrieben, dass ParB Proteine mit den entsprechenden ParA ATPasen direkt interagieren (Ireton *et al.*, 1994; Lee & Grossman, 2006). So fördert ParB eines plasmidkodierten Par Systems von *Streptococcus pyogenes* die ATPase Aktivität des entsprechenden ParA (Pratto *et al.*, 2008). Demnach wäre es möglich, dass ParB aus *C. glutamicum* einen Einfluss auf die hydrolytischen Aktivitäten von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> besitzt. Diese Möglichkeit wurde dadurch überprüft, indem die ATPasen mit ParB, jeweils bei RT, inkubiert wurden und anschließend die enzymatische Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet wurde. In den Abbildungen 3.32 und 3.33 sind die Phosphatumsetzungen von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> bei 5 und 10 mM ATP, welche mit und ohne ParB inkubiert wurden, aufgetragen.



**Abb. 3.32:** Phosphatfreisetzung von 30  $\mu\text{g}$  ParA<sub>1</sub> bei 5 (blaue Linien) bzw. 10 (orangene Linien) mM ATP bei RT. In Gegenwart von 30  $\mu\text{g}$  ParB ist die Aktivität von ParA<sub>1</sub> deutlich herabgesetzt, und bei einer ATP-Konzentration bis zu 5 mM fast vollständig inhibiert.

Anhand der Phosphatfreisetzungen konnte man erkennen, dass ParB die ATPase Aktivität von ParA<sub>1</sub> deutlich inhibierte, während es die enzymatische Aktivität von ParA<sub>2</sub> signifikant steigerte. Diese Effekte waren nicht so deutlich, wenn ParB nachträglich zu der Reaktion hinzugefügt wurde (Daten nicht gezeigt). ParB scheint demnach mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> zu interagieren. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass ParB *in vivo* lokal, gebunden an die *parS* Domänen, die Aktivitäten der beiden ATPasen reguliert.



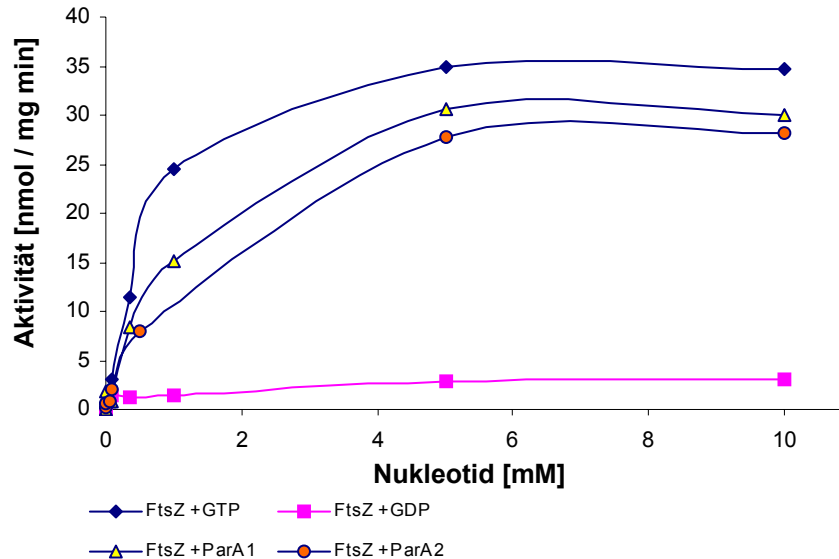
**Abb. 3.33:** Phosphatfreisetzung von 30 µg ParA<sub>2</sub> bei 5 (blaue Linien) bzw. 10 (orangene Linien) mM ATP bei RT. In Gegenwart von 30 µg ParB ist die Aktivität von ParA<sub>2</sub> deutlich gesteigert.

### 3.8.3 GTPase Aktivität von FtsZ

Die GTPase Aktivität des bakteriellen Tubulin Homologs FtsZ wurde ebenfalls mit dem EnzChek® Assay nachgewiesen. Ergebnisse der Messung der enzymatischen Aktivität von FtsZ sind in Abbildung 3.34 dargestellt. FtsZ erreichte ein Maximum seiner Aktivität bei 5 mM GTP, während es in Gegenwart von GDP kaum Aktivität zeigte. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Leung und Kollegen (Leung *et al.*, 2004). Sie zeigten, dass FtsZ aus *M. tuberculosis* in Gegenwart von GDP weder hydrolytische Aktivität noch die Fähigkeit zu polymerisieren aufwies. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die GTPase Aktivität von FtsZ aus *C. crescentus* durch den FtsZ Polymerisationsinhibitor MipZ (ein ParA Homolog) leicht negativ beeinflusst wurde (Thanbichler & Shapiro, 2006). Um einen solchen möglichen Einfluss von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> auf die enzymatische Aktivität von FtsZ zu überprüfen, wurden GTPase Aktivitäten von FtsZ in Gegenwart gleicher Mengen (jeweils 50 µg Protein pro Ansatz) ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> gemessen. Beide ATPasen senkten die Aktivität von FtsZ, hatten allerdings keinen starken inhibitorischen Effekt auf die GTPase Aktivität und zeigten damit einen ähnlichen Effekt wie MipZ auf FtsZ in *C. crescentus*. Bei einer möglichen Inhibition der Polymerisation von FtsZ durch



die ATPasen scheint es sich demnach nicht maßgeblich um eine Konkurrenz um Nukleotide zu handeln.



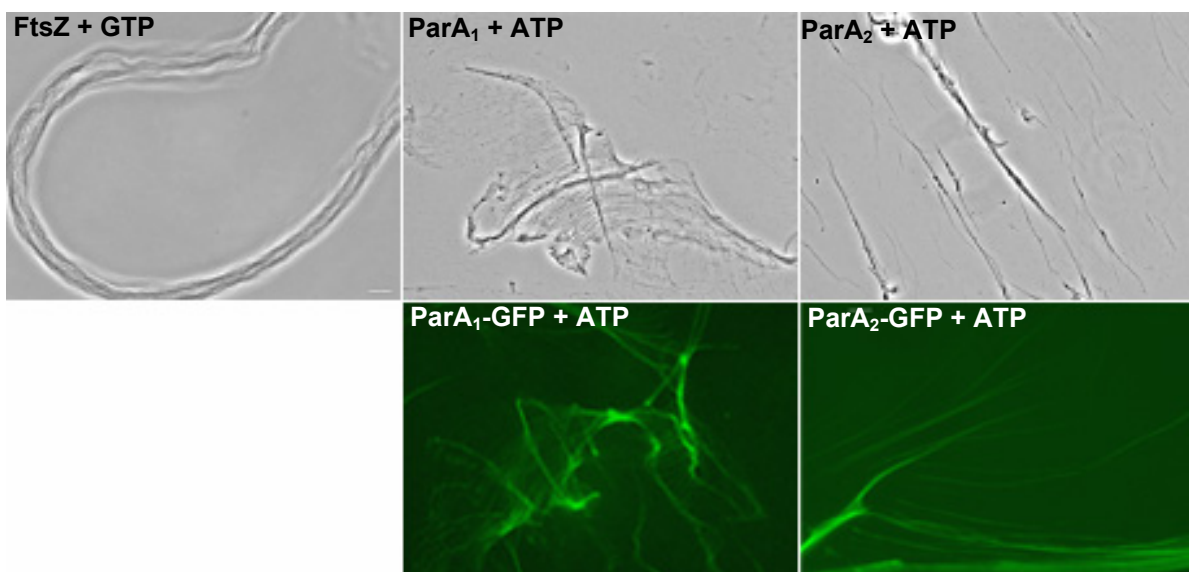
**Abb. 3.34:** GTPase Hydrolyse von FtsZ bei RT. FtsZ zeigte eine maximale Aktivität bei ca. 5 mM GTP von 35 [nmol/ mg min]. Mit GDP hingegen konnte kaum Aktivität nachgewiesen werden. Wurde FtsZ in gleichen Mengen mit jeweils einer der beiden ATPasen ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> inkubiert, wurde die enzymatische Aktivität von FtsZ leicht negativ beeinflusst.

Weitere Untersuchungen von FtsZ zeigten, dass FtsZ aus *C. glutamicum* vier verschiedene Phosphorylierungszustände annehmen kann (Elouelji-El Kemiri, 2008). Dabei wurde FtsZ von den beiden Serin/Threonin Kinasen PknA und PknL *in vitro* phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Diese Daten wurden durch Ergebnisse von Thakur und Chakraborti bestätigt, die herausfanden, dass sowohl FtsZ aus *E.coli* als auch FtsZ aus *M. tuberculosis* von PknA *in vivo* phosphoryliert wird (Thakur & Chakraborti, 2006), und dass diese Phosphorylierung wiederum durch die einzige Serin/Threonin Phosphatase, PPP, gesteuert wird. Im Rahmen der Untersuchungen von FtsZ aus *C. glutamicum* konnte die genaue Phosphorylierungsdomäne nicht identifiziert werden, sie konnten aber auf die Region zwischen Aminosäure 381 und 395 eingegrenzt werden. In dieser Region besitzt FtsZ ein Serin und zwei Threonine. So könnte die enzymatische Aktivität von FtsZ durch die beiden Membranproteine PknA und PknL effizient reguliert werden. Da *C. glutamicum* ebenfalls PPP als einzige Serin/Threonin Phosphatase besitzt, könnte auch in diesem Organismus die Polymerisation von FtsZ durch PknA / PknL und der Phosphatase reguliert werden.

Unter diesem Aspekt sollte in einer Kinase-Deletions-Mutante die Z-Ring Formation dokumentiert werden.

### 3.9 Mikroskopie von Protein-Polymeren

Die GTP-abhängige Polymerisation von FtsZ konnte bereits mittels Elektronenmikroskopie (Mukherjee & Lutkenhaus, 1994; Bramhill & Thompson, 1994) und die ATP-abhängige Assemblierung von SopA (ParA) durch Fluoreszenzmikroskopie (Lim *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. Da die im Rahmen dieser Arbeit gereinigten Proteine FtsZ, ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP enzymatische Aktivität aufwiesen, sollte nun lichtmikroskopisch die Ausbildung von Polymeren untersucht werden. Dafür wurden ca. 5 µg Protein bis zu zehn Minuten bei RT mit dem entsprechenden Nukleotid inkubiert und dann unter dem Mikroskop analysiert. Ergebnisse sind in Abbildung 3.35 aufgeführt.

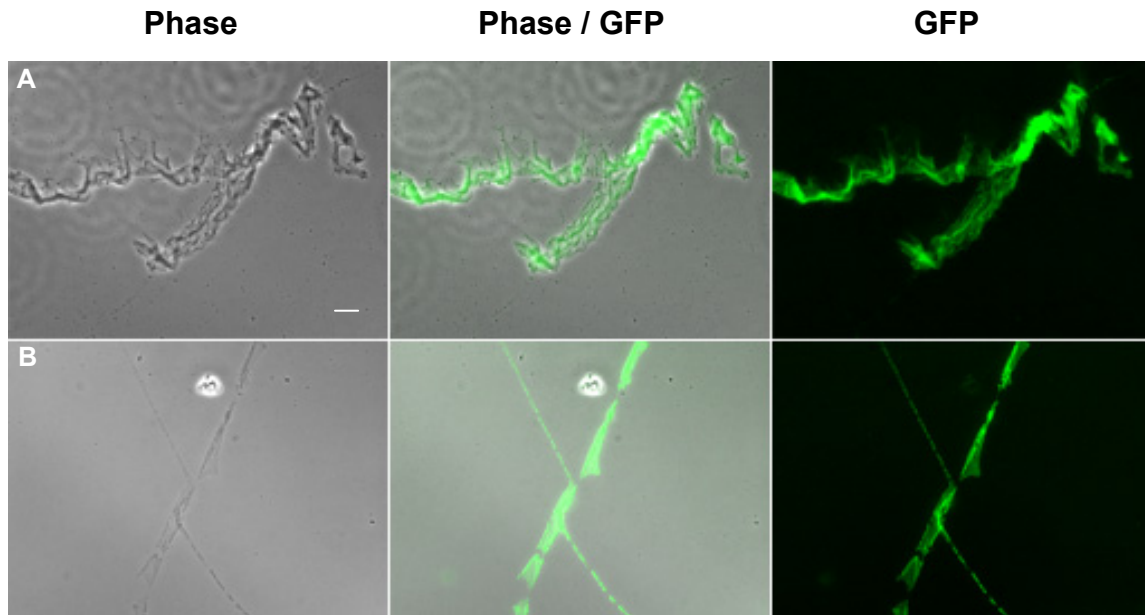


**Abb. 3.35:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren. 5 µg der Proteine wurden zehn Minuten mit dem entsprechenden Nukleotid bei RT inkubiert. FtsZ, ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP konnten *in vitro* nukleotidabhängig Polymere ausbilden. FtsZ bildete netzwerkartige oder röhrenförmige Strukturen aus, während ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>1</sub>-GFP fast ausschließlich Netzwerke ausbildeten. ParA<sub>2</sub> und ParA<sub>2</sub>-GFP polymerisierten zu langen Filamenten. Maßstabbalken = 5 µm.

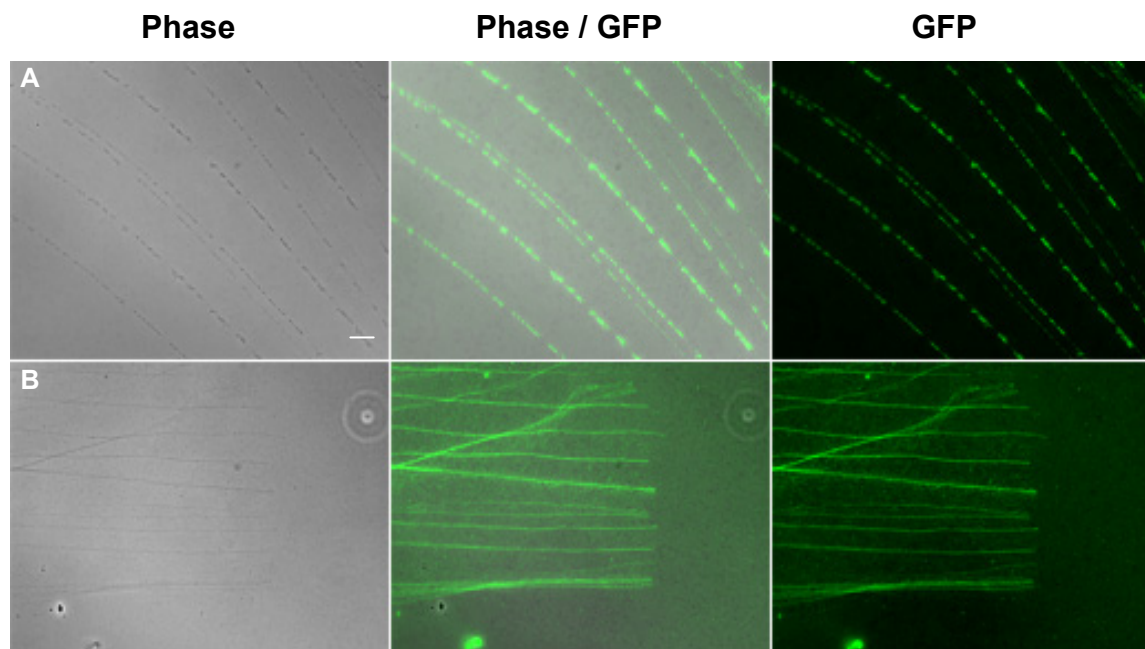
So konnten FtsZ, ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub>, ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP nukleotidabhängig große Polymere ausbilden. FtsZ assemblierte zu netzwerkartigen oder röhrenförmigen Strukturen. Auch FtsZ aus *M. tuberculosis* bildete lange Filamente aus, im Gegensatz zu FtsZ aus *E. coli*, welches zu kurzen Polymeren assemblierte (Chen *et*

*al.*, 2007a; Yu & Margolin, 1997). Dabei erreichte FtsZ aus *M. tuberculosis* die maximale Polymerisationsrate nach zehn Minuten und depolymerisierte erst nach einer Stunde, wodurch es lediglich ein Zehntel der Polymerisationsrate von FtsZ aus *E. coli* aufwies (White *et al.*, 2000). Die Filamente von FtsZ aus *C. glutamicum* waren ebenfalls bis zu einer Stunde bei RT stabil. ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>1</sub>-GFP bildeten große Netzwerke aus, während ParA<sub>2</sub> und ParA<sub>2</sub>-GFP zu langen Filamenten polymerisierte. So schienen die beiden ATPasen auch unterschiedliche Polymerstrukturen auszubilden. Die lichtmikroskopischen und damit die direkte Beobachtung der Polymere von ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> waren bisher noch nicht beschrieben. Da alle Proteine polymerisieren konnten, wurde nun überprüft, ob die Strukturen der Polymere durch Anwesenheit weiterer Proteine beeinflusst werden. So konnte in Gegenwart von einer der ATPasen kein FtsZ Polymer detektiert werden, zusätzlich depolymerisierten FtsZ Filamente nach Zugabe von ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> (Bilder nicht gezeigt). Weiterhin wurde dokumentiert, inwiefern sich die Polymere von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> abhängig von der Gegenwart von ParB, DivIVA und einer doppelsträngigen *parS* Sequenz veränderten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Proteinstrukturen sind in den Abbildungen 3.36 – 3.40 zusammengefasst. Nach ATP Zugabe polymerisierte ParA<sub>1</sub>-GFP zu einem Netzwerk, während ParA<sub>2</sub>-GFP lange Filamente ausbildete (Abbildung 3.36). Nach zusätzlicher Zugabe der doppelsträngigen *parS* Sequenz bildeten beide Proteine interessanterweise lange, parallel verlaufende Filamente aus (Abbildung 3.37). In Präsenz anderer doppelsträngiger DNS bildete ParA<sub>1</sub>-GFP kurze Filamente, die z. T. zu größeren Strukturen assemblieren, aus. ParA<sub>2</sub>-GFP bildete kürzere, gerade Filamente aus (Daten nicht gezeigt). Diese Abhängigkeit der ATPasen von der DNS konnte auch von Pratto und Kollegen gezeigt werden (Pratto *et al.*, 2008). So veränderte sich *in vitro* die ATPase Aktivität von ParA des Plasmids pSM19035 aus *S. pyogenes* durch Gegenwart der spezifischen *parS* Sequenz, allerdings in Gegenwart von ParB, bis zu einem vierfach erhöhten Wert, während die enzymatische Aktivität von ParA durch Zugabe anderer DNS die Aktivität um das Hälfte gesenkt wurde. Die Bindung der ATPasen an die *parS* Sequenz scheint somit Einfluss auf das Polymerisationsverhalten auszuüben. Wurden ParA<sub>1</sub>-GFP oder ParA<sub>2</sub>-GFP mit ATP, ParB und der *parS* Sequenz inkubiert, waren beide ATPasen ausschließlich über den ParB Strukturen lokalisiert (Abbildung 3.38) und bildeten keine langen Filamente mehr aus. Dieses Ergebnis unterstützt die aus den Aktivitätstests gewonnene Annahme, dass ParB mit den beiden ATPasen direkt

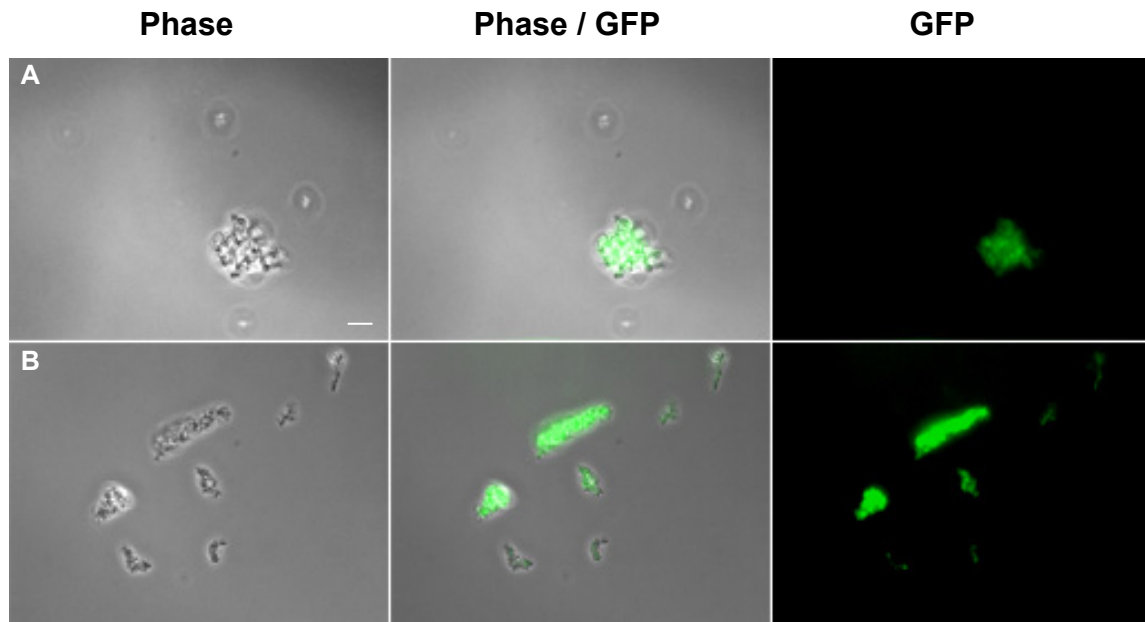
interagiert. Wurde diesem Ansatz DivIVA zugefügt, formierten sich ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP zu kleinen kurzen Nadeln (Abbildung 3.39).



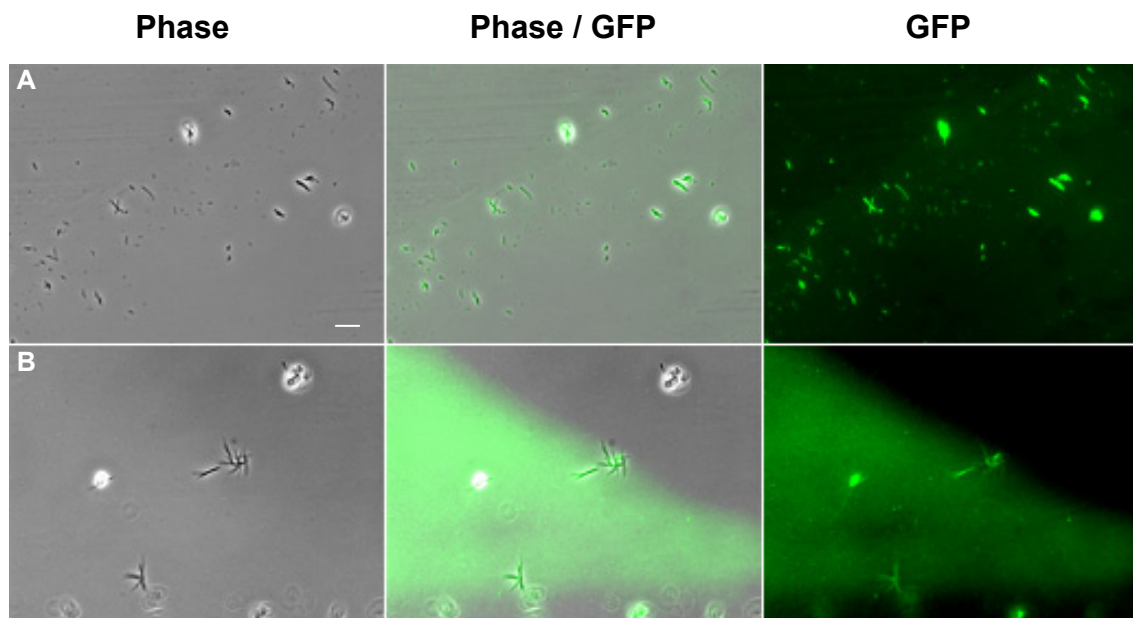
**Abb. 3.36:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren. Es wurden jeweils ParA<sub>1</sub>-GFP oder ParA<sub>2</sub>-GFP (jeweils ca. 5 µg Protein) mit 5 mM ATP für zehn Minuten bei RT inkubiert. ParA<sub>1</sub>-GFP (A) bildete ATP-abhängig netzwerkartige Strukturen aus, während ParA<sub>2</sub>-GFP (B) zu langen Filamenten polymerisierte. Maßstabbalken = 5 µm.



**Abb. 3.37:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren. Es wurden jeweils ParA<sub>1</sub>-GFP oder ParA<sub>2</sub>-GFP (jeweils ca. 5 µg Protein) mit 5 mM ATP und 1 µg doppelsträngiger *parS* Sequenz für zehn Minuten bei RT inkubiert. ParA<sub>1</sub>-GFP (A) und ParA<sub>2</sub>-GFP (B) bildeten lange, parallel verlaufende Filamente aus. Maßstabbalken = 5 µm.

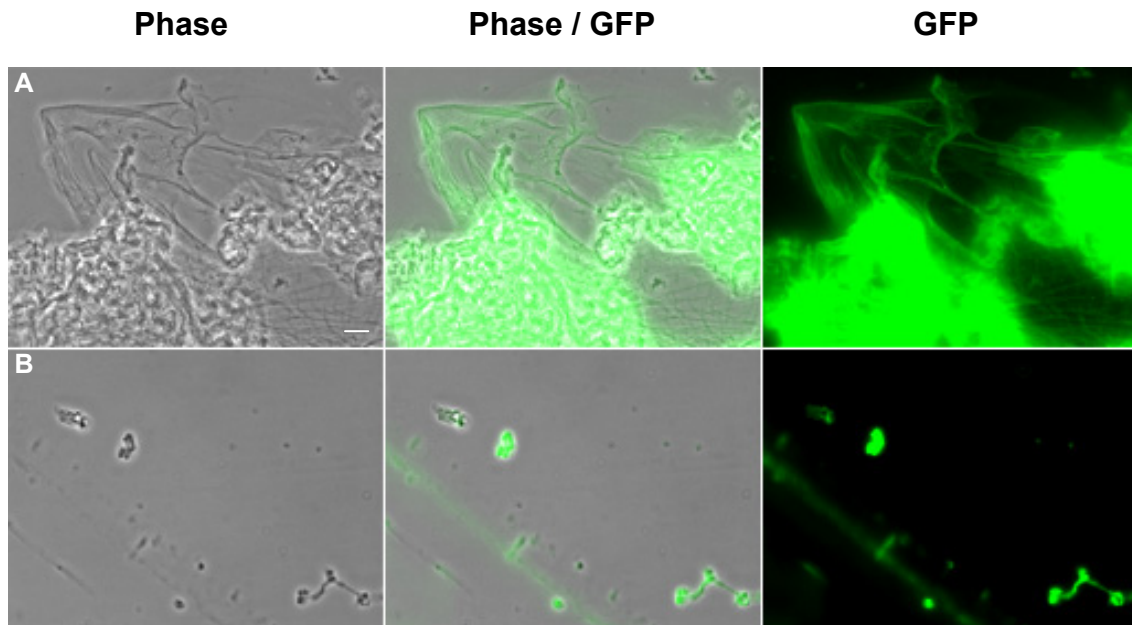


**Abb. 3.38:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren. Es wurden jeweils ParA<sub>1</sub>-GFP oder ParA<sub>2</sub>-GFP mit ParB (jeweils ca. 5 µg Protein), 5 mM ATP und 1 µg doppelsträngiger *parS* Sequenz für zehn Minuten bei RT inkubiert. ParA<sub>1</sub>-GFP (A) und ParA<sub>2</sub>-GFP (B) waren ausschließlich über den von ParB ausgebildeten Strukturen lokalisiert (nicht-fluoreszierende Strukturen). Maßstabbalken = 5 µm.



**Abb. 3.39:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren. Es wurden jeweils ParA<sub>1</sub>-GFP oder ParA<sub>2</sub>-GFP mit DivIVA (jeweils ca. 5 µg Protein), 5 mM ATP und 1 µg doppelsträngiger *parS* Sequenz für zehn Minuten bei RT inkubiert. ParA<sub>1</sub>-GFP (A) und ParA<sub>2</sub>-GFP (B) bildeten kurze Nadeln aus. Maßstabbalken = 5 µm.

Der auffälligste Unterschied zwischen ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP konnte beobachtet werden, wenn DivIVA, ParB und die *parS* Sequenz jeweils zusammen mit den ATPasen inkubiert wurde (Abbildung 3.40).



**Abb. 3.40:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren. Es wurden jeweils ParA<sub>1</sub>-GFP oder ParA<sub>2</sub>-GFP mit DivIVA, ParB (jeweils ca. 5 µg Protein), 5 mM ATP und 1 µg doppelsträngiger *parS* Sequenz für zehn Minuten bei RT inkubiert. Während ParA<sub>1</sub>-GFP große Polymere auf und zwischen den Proteinen ausbildete, polymerisierte ParA<sub>2</sub>-GFP zu kurzen, verdrillten Nadeln aus, die in Verdickungen endeten. Maßstab Balken = 5 µm.

So bildete ParA<sub>2</sub>-GFP verdrillte, kurze Filamente aus, die in Verdickungen endeten. ParA<sub>1</sub>-GFP hingegen polymerisierte räumlich über den anderen Proteinen zu einem großen Netzwerk und bildete Filamente zwischen diesen Komplexen aus. DivIVA schien die Polymerisation von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP direkt zu beeinflussen. So bildeten beide ATPasen in Gegenwart von DivIVA und eine doppelsträngigen *parS* Sequenz kurze, nadelartige Filamente aus. Sobald ParB zusätzlich in den Ansätzen vorhanden war, konnte ein großer Unterschied zwischen den Strukturen der Polymere von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP ausgemacht werden. ParA<sub>2</sub>-GFP bildete kurze, verdrillte Filamente aus, die in Verdickungen endeten. ParA<sub>1</sub>-GFP formierte sich, nachdem ParB hinzugefügt wurde, zu großen Polymeren, die sowohl große Netzwerke auf den Proteinen DivIVA und ParB ausbildeten, als auch zu langen Filamenten zwischen diesen Komplexen polymerisierten. Dies geschah nicht, wenn ParB aber kein DivIVA vorhanden war. ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP waren in



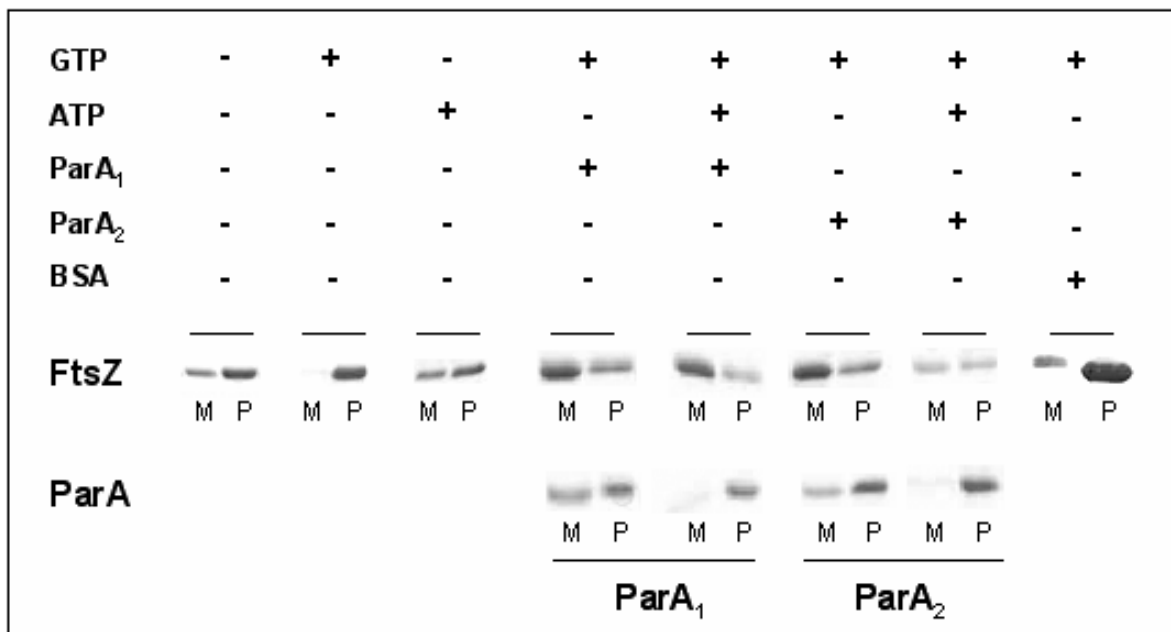
Gegenwart von ParB ausschließlich über den von ParB ausgebildeten Strukturen lokalisiert und bildeten keine Filamente aus. Das deutet daraufhin, dass sowohl ParB als auch DivIVA direkt mit den beiden ATPasen interagieren und ihre enzymatische Aktivität beeinflussen. Zusätzlich unterstützt das Ergebnis die Annahme, dass ParA<sub>2</sub> an der Verankerung des ParB-*parS*-Komplexes beteiligt ist, während ParA<sub>1</sub> eher eine Funktion beim Schutz und der Segregation des Chromosoms zukommt.

### **3.10 *In vitro* Polymerisationsassays**

#### **3.10.1 *In vitro* Polymerisationsassay mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>**

Eine mögliche Inhibition der Polymerisation von FtsZ durch die beiden ATPasen sollte mittels eines Polymerisationsassays *in vitro* nachgewiesen werden. Dafür wurden jeweils 50 µg FtsZ mit oder ohne Nukleotid und mit oder ohne ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> inkubiert (ebenfalls jeweils 50 µg). Diese Proben wurden nach der Inkubation durch Ultrazentrifugation in die Monomer- (Überstand) und die Polymer- (Pellet) Fraktion unterteilt. Diese Fraktionen wurden dann auf einem SDS-Gel getrennt. Ergebnisse eines Assays sind in Abbildung 3.41 zusammengefasst. FtsZ lag ohne Nukleotidzugabe in etwa gleichen Teilen in der Monomer- und der Polymerfraktion vor. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass FtsZ ab einer bestimmten Konzentration (ca. 1 µM) kooperativ zu Polymeren assembliert (Dajkovic *et al.*, 2008a). Ab einer Konzentration von 2 bis 3 µM bildet es Netzwerke aus (Esue *et al.*, 2005), die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnten (siehe 3.9). Dieser Mechanismus ist bisher noch nicht verstanden. FtsZ konnte nur unter Verbrauch von GTP polymerisieren, während es ATP nicht enzymatisch verwenden konnte, so dass das anfängliche Verhältnis von Monomer- zu Polymerfraktion erhalten blieb. Nach Inkubation mit ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> konnte FtsZ, trotz GTP, nicht polymerisieren. Diese Inhibition wurde durch Zugabe von ATP verstärkt, da FtsZ vermehrt als Monomer vorlag, während die ATPasen vollständig in der Polymerfraktion nachweisbar waren. Dasselbe Ergebnis erhielten Thanbichler und Shapiro mit MipZ (Thanbichler & Shapiro, 2006). FtsZ aus *C. crescentus* konnte ebenfalls in Gegenwart von ATP nicht polymerisieren. Die Autoren zeigten auch mittels eines Polymerisationsassays, dass MipZ die Polymerisation von FtsZ inhibierte und diese Inhibition wurde ebenfalls durch Zugabe von ATP gesteigert. So wurde angenommen, dass MipZ durch

Veränderung der enzymatischen Aktivität von FtsZ und Beeinflussung seiner Filamentstruktur, die FtsZ Polymerisation inhibiert wird.



**Abb. 3.41:** Ergebnisse eines Polymerisationsassays mit FtsZ (50 µg) aufgetrennt in einem 10 %igem SDS-Gel. M = Monomerfraktion, P = Polymerfraktion. Man konnte nachweisen, dass FtsZ in Gegenwart von GTP vollständig polymerisierte, während die Polymerisation durch zusätzliche Zugabe von ParA<sub>1</sub> (50 µg) oder ParA<sub>2</sub> (50 µg) inhibiert werden konnte. Eine Kontrolle mit BSA zeigte, dass diese Inhibition spezifisch war. Wenn zusätzlich ATP hinzugefügt wurde, lag FtsZ größtenteils als Monomer vor, während die ATPasen polymerisierten.

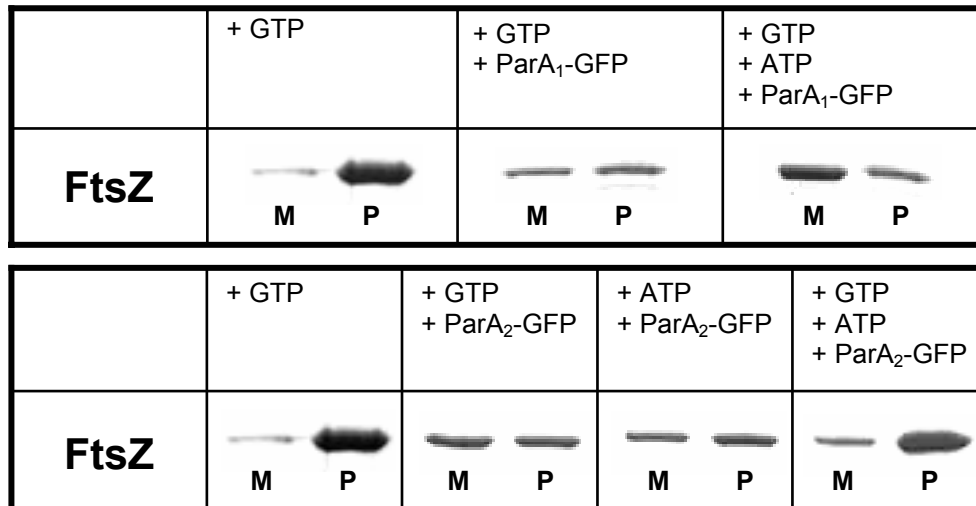
In *C. glutamicum* scheinen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> die Polymere von FtsZ zu destabilisieren, da eine Zugabe der ATPasen zu bereits polymerisierten FtsZ zu dem gleichen Effekt führten. So konnte *in vitro* die Annahme bestätigt werden, dass die beiden ParA Proteine die FtsZ Polymerisation inhibieren, und dadurch das Chromosom vor der Septumbildung schützen.

### 3.10.2 *In vitro* Polymerisationsassay mit ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP ebenfalls die FtsZ Polymerisation inhibieren. Wenn die beiden Fusionsproteine ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP ähnliche biochemische Aktivität besitzen wie ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub>, ist es wahrscheinlich, dass die Lokalisationsstudien der Proteine *in vivo* die Lokalisation der nativen Proteine widerspiegeln. Zum Nachweis, dass ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP ebenfalls die FtsZ Polymerisation inhibieren können, wurde ein Polymerisationsassay mit den beiden Fusionsproteinen durchgeführt. Hierfür wurden 50 µg der jeweiligen



Proteine in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP und GTP inkubiert und die Monomer- und Polymerfraktionen durch Ultrazentrifugation getrennt und auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Ergebnisse dieser Assays sind in Abbildung 3.42 aufgezeigt.

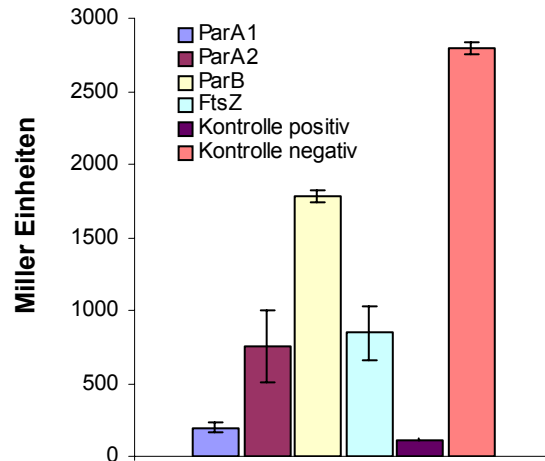


**Abb. 3.42:** Ergebnisse eines Polymerisationsassays mit FtsZ (50 µg), aufgetrennt in einem 10 %igem SDS-Gel. M = Monomerfraktion, P = Polymerfraktion. FtsZ polymerisierte in Gegenwart von GTP vollständig, während die Polymerisation durch zusätzlich Zugabe von ParA<sub>1</sub>-GFP (50 µg) oder ParA<sub>2</sub>-GFP (50 µg) inhibiert werden konnte. Wenn zusätzlich ATP hinzugefügt wurde, lag FtsZ im Falle von ParA<sub>1</sub>-GFP größtenteils als Monomer vor, während in Gegenwart beider Nukleotide ParA<sub>2</sub>-GFP eine geringere Inhibition aufwies als in Gegenwart der einzelnen Nukleotide.

Die Polymerisationsassays zeigten, dass ParA<sub>1</sub>-GFP *in vitro* die FtsZ Polymerisation inhibieren konnte. Die GFP-Fusion schien die Funktionalität der beiden ATPasen im Falle von ParA<sub>1</sub> nicht zu beeinflussen. Allerdings war die Inhibition durch ParA<sub>2</sub>-GFP durch die GFP-Fusion negativ beeinflusst. Interessanterweise inhibierte ParA<sub>2</sub>-GFP die FtsZ Polymerisation in Gegenwart von ATP oder GTP, aber kaum in Gegenwart beider Nukleotide. So scheint die GFP-Fusion enzymatische Aktivität von ParA<sub>2</sub> zu beeinträchtigen, da die ATP Hydrolyse von ParA<sub>2</sub>-GFP ebenfalls geringer war, als bei ParA<sub>2</sub>. Allerdings scheint ParA<sub>2</sub> seine Funktionalität durch die GFP-Fusion nicht vollständig verloren zu haben, da es, neben der Bindung an DNS, sowohl enzymatische Aktivität zeigte als auch eine Inhibition der FtsZ Polymerisation in Gegenwart von ATP oder GTP aufwies. Dadurch ist anzunehmen, dass die subzelluläre Lokalisation der beiden Fusionsproteine innerhalb der Zellen von AS4 und AS5 dem der nativen Proteine entspricht.

### **3.11 Interaktion der Par Proteine mit FtsZ und DivIVA**

Um einen weiteren, unabhängigen Nachweis der Interaktionen der Par Proteine untereinander und mit FtsZ und DivIVA aufzeigen zu können, wurden mögliche Ausbildungen von Heterodimeren durch ein bakterielles Zwei-Hybrid-System untersucht. Dafür wurden die entsprechenden Gene in die Plasmide pMS604 und pDP804 inseriert, die einmal eine native (pMS604) und einmal eine modifizierte (pDP804) LexA-Bindedomäne besaßen (Dmitrova *et al.*, 1998). Durch Expression wurden so Fusionsproteine mit der entsprechenden LexA-Bindedomäne synthetisiert. Eine Interaktion der Fusionsproteine führte zu einer Dimerisierung dieser Bindedomänen. Durch Dimerisierung agiert LexA als Repressor, wodurch die konstruierten Fusionsproteine durch Interaktion in den *E. coli* Stämmen SU101 und SU202 das *lacZ* Gen reprimierten, da in diesen Stämmen jeweils das *lacZ* Gen unter Kontrolle des Wildtypoperators von LexA (SU101) bzw. unter Kontrolle eines Hybridoperators (SU202), in das Genom inseriert wurde. In dem *E. coli* Stamm SU101 konnten nur Homodimere der nativen LexA-Bindedomäne an den Operator binden, in dem Stamm SU202 hingegen nur Heterodimere aus beiden LexA-Bindedomänen. Anhand eines  $\beta$ -Galactosidase-Tests konnte dann die Stärke der Interaktion der Proteine nachgewiesen werden. Vorausgesetzt wird, dass die gewünschten Proteine keine Interaktion mit Proteinen des *E. coli* Stamms eingehen. Zudem würde eine Bindung der beiden ATPasen an die chromosomale DNS von *E. coli* ebenfalls die Interaktionsstudie verfälschen. In den beiden benutzten Stämmen ist kein Par System vorhanden, allerdings das hochkonservierte FtsZ. Für eine Positiv-Kontrolle wurden die eukaryotischen Jun und Fos Leucin-Zipper benutzt, welche Heterodimere ausbilden (Kouzarides & Ziff, 1988) und als Negativ-Kontrolle wurden das Leerplasmid pDP804 und pMS604-*ftsZ* in die Stämme transformiert und induziert. In Abbildung 3.43 ist das Ergebnis eines  $\beta$ -Galactosidase-Tests zur Kontrolle einer Homodimerisierung abgebildet. Die Positiv-Kontrolle hatte 116 Miller Einheiten, während für die Negativ-Kontrolle 2700 Miller Einheiten errechnet werden konnte. Mehr als 50 % der Negativ-Kontrolle werden als schwache bis keine Interaktion gewertet. Die Daten zeigten, dass ParA<sub>1</sub>, mit knapp 200 Miller Einheiten, eine sehr hohe Affinität zur Homodimerisierung besitzt. ParA<sub>2</sub> (750 Miller Einheiten) und FtsZ (850 Miller Einheiten) bilden ebenfalls Homodimere aus, wenngleich nicht so stark wie ParA<sub>1</sub>.

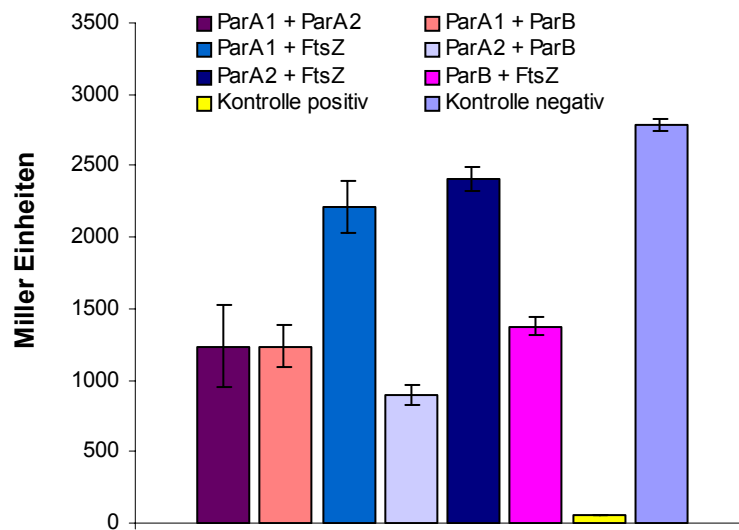


**Abb.3.43:**  $\beta$ -Galactosidase-Test zum Nachweis von Homodimerisierung von Proteinen in *E. coli* SU101. Abgebildet sind die Miller Einheiten, welche abhängig von der Interaktion gemessen werden konnten. Ein niedriger Wert bedeutet eine starke Interaktion. ParA<sub>1</sub> besitzt die größte Affinität, Homodimere zu bilden. Sowohl ParA<sub>2</sub> als auch FtsZ interagieren mit sich selbst, während ParB eine geringe Homodimerisierung vorweist.

ParB hingegen schien unter diesen Bedingungen nur begrenzt Homodimere auszubilden. Allerdings wurde diese schwache Interaktion von ParB auch in *C. crescentus* gezeigt (Bowman *et al.*, 2008). Wahrscheinlich wird die Affinität von ParB, Homodimere auszubilden, durch Gegenwart der *parS* Domänen erhöht. Die hohe Affinität der drei Proteinen ParA<sub>1</sub>, ParA<sub>2</sub> und FtsZ Homodimere zu bilden, passt zu der Fähigkeit dieser Proteine, zu Polymeren assemblieren zu können.

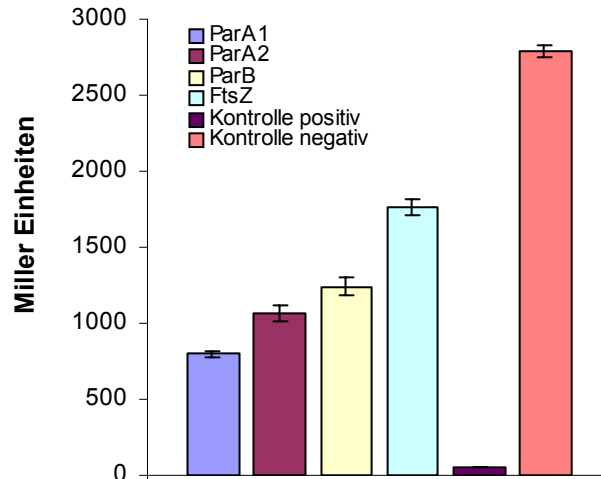
Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Tests zur Untersuchung der Heterodimerisierung der Proteine ist in Abbildung 3.44 gezeigt. ParA<sub>1</sub> ging demnach eine starke Interaktion mit ParA<sub>2</sub> (1250 Miller Einheiten) und ParB (1250 Miller Einheiten) ein. Die stärkste Interaktion konnte für ParA<sub>2</sub> und ParB nachgewiesen werden (900 Miller Einheiten). Auch interagierte ParB mit FtsZ (1400 Miller Einheiten). Unerwarteterweise gingen weder ParA<sub>1</sub> noch ParA<sub>2</sub> mittels des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems nachweisbare Interaktionen mit FtsZ ein (2200 bzw. 2400 Miller Einheiten), wodurch der Mechanismus der Inhibition der Polymerisation weiterhin unklar bleibt. Diese Ergebnisse unterstützen jedoch die Beobachtung, dass ParB mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> interagieren kann. Die starke Interaktion von ParA<sub>2</sub> und ParB wird auch durch die *in vivo* Lokalisation bestätigt. Beide Proteine kolokalisieren, weshalb ein ParA<sub>2</sub>-ParB-*parS*-Komplex für eine Verankerung der *oriC* Region an die Pole verantwortlich sein könnte. Es ist nicht klar, ob ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> Hetero-Polymere

ausbilden können, wie z. B. MreB mit Mbl und MreBH (Soufo & Graumann, 2006), oder die Interaktion andere Funktionen hat.



**Abb.3.44:**  $\beta$ -Galactosidase-Test zum Nachweis von Heterodimerisierung von Proteinen in *E. coli* SU202. Abgebildet sind die Miller Einheiten, welche abhängig von der Interaktion gemessen werden konnten. Ein niedriger Wert bedeutet eine starke Interaktion. ParA<sub>1</sub> bildete mit ParA<sub>2</sub> und ParB Heterodimere. Während beide ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> kaum mit FtsZ interagierten, wies ParB-ParA<sub>2</sub> die stärkste Interaktion vor. ParB bildete mit FtsZ ebenfalls Heterodimere aus.

DivIVA kommt als möglicher topologischer Faktor für eine polare Lokalisation des ParB-*parS*-Komplexes in Frage. Daher sollte überprüft werden, ob die Par Proteine mit DivIVA interagieren. Da *in vitro* signifikante Unterschiede in der Polymerstruktur von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP dokumentiert werden konnten, wenn diese mit DivIVA, ParB und der doppelsträngigen *parS* Sequenz inkubiert wurden (siehe 3.9), ist es wahrscheinlich, dass DivIVA mit den Par Proteinen interagiert. Während ParA<sub>2</sub>-GFP zu kurzen, verdrillten Filamenten polymerisierte, bildete ParA<sub>1</sub>-GFP große Strukturen über den Proteinen ParB und DivIVA sowie lange Filamente zwischen diesen Komplexen aus. Um die Interaktion der Par Proteine mit DivIVA zu bestätigen, wurde ebenfalls das bakterielle Zwei-Hybrid eingesetzt. Daten der  $\beta$ -Galactosidase-Messung sind in Abbildung 3.45 aufgeführt. Demnach bildete DivIVA mit allen drei Par Proteinen Heterodimere, wobei es die stärksten Interaktionen mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> (800 bzw. 1070 Miller Einheiten) einging.



**Abb.3.45:**  $\beta$ -Galactosidase-Test zum Nachweis einer Heterodimerisierung mit DivIVA in *E. coli* SU202. Abgebildet sind die Miller Einheiten, welche abhängig von der Interaktion gemessen werden konnten. Ein niedriger Wert bedeutet eine starke Interaktion. DivIVA ging mit einen drei Par Proteinen eine Heterodimerisierung ein, wobei die stärkste Interaktion mit ParA<sub>1</sub> aber auch ParA<sub>2</sub> detektiert werden konnte. FtsZ scheint kaum mit DivIVA zu interagieren.

Die schwächste Interaktion zeigte DivIVA mit FtsZ (1750 Miller Einheiten). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Lokalisation der Proteine in den Zellen. So sind alle drei Proteine meist polar oder am Septum lokalisiert. Lediglich ParA<sub>1</sub> bildete größtenteils Polymere über großen Teilen des Chromosoms aus, welche allerdings die höchste Konzentration an den Polen aufwies. Demnach könnte ParA<sub>1</sub> zu den ParB-*parS*-Komplex rekrutiert werden, von wo aus es sich über dem Chromosom verteilt und durch Polymerisation, ausgehend von den Polen und damit von DivIVA, an der Segregation des Chromosoms beteiligt ist. ParA<sub>2</sub> könnte, da es sowohl mit ParB als auch mit DivIVA starke Interaktionen eingeht, die Verankerung des Chromosoms an DivIVA verantworten und / oder beim Schutz der Pole gegen eine Septumbildung eine Rolle spielen.

## IV. Diskussion

Die Zellteilung ist ein Prozess von fundamentaler Bedeutung für jede Zelle. Der Teilungsmechanismus von Eukaryoten ist gut untersucht. So geht der Zellteilung, der Zytokinese, eine Kernteilung, die Mitose bzw. Meiose, voraus, während für beide Vorgänge Zytoskelettelemente eine entscheidende Rolle spielen (Alberts *et al.*, The Cell, 4. Edition). Im Verlauf der Kernteilung werden die replizierten Chromosomen durch einen Spindelapparat auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die Stelle, an der beide Chromatiden zusammenhängen, das sogenannte Zentromer, ist der Ansatzpunkt des Spindelapparates. Der Spindelapparat besteht aus Mikrotubuli, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinmolekülen gebildet werden. Diese  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinmonomere können GTP-abhängig helikal polymerisieren und auf diese Weise lange Filamente ausbilden, die nach Hydrolyse des GTPs zu GDP, wieder depolymerisieren. Die Mikrotubuli werden zum einen von den Polen ausgehend gebildet (polare Mikrotubuli) und zum anderen entstehen sogenannte Kinetochor-Mikrotubuli, die sich an den Kinetochoren (Proteinstrukturen, die den Zentromeren aufsitzen) der Chromosomen anlagern. So werden die Chromosomen vom Zentromer aus durch (De-)Polymerisation der Tubulinfilamente auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt. Für die Zytokinese hingegen spielen Aktine eine entscheidende Rolle. Der kontraktile Ring, durch welchen die Tochterzellen geteilt werden, besteht unter anderem aus Aktinpolymeren. Aktin polymerisiert ATP-abhängig zu Filamenten, indem zwei Ketten polymerisierender Aktinmonomere sich helixartig umeinanderwinden. Dabei werden in tierischen Zellen zwei Filamentstrukturen von Aktin unterschieden: es gibt sowohl Aktine, die zu langen Filamenten polymerisieren (*stress fibers*), als auch Aktine, die netzwerkartige Strukturen ausbilden (kortikales Netz unterhalb der Plasmamembran) (Alberts *et al.*, The Cell, 4. Edition). Viele Transmembranproteine werden direkt oder indirekt an dem kortikalen Aktinnetzwerk verankert, wodurch funktionell zusammengehörende Proteine in räumlicher Nähe gehalten werden.

Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Zytoskelettelemente auch in Bakterien vorkommen und dort ebenfalls an der Zellteilung und der Chromosomensegregation beteiligt sind (Leonard *et al.*, 2005). Allerdings übernimmt in Bakterien das Tubulinhomolog die Ausbildung des Septums und Aktinhomologe sind an der Chromosomensegregation beteiligt.

#### **4.1 Zytoskelettelemente und Chromosomensegregation in Bakterien**

FtsZ, ein Tubulinhomolog, ist das erste Zellteilungsprotein, das an der zukünftigen Teilungsebene lokalisiert (Bi & Lutkenhaus, 1991) und ist somit das zentrale Protein des zytokinetischen Ringes. FtsZ besitzt GTPase Aktivität (de Boer *et al.*, 1992) und bildet GTP-abhängig ähnliche Strukturen wie Tubulin aus (Erickson *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu Tubulin, dessen Filamente aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Molekülen aufgebaut sind, bestehen die Polymere von FtsZ aus gleichen Untereinheiten. FtsZ polymerisiert kooperativ zu kürzeren Protofilamenten, die lateral miteinander assemblieren und auf diese Weise lange Filamente ausbilden können (Lan *et al.*, 2008). Aktinhomologe sind an der Plasmid- und Chromosomensegregation beteiligt. Soufo und Graumann konnten zeigen, dass das Aktinhomolog MreB aus *B. subtilis* an der Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen beteiligt ist (Soufo & Graumann, 2003). Demnach scheint die Positionierung des Chromosoms zu den Polen in *B. subtilis* durch helikale Polymerisation von MreB dirigiert zu werden. Allerdings ist diese Funktion von MreB in *B. subtilis* kontrovers diskutiert, da in MreB Deletionsmutanten die Chromosomen ebenfalls segregiert werden (Formstone & Errington, 2005). Neben MreB wurde ParM, ein weiteres Aktinhomolog, identifiziert. ParM ist Teil des plasmidkodierten Par Systems des Plasmids R1 aus *E. coli*, das für die korrekte Segregation des Plasmids verantwortlich ist. Das plasmidkodierte Par System besteht aus drei Komponenten: dem Protein ParR, welches spezifisch an die *parC* Sequenzen auf dem Plasmid bindet und der ATPase ParM. Nach Bildung des ParR-*parC*-Komplexes, wird ParM rekrutiert und verteilt, durch Polymerisation zwischen den beiden Plasmiden, die Plasmide zu den entgegengesetzten Polen der Zelle (Möller-Jensen *et al.*, 2003). Das chromosomale Par System besteht ebenfalls aus drei Komponenten (Funnell, 2005; Ebersbach & Gerdes, 2005; Leonard *et al.*, 2005): ein oder mehrere *cis*-agierende DNS Sequenzen (*parS*), welche beidseitig nahe der *oriC* Region des Chromosoms liegen, einer ATPase (ParA oder Soj in *B. subtilis*) und einem Protein (ParB oder Spo0J in *B. subtilis*), welches spezifisch an die *parS* Sequenzen als Di- oder Oligomer bindet (Schumacher & Funnell, 2005). Durch Bindung von ParB an die *parS* Sequenzen wird ParA rekrutiert und beginnt zu polymerisieren, wodurch die Chromosomen getrennt werden. Die *parS* Region nahe des Replikationsursprungs stellt damit das bakterielle Homolog des eukaryotischen Zentromers dar. Die Beteiligung des Par Systems an der Chromosomensegregation konnte unter anderem in *V. cholerae* gezeigt werden (Yamaichi *et al.*, 2007). So

besitzen beide Chromosomen in *V. cholerae* ein eigenes Par System. Interessanterweise konnte ParB des Par Systems des Chromosoms I nicht an die *parS* Sequenzen des Chromosoms II binden und umgekehrt. Die Lokalisation und Segregation der beiden Chromosomen in *V. cholerae* werden demnach unabhängig voneinander durch zwei verschiedene Par Systeme gewährleistet. In *C. crescentus* ist ebenfalls das chromosomal kodierte Par System für die Chromosomensegregation verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von ParA in *C. crescentus* zu Defekten der Chromosomensegregation führte (Mohl *et al.*, 2001). Allerdings bildete sich kein Septum über der DNS aus, die durch einen weiteren Faktor, dem *nucleoid occlusion* System, gegen eine Septumformation geschützt wird. Die Trennung der replizierten Chromosomen durch polymerisierendes ParA wird durch Bindung von ParB an die konservierten *parS* Sequenzen initiiert (Easter & Gober, 2002; Mohl & Gober, 1997). So ist ParB immer subzellulär an einem Pol bzw. während der Segregation an beiden Polen lokalisiert (Thanbichler & Shapiro, 2006). Zusätzlich wurde in *C. crescentus* eine zweite ATPase, MipZ, identifiziert, welche die Lokalisation der Zellteilungsebene reguliert, indem es die FtsZ Polymerisation inhibiert (Thanbichler & Shapiro, 2006). MipZ bindet an den ParB-*parS*-Komplex und akkumuliert an den Polen, da der Replikationsursprung in *C. crescentus* polar lokalisiert ist. Dadurch kann FtsZ, in Abhängigkeit der MipZ-Konzentration, nur in der Mitte der Zellen assemblieren und die Bildung des Septums initiieren. MipZ ist in allen  $\alpha$ -Proteobakterien, die kein MinCD besitzen, hochkonserviert (Thanbichler & Shapiro, 2006) und weist eine Homologie zu MinD auf (Abbildung 4.1). Obwohl MipZ die gleiche Funktion wie das MinCD System übernimmt (Hu *et al.*, 1999), scheint der Mechanismus der Inhibition der Polymerisation von FtsZ unterschiedlich zu sein. Im Gegensatz zu MipZ verändert das Min System weder die GTPase Aktivität von FtsZ, noch hat es Einfluss auf seine Polymerisation (Hu *et al.*, 1999). Neben MipZ, das an den ParB-*parS*-Komplex bindet, interagiert PopZ mit diesem Komplex und verankert ihn an den Zellpolen (Bowman *et al.*, 2008). So werden in *C. crescentus* durch Bildung des ParB-*parS*-Komplexes die Trennung der replizierten Chromosome durch ParA initiiert und MipZ rekrutiert. MipZ schützt das Chromosom gegen die Septumbildung und reguliert dadurch die Lokalisation der Zellteilungsebene. Zusätzlich wird das Chromosom durch diesen Komplex an den Polen durch PopZ verankert.

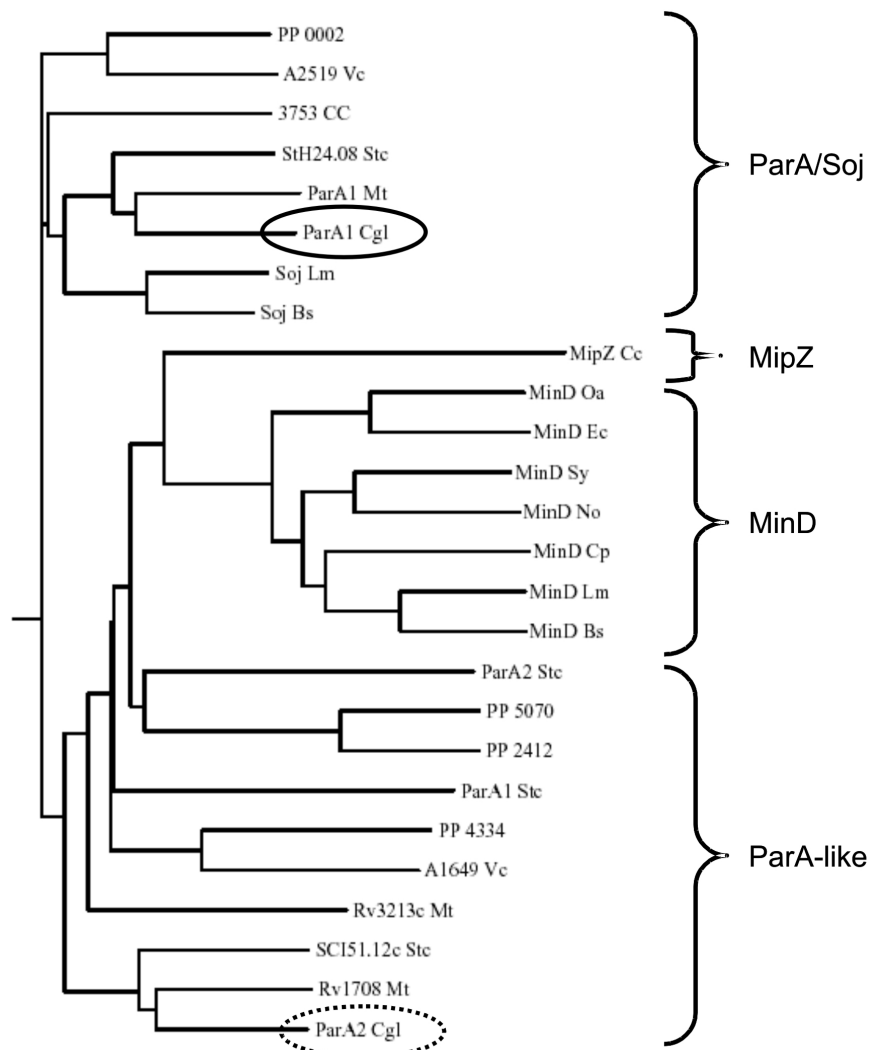


## 4.2 Par System in *C. glutamicum*

Neben *C. crescentus*, als Vertreter der  $\alpha$ -Proteobakterien, gibt es weitere Modellorganismen die über kein Min System verfügen. *C. glutamicum* zum Beispiel, das keine Verwandtschaft zu den  $\alpha$ -Proteobakterien aufweist, besitzt ebenfalls kein Min System, noch wurden in diesem Organismus Proteine des *nucleoid occlusion* Systems identifiziert. Zudem enthält das Genom von *C. glutamicum* lediglich eine reduzierte Anzahl an Zellteilungsproteinen (Letek *et al.*, 2008a), da es weder Aktinhomologe wie MreB oder FtsA, die an der lateralen Zellwandsynthese und der Stabilisation des Z-Rings in anderen stäbchenförmigen Modellorganismen beteiligt sind, besitzt (Daniel & Errington, 2003; Hale & de Boer 1997; RayChaudhuri, 1999). Trotzdem erreicht es unter Idealbedingungen eine kurze Generationszeit von ca. 25 Minuten, was auf eine schnelle und effiziente Regulation der Replikation, Chromosomentrennung und Zellteilung schließen lässt. Da in *C. glutamicum* ein Par System chromosomal kodiert ist, sollte dieses System bezüglich seiner Funktion im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Das Par System besteht in *C. glutamicum* aus einem *parA<sub>1</sub>B* Operon, welches nahe dem *oriC* liegt und einem zweiten Gen, *parA<sub>2</sub>*, das für eine weitere ParA ATPase kodiert und auf dem gegenüberliegenden Teil des Chromosoms lokalisiert ist. Das *parA<sub>1</sub>B* Operon könnte allerdings Teil eines größeren, konservierten Operons sein, das es mit Proteinen von grundlegender Funktion teilt (Jakimowicz *et al.*, 2007). Zu diesen Proteinen gehört GidB (ein Zellteilungsprotein), RnpA (Untereinheit von RNase P) und RpmH (50S ribosomales Protein L34). Somit wäre das Par Operon transskriptionell mit weiteren zellzyklusabhängigen Proteinen reguliert und scheint damit eine profunde Funktion innerhalb der Zelle zu übernehmen. Hinweise dafür wurden sowohl in *C. crescentus*, als auch in *B. subtilis* und *E. coli* erbracht (Figge *et al.*, 2003; Murray & Errington, 2008; Fung *et al.*, 2001). So bindet ParA-ADP hochaffin an den Operator des *parAB* Operons, wodurch dieses reprimiert wird. ParA-ATP hingegen interagiert mit dem ParB-*parS*-Komplex und kann polymerisieren. ParB interagiert direkt mit ParA und erhöht seine ATPase Aktivität, wodurch ParA zum einen vom Operator diffundiert und diesen nicht mehr reprimiert. Zum anderen wird die Bindung an die DNS und die Polymerisation gefördert (Figge *et al.*, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Soj (ParA) aus *B. subtilis* direkt mit DnaA, dem Protein, das die Replikation initiiert, interagiert und dieses reguliert (Murray & Errington, 2008). Der Status von ParA, ATP oder ADP bindend, erfüllt demnach die Aufgabe eines

molekularen Schalters, der sowohl die Replikation als auch die Chromosomensegregation reguliert. Welche Funktion das Par System in *C. glutamicum* übernimmt, war bisher nicht bekannt. Die Beteiligung des Par Systems an der Chromosomensegregation konnte bereits in einem nahen Verwandten von *C. glutamicum*, *M. smegmatis*, nachgewiesen werden (Jakimowicz *et al.*, 2007). Jakimowicz und Mitarbeiter konnten im Genom von *M. smegmatis* ebenfalls drei *parS* Domänen nahe des Replikationsursprungs identifizieren, die von ParB hochspezifisch gebunden werden. Diese Bindung wird durch die Gegenwart von ParA gefördert (Jakimowicz *et al.*, 2007). Eine Deletion von ParB ist in *M. smegmatis*, im Gegensatz zu *M. tuberculosis*, nicht lethal, führt aber zu einer signifikant höheren Anzahl an Minizellen, wodurch die Autoren auf die Beteiligung von ParB an der korrekten Chromosomensegregation in *M. smegmatis* schließen. Demnach könnte das Par System in *C. glutamicum* ebenfalls die Aufgabe der Chromosomensegregation übernehmen. Da *C. glutamicum*, ähnlich wie *C. crescentus*, eine zweite ATPase besitzt, stellt sich die Frage, inwiefern sich die Funktionen von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> unterscheiden und ob eventuell eine Redundanz vorliegt. Da MinD, welches in verschiedenen Modellorganismen konserviert ist, und MipZ eine Verwandtschaft insbesondere mit ParA<sub>2</sub> aufweisen (Michie & Löwe, 2006) (Abbildung 4.1), könnte eine Funktion als Inhibitor der FtsZ Polymerisation möglich sein. Auffallend ist allerdings, dass sich die beiden ATPasen MinD und MipZ in ihrer Funktion unterscheiden. Während MipZ selbst die Polymerisation von FtsZ inhibiert (Thanbichler & Shapiro, 2006), ist MinD ATP-abhängig für die Membranbindung des eigentlichen Inhibitors des Min Systems, MinC, verantwortlich (Hu & Lutkenhaus, 2001; Suefuji *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 1999). Interessanterweise ist in  $\alpha$ -Proteobakterien, die kein Min System und damit kein MinD besitzen, das Gen einer zweiten ATPase konserviert (Thanbichler & Shapiro, 2006). Aus diesem Grund könnte ParA<sub>2</sub> in *C. glutamicum* eine ähnliche Funktion wie MipZ in *C. crescentus* übernehmen. ParA<sub>1</sub> aus *C. glutamicum* wiederum ist näher mit ParA aus *C. crescentus* verwandt, das ausschließlich an der Chromosomensegregation beteiligt ist (Easter & Gober, 2002; Mohl & Gober, 1997). Demnach könnten die beiden ParA Proteine, ähnlich wie in *C. crescentus*, unterschiedliche Aufgaben während der Zellteilung wahrnehmen. So zeigen die ParA Proteine aus *C. glutamicum* Beziehungen zu Proteinen, die sowohl an der Chromosomen-

segregation beteiligt sind, als auch Verwandtschaft zu Proteinen, die eine Assemblierung von FtsZ inhibieren.



**Abb. 4.1:** Verwandtschaft der MinD und ParA Proteine. Das Dendrogramm wurde, basierend auf der Aminosäuresequenz der unterschiedlichen ParA und MinD Proteine, mit clustalW erstellt. Die Sequenzen wurden aus dem *genome information broker* (<http://gib.genes.nig.ac.jp>) bezogen. ParA und MinD Proteine weisen eine evolutionäre Verwandtschaft auf. Für MipZ aus *C. crescentus* (MipZ Cc) konnte eine Rolle bei der Lokalisation der Teilungsebene gezeigt werden (Thanbichler & Shapiro 2006). Die beiden ParA Proteine von *C. glutamicum* zeigen unterschiedliche verwandtschaftliche Grade auf. Während ParA<sub>1</sub> Verwandtschaft mit den ParA/Soj Proteinen aufweist, ist ParA<sub>2</sub> mit den MinD Proteinen verwandt. *Pseudomonas putida* KT2440 (PP); *Vibrio cholerae* O395 (VC); *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Stc); *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mt); *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (Cgl); *Listeria monocytogenes* 4b F2365 (Lm); *Bacillus subtilis* 168 (Bs); *Caulobacter crescentus* CB15 (Cc); *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188 (Oa); *Escherichia coli* K12 (Ec); *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sy); *Clostridium perfringens* 13 (Cp); *Nostoc* sp. PCC 7120 (No).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Hinweise erbracht werden, dass das Par System in *C. glutamicum* die Lokalisation der Zellteilungsebene negativ durch Inhibition der FtsZ Polymerisation reguliert. Zusätzlich lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die Par Proteine an der Verankerung des Chromosoms an den Zellpolen sowie der Chromosomensegregation beteiligt sind.

#### **4.3 Nucleoid occlusion durch *ParA*<sub>1</sub> und *ParA*<sub>2</sub>**

Da ParA und MipZ aus *C. crescentus* unterschiedliche Aufgaben während der Zellteilung erfüllen (Thanbichler & Shapiro, 2006), ist es möglich, dass ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> in *C. glutamicum* ebenfalls unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Um die Funktion der beiden ATPasen in *C. glutamicum* analysieren zu können, sollten zunächst Phänotypen von konstruierten Stämmen untersucht werden, in denen die Expression der beiden *parA* Gene modifiziert wurde. Eine Deletion der beiden ATPasen war in *C. glutamicum* nicht möglich. Deshalb wurden Phänotypen von Zellen untersucht, in denen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> überexprimiert wurden. Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine chromosomale als auch eine plasmidkodierte Überexpression zu jeweils signifikant verlängerten Zellen führte, während das Wachstum nicht stark beeinträchtigt war. Derselbe Phänotyp wurde bereits für eine Überexpressionsmutante von DivS in *C. glutamicum* beschrieben (Ogino *et al.*, 2008). DivS wird während der SOS-Antwort, nach DNS-Schädigung, exprimiert und agiert als Inhibitor der FtsZ Polymerisation. Nach Überexpression von DivS wurden in den Zellen seltener Septen ausgebildet, während die Zellen apikal weiterwachsen und damit signifikant länger wurden. Aufgrund des Phänotyps nach Überexpression von ParA<sub>1</sub> bzw. ParA<sub>2</sub>, könnten die beiden ATPasen an einer Inhibition der FtsZ Polymerisation beteiligt sein. Allerdings könnte diese Überexpression auch zu Defekten der Chromosomensegregation führen, so dass sich die Zellen deshalb seltener teilen. Diese Möglichkeiten sollten durch subzelluläre Lokalisationsstudien genauer untersucht werden. Aufgrund der Fusionsproteine ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP, die in den Stämmen AS4 und AS5 synthetisiert wurden, konnte die jeweilige Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert werden. Es konnte beobachtet werden, dass ParA<sub>1</sub>-GFP große Strukturen ausschließlich auf dem Chromosom ausgebildete und die höchste Konzentration an einem Pol vorwies. ParA<sub>2</sub>-GFP war ebenfalls an den Polen lokalisiert, allerdings war es lediglich in

kleinen Spots konzentriert. Da die Chromosomen innerhalb dieser Zellen nicht so kompakt vorlagen wie in Wildtypzellen, könnte die Segregation oder Replikation durch die Überexpression beeinflusst sein. Zusätzlich bildete sich in diesen Zellen ein Konzentrationsgradient an ParA Proteinen, mit den höchsten Konzentrationen an den Polen. Wenn die beiden Proteine als Inhibitoren der FtsZ Polymerisation agieren, könnte, bedingt durch den Konzentrationsgradienten, erst in signifikant verlängerten Zellen (durch das apikale Wachstum) die Anzahl der ParA Proteine in der Mitte der Zellen gering genug sein, dass FtsZ dort polymerisieren kann. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurden die unterschiedlichen Überexpressionsstämme durch Zellängenmessungen und RNS Untersuchungen genauer analysiert. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass ab einer gewissen Konzentration an ParA Proteinen der Effekt auf den Phänotyp nicht mehr verstärkt werden konnte und die Zellen nicht länger als 6 bis 7  $\mu\text{m}$  lang wurden, bevor sie sich teilten. So zeigten Zellen mit IPTG induzierter Überexpressionen von ParA<sub>1</sub> (Cg RES / pEKEx2-*parA*<sub>1</sub>) eine sehr ähnliche Zellängenverteilung und gleiches Wachstumsverhalten wie Zellen mit doppelter, chromosomaler Expression (AS2 und AS4). Einen auffallenden Phänotyp zeigte der Stamm AS1 (Integration eines zweiten *parA*<sub>1</sub>-Gens ohne putative Promotorregion in das *parA*<sub>1</sub>*B*-Operon), der ein besonders breites Spektrum in der Zellängenverteilung aufwies. In diesem Stamm waren über 10 % der Zellen länger als 5  $\mu\text{m}$ , im Gegensatz zu den anderen Überexpressionsstämmen, in denen ca. 1 bis 2 % der Zellen Längen von mehr als 5  $\mu\text{m}$  vorwiesen. Daneben konnten auch vermehrt verkürzte Zellen beobachtet werden. In *M. smegmatis* wurde ein ähnlicher Phänotyp beschrieben (Jakimowicz *et al.*, 2007). Eine Verringerung der Expression von ParB führte zu erheblichen Defekten in der Chromosomensegregation. Demnach spielt das Verhältnis der Konzentrationen an ParA und ParB eine Rolle für die Funktionalität des Systems. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen von Mohl und Kollegen bestätigt, die herausfanden, dass sowohl eine Deletion von *parB* als auch eine Überexpression von ParA zu filamentösen Zellen in *C. crescentus* führt, (Mohl *et al.*, 2001). So scheint die Integration eines zweiten *parA*<sub>1</sub> Genes in das Genom von *C. glutamicum* (ohne zusätzliche Promotorsequenz) in das *parA*<sub>1</sub>*B* Operon einen polaren Effekt auf das folgende *parB* Gen auszuüben und dadurch zu Defekten in der Chromosomensegregation zu führen. Das konnte durch mRNS Analysen bestätigt werden. Demnach war die mRNS Konzentration von ParB in AS1 deutlich reduziert,

während sie in AS2 keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp vorwies. Eine Verringerung der Expression von ParB bei gleichzeitiger Erhöhung der Expression von ParA<sub>1</sub> führte so zu vermehrter Ausbildung an verkürzten sowie deutlich verlängerten Zellen, während das Wachstum kaum beeinträchtigt war. Allerdings wies der Stamm AS4 (Integration von *parA<sub>1</sub>-gfp* mit putativer Promotorsequenz) ebenfalls eine reduzierte Anzahl an mRNS von ParB auf, zeigte aber kein so breites Spektrum an Zellängen wie AS1. Das könnte an der signifikanten Steigerung der Konzentration an mRNS von ParA<sub>1</sub> liegen, weshalb sehr kurze Zellen, wegen eines inhibitorischen Effekts von ParA<sub>1</sub> auf die FtsZ Polymerisation, keine Septen ausbilden konnten.

Die Überexpression von ParA<sub>2</sub> in den Stämmen Cg RES / pEKEx2-*parA<sub>2</sub>* und AS5 (Integration eines zweiten *parA<sub>2</sub>*-Gens mit putativer Promotorsequenz; fusioniert mit *gfp*) führte zu unterschiedlichen Zellängenverteilungen. So wurden Zellen mit IPTG induzierter Überexpression von ParA<sub>2</sub> über 60 % und Zellen des Stammes AS5 (mit doppelter ParA<sub>2</sub> Konzentration) über 30 % länger als Zellen des Wildtyps. Eine Erhöhung der Induktor Konzentration sowie eine Verlängerung der Inkubationszeit mit IPTG führte zu keiner weiteren Verlängerung der Zellen des Stammes Cg RES / pEKEx2-*parA<sub>2</sub>*. Die Erhöhung der Konzentration der ParA Proteine, welche mit dem Pol bzw. der DNS kolokalisieren, konnte demnach bis zu einer 60 %igen Verlängerung der Zellen zu führen. Dann können sich die Zellen teilen. Der Grund, warum die Zellen nicht länger werden, sondern sich - unabhängig von der Überexpression - nach spätestens 6 bis 7 µm teilen können, könnte an der Lokalisation der ParA Proteine liegen. Aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der beiden Stämmen AS4 und AS5 konnte gezeigt werden, dass ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP ausschließlich über dem Chromosom bzw. an den Polen lokalisiert, so dass anzunehmen ist, dass beide ParA Proteine an die DNS bzw. den Pol binden und somit nicht frei im Zytosol vorliegen. Eine Erhöhung der Konzentration der ParA Proteine führte damit zu einer erhöhten Anzahl an ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> die an die DNS binden. Durch die dadurch bedingte Erhöhung der ParA Konzentrationen an den Polen, führte in kürzeren Zellen zu einer Inhibition der FtsZ Polymerisation. Nach apikalem Wachstum der Zellen war die Konzentration der ParA Proteine, auch nach Überexpression, ab einer Zelllänge von 6 bis 7 µm (längste Zellängen der Mutanten) in der Mitte gering genug, dass dort das Septum durch FtsZ ausgebildet werden konnte. Die Hypothese, dass beide ATPasen die FtsZ

Polymerisation inhibieren, wurde durch Immunfluoreszenzaufnahmen von FtsZ in den beiden Stämmen AS4 und AS5 unterstützt. So waren die FtsZ-Ringe ausschließlich zwischen den Chromosomen, und damit zwischen den ParA Proteinen, lokalisiert. Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> einen ähnlichen Mechanismus wie MipZ in *C. crescentus* bezüglich der Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene besitzen (Thanbichler & Shapiro, 2006).

*C. glutamicum* verfügt, verglichen mit anderen Modellorganismen, über eine reduzierte Version des *dcw* Lokus (Letek *et al.*, 2008a). Allerdings zeigten Untersuchungen in *E. coli*, dass viele Gene, z.B. *ftsK*, dieses Lokus redundant sind (Geissler & Margolin, 2005; Bernhard *et al.*, 2007). Da Versuche, *parA*<sub>1</sub>, *parA*<sub>2</sub> und *parB* in *C. glutamicum* zu deletieren, nicht erfolgreich waren, wurde angenommen, dass alle drei Par Proteine in diesem Modellorganismus essentiell sind. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass bei ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> keine funktionale Redundanz vorliegt. Das wird durch die unterschiedliche Lokalisation unterstützt: so bildete ParA<sub>1</sub>, von den Polen oder dem Septum aus, große Komplexe über dem Chromosom, während ParA<sub>2</sub> in kleinen Bereichen auf dem Chromosom detektiert werden konnte. Meistens war jeweils ein Spot von ParA<sub>2</sub> an einem oder jeweils an beiden Polen von *C. glutamicum* nachweisbar. ParA<sub>2</sub> zeigte damit dieselbe Lokalisation innerhalb der Zellen wie MipZ in *C. crescentus* (Thanbichler & Shapiro, 2006). Damit könnte ParA<sub>2</sub> in *C. glutamicum* eine ähnliche Aufgabe wie MipZ in *C. crescentus* übernehmen. Demnach kann das Par System in *C. glutamicum* ebenfalls an der Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene involviert sein.

#### **4.4 Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene**

Die Ergebnisse der *in vivo* Studien von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> führen zu der Annahme, dass die beiden ParA ATPasen die FtsZ Polymerisation inhibieren können. Diese Hypothese sollte durch *in vitro* Experimente unterstützt werden. Dafür wurden Polymerisations-Assays mit den gereinigten Proteinen durchgeführt, mit welchen nachgewiesen werden sollte, ob FtsZ in Gegenwart oder Abwesenheit verschiedener Nukleotide und ATPasen polymerisieren kann. Zunächst konnte der Nachweis erbracht werden, dass FtsZ *in vitro* in Gegenwart von GTP vollständig polymerisierte, während es ATP nicht zur Hydrolyse verwenden konnte. ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> hingegen konnte nur ATP hydrolysieren, während sie GTP nicht verbrauchen konnten. FtsZ

bildete insbesondere nach Zugabe von ParA<sub>1</sub> aber auch ParA<sub>2</sub>, trotz Anwesenheit von GTP, keine weiteren Polymere mehr aus. Demnach inhibierten beide ATPasen und deren GFP-Fusionsproteine die Polymerisation von FtsZ. Dieser Effekt wurde durch die Anwesenheit von ATP verstärkt, so dass sich das Gleichgewicht der Monomer- zur Polymerfraktion von FtsZ zusätzlich in Richtung Monomerfraktion verschob, während die ATPasen vollständig polymerisierten. Interessanterweise depolymerisierten bereits assemblierte FtsZ Filamente, sobald sie in Kontakt mit einem der beiden ATPasen kamen. Somit scheinen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> einen destabilisierenden Effekt auf FtsZ Polymere auszuüben, indem sie das Gleichgewicht von FtsZ in Richtung Monomerfraktion begünstigen. Da die Gegenwart von ParA<sub>1</sub> oder ParA<sub>2</sub> die enzymatische Aktivität von FtsZ kaum beeinflusste, handelt es sich bei dem Mechanismus der Inhibition wahrscheinlich nicht um eine Kompetition um Nukleotide. Es konnte auch für den FtsZ Polymerisationsinhibitor MinC gezeigt werden, dass es kaum Einfluss auf die GTPase Aktivität von FtsZ ausübt (Dajkovic *et al.*, 2008b). Allerdings wurde nachgewiesen, dass MinC nur in einem Verhältnis 1:1 von MinC zu FtsZ, die laterale Assemblierung der FtsZ Protofilamente verhindert (Scheffers, 2008). Interessanterweise konnte durch Interaktionsstudien mit einem bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems gezeigt werden, dass weder ParA<sub>1</sub> noch ParA<sub>2</sub> mit FtsZ Heterodimere bildet. Demnach scheint in diesem Fall keine starke Interaktion für die Inhibition der Polymerisation von FtsZ verantwortlich zu sein. Für die Walker ATPase MipZ aus *C. crescentus* ist die ATP Hydrolyse für die Inhibition von FtsZ nicht notwendig (Thanbichler & Shapiro, 2006). Allerdings verstärkte die Gegenwart von MipZ die enzymatische Aktivität von FtsZ deutlich. Aufgrund der veränderten Aktivität polymerisierte FtsZ *in vitro* anstatt zu geraden, zu gebogenen FtsZ Protofilamenten. Die Autoren vermuten, dass dieser Mechanismus der Destabilisierung der FtsZ Polymere, und der damit verbundenen Inhibition der Polymerisation, zugrunde liegt. Dieser Mechanismus kann allerdings nicht erklären, wie bereits entstandene FtsZ Polymere destabilisiert werden, wie es mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> von *C. glutamicum* beobachtet werden konnte. Auch müssen MipZ und FtsZ in gleich großen Mengen vorhanden sein, um die Polymerisation signifikant zu inhibieren. Die beiden ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> hingegen zeigten auch bei einem fünftel der Konzentration von FtsZ denselben inhibitorischen Effekt (Daten nicht gezeigt). Die Filamente von FtsZ sind zudem *in vitro* sehr stabil, was ebenfalls für FtsZ aus *M. tuberculosis* gezeigt wurde. So depolymerisieren *in vitro* die Filamente



erst nach über einer Stunde (White *et al.*, 2000). Weiterhin besitzt FtsZ aus *M. tuberculosis* weniger als ein zehntel der GTPase Aktivität und Polymerisationsgeschwindigkeit ( $K_M = 42 \pm 9 \mu\text{M}$ ;  $v_{\text{max}} = 7 \pm 1 \text{ nmol /mg min}$ ; Thakur & Chakraborti, 2006) als FtsZ anderer Modellorganismen wie z.B. *E. coli* (Chen *et al.*, 2007a). FtsZ aus *C. glutamicum* zeigte eine höhere Aktivität ( $K_M = 0,5 \text{ mM}$ ;  $v_{\text{max}} = 35 \text{ nmol /mg min}$ ) ist allerdings nur halb so hoch, wie die Aktivität von FtsZ aus *E. coli*. Inwiefern ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> die Polymere von FtsZ destabilisieren bzw. die Polymerisation inhibieren, bleibt vorerst unklar.

Um die Funktionen und mögliche Unterschiede zwischen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> weitergehend zu untersuchen, wurden enzymatische Tests durchgeführt. Durch diese konnte gezeigt werden, dass beide ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> unterschiedliche enzymatische Aktivitäten aufweisen, die beide nicht der Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Für ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>1</sub>-GFP konnte eine Sättigung bei ca. 5 mM ATP gemessen werden, während ParA<sub>2</sub> und ParA<sub>2</sub>-GFP eine linear steigende Aktivität bis zu 10 mM ATP aufwiesen. Zusätzlich wurde der Einfluss von ParB auf die enzymatischen Aktivitäten von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> untersucht, da eine Interaktion von ParB mit ParA und einer damit verbundenen Steigerung der ATPase Aktivität für das Par System in *C. crescentus* dokumentiert werden konnte (Figge *et al.*, 2003). Durch diese Interaktion reguliert ParB die Funktion von ParA. In *C. crescentus* bindet ParA-ADP an DNS, durch ATP hingegen wird die Bindung an den ParB-*parS*-Komplex gefördert. Sobald die enzymatische Aktivität von ParA gesteigert wird, diffundiert es vom Operator des *parAB* Operons, welches nahe der *parS* Sequenzen liegt, bindet an den ParB-*parS*-Komplex und polymerisiert, wodurch die Chromosomen getrennt werden. Enzymassays mit ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> aus *C. glutamicum* zeigten, dass ParB einen unterschiedlichen Einfluss auf die ATPase Aktivitäten der beiden ParA Proteine ausübt: während es die enzymatische Aktivität von ParA<sub>1</sub> in Bereichen unter 5 mM ATP fast vollständig inhibierte, steigerte es die Aktivität von ParA<sub>2</sub> signifikant. Somit scheinen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> mit ParB zu interagieren, wodurch ihre Aktivität reguliert wird. Diese Interaktion konnten auch durch ein bakterielles Zwei-Hybrid-System nachgewiesen werden. Durch diese Interaktionsstudien konnte die Ausbildung von Heterodimeren von sowohl ParA<sub>1</sub> als auch ParA<sub>2</sub> mit ParB bestätigt werden. Dabei interagierte insbesondere ParA<sub>2</sub> mit ParB. Somit könnte ParB in *C. glutamicum* gleichzeitig die Bindung von ParA<sub>2</sub> an den ParB-*parS*-Komplex und die Bindung von ParA<sub>1</sub> an die DNS fördern. Die Lokalisationen von ParA<sub>1</sub>-GFP und

ParA<sub>2</sub>-GFP in AS4 bzw. AS5 unterstützen diese Vermutung. So ist ParA<sub>2</sub>-GFP hauptsächlich als Spot an den Polen oder am bereits ausgebildeten Septum lokalisiert, während ParA<sub>1</sub>-GFP über großen Teilen des Chromosoms gebunden ist. Aufgrund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen von ParA<sub>1</sub>-GFP und ParA<sub>2</sub>-GFP und den unterschiedlichen Effekt von ParB auf die enzymatischen Aktivitäten der beiden ATPasen, war es interessant zu untersuchen, was für Polymere die Proteine nach Nukleotidzugabe ausbilden würden. Dafür wurden fünf bis zehn µg der Proteine mit ATP bzw. GTP inkubiert und die entstandenen Polymere mikroskopisch analysiert. Anhand dieser Untersuchungen konnte dokumentiert werden, dass ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>1</sub>-GFP sich zu großflächigen Netzwerken formierten, während ParA<sub>2</sub> und ParA<sub>2</sub>-GFP zu langen Filamenten polymerisierten. Diese großen Netzwerke von ParA<sub>1</sub>-GFP konnten auch innerhalb der Zellen des Stammes AS4 bzw. durch Expression des Konstrukts in *E. coli* Zellen bestätigt werden: ParA<sub>1</sub>-GFP war ausschließlich (in *E. coli* über dem gesamten) Chromosom verteilt. Die Netzwerkbildung scheint damit unabhängig von DNS zu sein. Allerdings scheint ParA<sub>1</sub> unspezifisch an DNS zu binden, was durch DNS-Mobilitäts-Assays bestätigt werden konnte und liegt somit wahrscheinlich nicht frei im Zytosol vor. Durch die Mitomycinexperimente konnten weitere deutliche Unterschiede in der Lokalisation und damit in der Funktion der beiden ParA Proteine aufgezeigt werden. Durch Mitomycin wird die Replikation inhibiert, wodurch die Chromosomen in unterschiedlichen Stadien der Replikation und Trennung in den Zellen verharren. Auf diese Weise konnte man Lokalisationen der Par Proteine in Abhängigkeit der Chromosomen genauer untersuchen. ParA<sub>1</sub> konnte auch in mit Mitomycin behandelten Zellen als großes Netzwerk ausschließlich über dem Chromosom detektiert werden. Die höchste Konzentration an ParA<sub>1</sub> Proteinen war an einem Pol oder dem bereits entstandenen Septum erkennbar. Nur auf Chromosomen, die frei in der Mitte der Zellen lagen und somit keinen Kontakt zu den Polen oder zu einem Septum aufwiesen, war ParA<sub>1</sub> gleichmäßig auf dem Chromosom verteilt. Das deutet darauf hin, dass ParA<sub>1</sub> zwar DNS unspezifisch bindet, wie es *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Allerdings akkumuliert es von einem „Ursprung“ aus, da es Konzentrationsgradienten über dem Chromosom ausbildet und die höchsten Konzentrationen an einem Pol aufweist. Anhand des Ergebnisses ist es vorstellbar, dass ParA<sub>1</sub> durch den ParB-*parS*-Komplex rekrutiert wird, und von dort - dem Pol - ausgehend über das Chromosom polymerisiert, wie es in anderen Modellorganismen

bereits beschrieben wurde (*C. crescentus*, Figge *et al.*, 2003). Zusätzlich zeigt ParA<sub>1</sub> das gleiche Lokalisationsschema wie ParA1 aus *V. cholerae* (Fogel and Waldor, 2006). In *V. cholerae* ist ParA1 für die Trennung der beiden replizierten Chromosome I zu den entgegengesetzten Polen verantwortlich. Anhand dieser Daten könnte ParA<sub>1</sub> zwei Funktionen innerhalb der Zellen übernehmen. Zum einen könnte es aktiv die replizierten Chromosome trennen und zum anderen die FtsZ Polymerisation räumlich regulieren.

ParA<sub>2</sub> hingegen ist sowohl als ein oder zwei Spots auf einem Chromosom als auch, unabhängig von der DNS, als Spot an einem Pol lokalisiert. Damit zeigt es eine Kolokalisation mit MipZ, welches für die Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene in *C. crescentus* verantwortlich ist. Da ParA<sub>2</sub> mit ParB kolokalisiert und interagiert, wie durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Interaktionsstudien gezeigt werden konnte, könnte ParA<sub>2</sub> für die Verankerung des ParB-*parS*-Komplexes an die Pole und / oder am Schutz der Pole gegen Septumbildung, initiiert durch FtsZ, verantwortlich sein. Inwiefern ParA<sub>1</sub> daran beteiligt sein könnte, ist noch nicht untersucht. Allerdings bildeten beide ATPasen miteinander Heterodimere aus, wodurch es möglich wäre, dass sie gemeinsame Strukturen ausbilden. Ob und in welcher Weise das Auswirkungen auf die Funktion hat, ist unbekannt. In *B. subtilis* z. B. verdrillen sich Filamente des Aktin homologs MreB mit Filamenten seiner Homologe MreBH und Mbl, wodurch die Funktionalität von MreB positiv beeinflusst wird (Carballido-Lopez *et al.*, 2006).

Die beschriebenen Daten führten zu der Hypothese, dass das Par System in *C. glutamicum* unter anderem die Lokalisation der Zellteilungsebene negativ reguliert, indem es die FtsZ Polymerisation inhibiert. So verhindert die Bindung von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> an die DNS, die Septumbildung über dem Chromosom. Aufgrund der subzellulären Lokalisation ist wahrscheinlich ParA<sub>1</sub> maßgeblich am Chromosomenschutz beteiligt, da es große sichtbare Strukturen über der DNS ausbildet. Studien von fixierten Zellen mit immunfluoreszierenden FtsZ stützen diese Vermutung. So formierten sich Z-Ringe ausschließlich zwischen den segregierten Chromosomen und niemals über dem Genom oder an den Polen. Dabei kam es häufig zu unsymmetrischen Zellteilungen, weshalb die Vermutung nahe lag, dass die Lokalisation der Zellteilungsebene wahrscheinlich ausschließlich auf diesem Mechanismus beruht, da in *C. glutamicum* keine weiteren Regulatoren, wie z.B. das Min System, existieren. Demnach definiert die Lage der Chromosomen innerhalb der

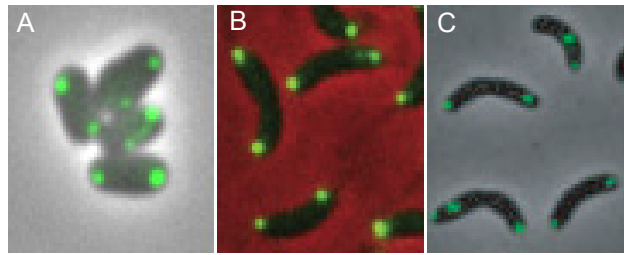
Zellen die Lokalisation der Z-Ring Formation, wodurch es zu den beobachteten asymmetrischen Zellteilungen kommen kann, die trotzdem ein komplettes Genom pro Tochterzelle gewährleisten. Da die Proteine des *nucleoid occlusion* Systems, SImA und Noc (Bernhardt & de Boer, 2005; Wu & Errington, 2004), ebenfalls unspezifisch an DNS binden und lokal die FtsZ Polymerisation inhibieren (der genaue Mechanismus ist noch unbekannt), stellt zumindest ParA<sub>1</sub> oder aber beide ParA ATPasen in *C. glutamicum* Proteine des *nucleoid occlusion* Systems dar.

#### **4.5 ParB-parS-Komplex**

Das Par System besteht aus drei Komponenten: einer ATPase (ParA), einem DNS-bindenden Protein (ParB) und den *parS* Sequenzen. ParB bindet hochspezifisch als Dimer an *parS* Domänen (Lin & Grossman, 1998), welche *cis*-agierende DNS Sequenzen darstellen, die beidseitig nahe der *oriC* Region des Chromosoms liegen (Jakimowicz *et al.*, 2002). Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass *parS* Domänen auf den Chromosomen vieler Bakterien konserviert sind und eine ähnliche Sequenz aufweisen (Livny *et al.*, 2007). Da bisher die *parS* Sequenzen in *C. glutamicum* nicht bekannt waren und auch die Lokalisation von ParB und dessen spezifische Bindung an spezifische DNS Sequenzen nicht dokumentiert waren, sollte sowohl die subzelluläre Lokalisation von ParB mittels GFP-Fusion oder IMF analysiert werden als auch *parS* Sequenzen in *C. glutamicum* identifiziert werden. Für die Identifikation der *parS* Sequenzen wurden DNS-Mobilitäts-Assays mit gereinigten ParB und verschiedenen doppelsträngigen Sequenzen durchgeführt. Mittels dieser Assays konnte gezeigt werden, dass ParB aus *C. glutamicum* spezifisch an die konservierte *parS* Sequenz Gram-positiver Bakterien binden konnte. Diese Sequenz wurde dreimal auf dem Chromosom von *C. glutamicum* nahe des Replikationsursprungs identifiziert. Das Ergebnis deckt sich mit der Vermutung von Livny, dass *C. glutamicum* voraussichtlich zwei bis vier *parS* Domänen auf dem Chromosom besitzt (Livny *et al.*, 2007). Da beschrieben wurde, dass ParB als Dimer an die *parS* Sequenzen bindet (Funnell, 1991) und auch im Rahmen dieser Arbeit auf Immunoblots von Zellysaten von *C. glutamicum* ParB hauptsächlich in Höhe eines Dimers detektiert werden konnte, war es überraschend, das ParB aus *C. glutamicum* in einem bakteriellen Zwei-Hybrid System nur schwach Homodimere ausbildete. Allerdings wurde diese Beobachtung durch Interaktionsstudien mit ParB

aus *C. crescentus* bestätigt (Bowman *et al.*, 2008), welches ebenfalls schwach Homodimere bildete. Die Dimerisierung von ParB wird demnach durch Gegenwart der *parS* Sequenzen katalysiert, so dass diese funktionellen Homodimere an die *parS* Domänen binden, welche aus den Zelllysaten geblottet wurden.

Da *parS* Sequenzen auf dem Genom von *C. glutamicum* identifiziert werden konnten und diese nahe des *oriC* liegen, sollte durch Mikroskopie bestätigt werden, dass ParB mit dieser Region kolokalisiert, also auch *in vivo* an diese Region bindet. Durch die spezifische Bindung der ParB Dimere an die *parS* Sequenz, sollte die Lokalisation von ParB innerhalb der Zellen zusätzlich die Lage des *oriC* widerspiegeln, weshalb der *oriC* und ParB dasselbe Lokalisationsschema aufweisen sollten. Um eine Kolokalisation der Lage von ParB und dem *oriC in vivo* nachzuweisen, wurden zunächst *tetO*-Kassetten nahe des Replikationsursprungs von *C. glutamicum* integriert, und danach in diesen Zellen extrachromosomal YFP-TetR exprimiert, das an die Kassetten bindet. Dadurch konnte die Lokalisation des *oriC* fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Es zeigte sich, dass ein bis vier Replikationsursprünge innerhalb einer Zelle auf dem Chromosom in Form von Spots detektiert werden konnten. Die Spots waren jeweils an den Polen und in den Fällen mit drei und vier Spots, zusätzlich in der Region des Septums, an der Zellwand, lokalisiert. Da *C. glutamicum* lediglich ein Chromosom besitzt, ist anzunehmen, dass Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase schon eine weitere Replikation initiiert haben können, während die Zellteilung noch nicht komplett vollzogen worden ist. Das erklärt, warum *C. glutamicum* ein schnelles Wachstum vorweisen kann. Um eine Kolokalisation von ParB und der *oriC* Region aufzudecken, wurde die Lokalisation von ParB sowohl durch chromosomale Expression von ParB-GFP als auch durch Immunofluoreszenz von ParB in Wildtyp Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass ParB ebenfalls in bis zu vier Spots auf dem Chromosom lokalisiert ist. Auch im Fall von ParB ist ein Spot jeweils an den Polen lokalisiert und der jeweils dritte und vierte Spot in der Region des Septums an der Zellwand. Dabei liegen sich der dritte und vierte Spot jeweils an der lateralen Zellwand gegenüber. ParB zeigte damit in *C. glutamicum* dieselbe subzelluläre Lokalisation wie ParB in *C. crescentus* (Bowman *et al.*, 2008) oder ParBI des Chromosoms I in *V. cholerae* (Yamaichi *et al.*, 2007) (Abbildung 4.2).



**Abb. 4.2:** Vergleich der subzellulären Lokalisation von ParB in *C. glutamicum* (A), *C. crescentus* (B) (entnommen aus Bowman *et al.*, 2008) und *V. cholerae* (C) (entnommen aus Yamaichi *et al.*, 2007) Die subzelluläre Lokalisation von ParB ist in allen drei Bakterien sehr ähnlich. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

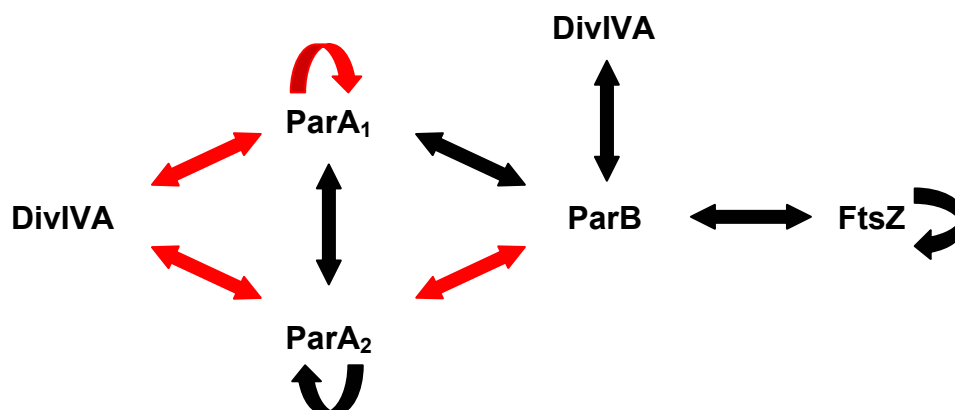
Statistisch waren sowohl ParB als auch der *oriC* in ca. 80 % der Fälle in einem bzw. zwei Spots, die jeweils am Pol / den Polen lokalisiert waren, vorhanden. Zellen mit drei Spots konnten in ca. 20 % der Fälle, und Zellen mit vier Spots in ca. einem Prozent der Fälle, nachgewiesen werden. Obwohl eine Lokalisation von ParB und der *oriC* Region auf dem Chromosom nicht gleichzeitig in einer Zelle analysiert wurde, spricht die Häufigkeit der jeweiligen Spots und deren statistische Verteilung für eine solche Kolo-kalisation. Zudem konnte *in vitro* die Bindung von ParB an die *parS* Domäne bestätigt werden, welche nahe des *oriC* gelegen sind. So bildet ParB auch in *C. glutamicum* durch Bindung an die *parS* Sequenz eine zentromerartige Struktur aus, an welche die beiden ParA ATPasen ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> rekrutiert werden. Diese zentromerartige Struktur ist für die korrekte Chromosomensegregation essentiell, wie durch verminderte Expression von ParB in der Mutante AS1 (Integration von *parA*<sub>1</sub> in das *parA*<sub>1</sub>*B* Operon mit polarem Effekt auf *parB*) gezeigt werden konnte. In dieser Mutante waren Defekte der Zellteilung nachweisbar. Zellen dieser Mutante bildeten häufiger verkürzte Zelle aus, wie es auch für *C. crescentus* gezeigt wurde (Mohl *et al.*, 2001). Auch Zellen von *B. subtilis* bildeten vermehrt Minizellen, wenn Spo0J (ParB) deletiert wurde (Ireton *et al.*, 1994). Dieser Effekt beruhte nicht auf der Überexpression von ParA<sub>1</sub>, da Zellen der Mutante AS2 (Integration von *parA*<sub>1</sub> in das *parA*<sub>1</sub>*B* Operon mit zusätzlicher putativer Promotorsequenz), diesen Phänotyp nicht zeigten, obwohl sie die gleiche Anzahl an ParA<sub>1</sub> Proteinen, allerdings die gleiche Menge an ParB wie der Wildtyp besaßen. Demzufolge ist die Anzahl an ParB Proteinen maßgebend für die korrekte Segregation.

ParB scheint außerdem statisch an den Polen rekrutiert zu sein, da keine stetige Mobilität nachgewiesen werden konnte. Demzufolge wird der ParB-*parS*-Komplex nach der Chromosomentrennung fest an den Pol verankert. Erst kürzlich konnte durch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander ein Protein (PopZ) in *C. crescentus* identifiziert werden, dass den ParB-*parS*-Komplex an die Pole verankert (Bowman *et al.*, 2008; Ebersbach *et al.*, 2008). Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in einer PopZ Deletionsmutante ParB nicht an den Pol rekrutiert werden konnte und diffus im Zytosol vorlag. Dadurch kam es zu schweren Defekten während der Chromosomensegregation, weshalb die Verankerung des ParB-DNS-Komplexes an den Pol einen wichtigen Teil der Chromosomentrennung darstellt. Ebersbach und Kollegen vermuten, dass sich PopZ an den Polen der Zellen von *C. crescentus* akkumuliert, da dort die geringste Konzentration an DNS vorliegt. Bowman und Kollegen hingegen vertreten die Meinung, dass PopZ durch MreB an die Zellpole rekrutiert wird. Diese Hypothese unterstützen sie durch den Nachweis, dass PopZ in Abwesenheit von MreB nicht an den Zellpolen lokalisiert. Die Autoren vermuten, dass sich PopZ Filamente zu einer Struktur, die Ähnlichkeit mit einem „Klettband“ aufweist, zusammenlagern und so die Verankerung des ParB-*parS*-Komplexes möglich machen. Weiterhin wird durch die Autoren angenommen, dass DivIVA ebenfalls eine solche Funktion übernehmen könnte, da beide Proteine, PopZ und DivIVA, eine *coiled-coil* Struktur aufweisen, wodurch sie akkumulieren können.

#### **4.6 Interaktion des Par Systems mit DivIVA**

Da DivIVA in *C. glutamicum* als möglicher Interaktionspartner mit dem Par System in Frage kam, sollte sowohl die Lokalisation von DivIVA als auch seine Interaktion mit den Par Proteinen mittels eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems untersucht werden. Es konnte fluoreszenzmikroskopisch die bereits publizierte Lokalisation von DivIVA bestätigt werden. Demnach ist DivIVA ausschließlich an den Polen und dem Septum lokalisiert (Ramos *et al.*, 2003). DivIVA ist ein essentielles Zellteilungsprotein, welches in *C. glutamicum* nicht nur an den Polen lokalisiert ist, sondern durch Rekrutierung der Zellwandsynthesemaschinerie dorthin die Ausbildung der Pole beeinflusst und so das apikale Wachstum ermöglicht (Letek *et al.*, 2008a). DivIVA könnte, da es eine „Hundeknochenartige“ Struktur ausbildet und zu größeren Oligomeren akkumuliert (Stahlberg *et al.*, 2004), einen

Interaktionspartner für den ParB-*parS*-Komplex darstellen. In *B. subtilis* verankert RacA den Replikationsursprung während der Sporulation an DivIVA und damit an den Pol (Wu & Errington, 2003). So könnte auch in *C. glutamicum* das „Gerüst“ aus zusammengelagerten DivIVA Filamenten die Verankerung von des ParB-DNS-Komplexes ermöglichen, was durch die statische polare Lokalisation sowohl des *oriC* als auch von ParB, bekräftigt wird. Die Kolokalisation von ParA<sub>2</sub> mit ParB und dem Replikationsursprung in *C. glutamicum*, teilt ParA<sub>2</sub> mit der Walker ATPase MipZ aus *C. crescentus*. Thanbichler und Shapiro konnten nachweisen, das MipZ an den ParB-*parS*-Komplex bindet und so die FtsZ Polymerisation an den Polen inhibiert und zu der Zellmitte hin rekrutiert (Thanbichler und Shapiro, 2006). ParA<sub>2</sub> könnte in *C. glutamicum* die Aufgabe übernehmen, den ParB-*parS*-Komplex an den Zellpol zu verankern und diesen vor FtsZ Inhibition zu schützen. ParA<sub>2</sub> akkumuliert an den Zellpolen, was auch durch Mitomycinexperimente gezeigt wurde. So waren ParA<sub>2</sub>-Spots nicht nur auf Chromosom, sondern auch am Pol lokalisiert. Das legt die Vermutung nahe, dass ParA<sub>2</sub> mit einem am Pol lokalisierten Protein interagiert und sich dort statisch verankert. Da es sich bei dem polar lokalisierten Protein um DivIVA handeln könnte, wurde die mögliche Interaktion der Par Proteine mit DivIVA mittels eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems untersucht. Aufgrund der dadurch erhaltenen Daten wurde die Hypothese unterstützt, dass ParA<sub>2</sub> sowohl mit ParB als auch mit DivIVA Heterodimere ausbildet (Abbildung 4.3), da für beide Kombinationen besonders starke Interaktionen gemessen werden konnten.



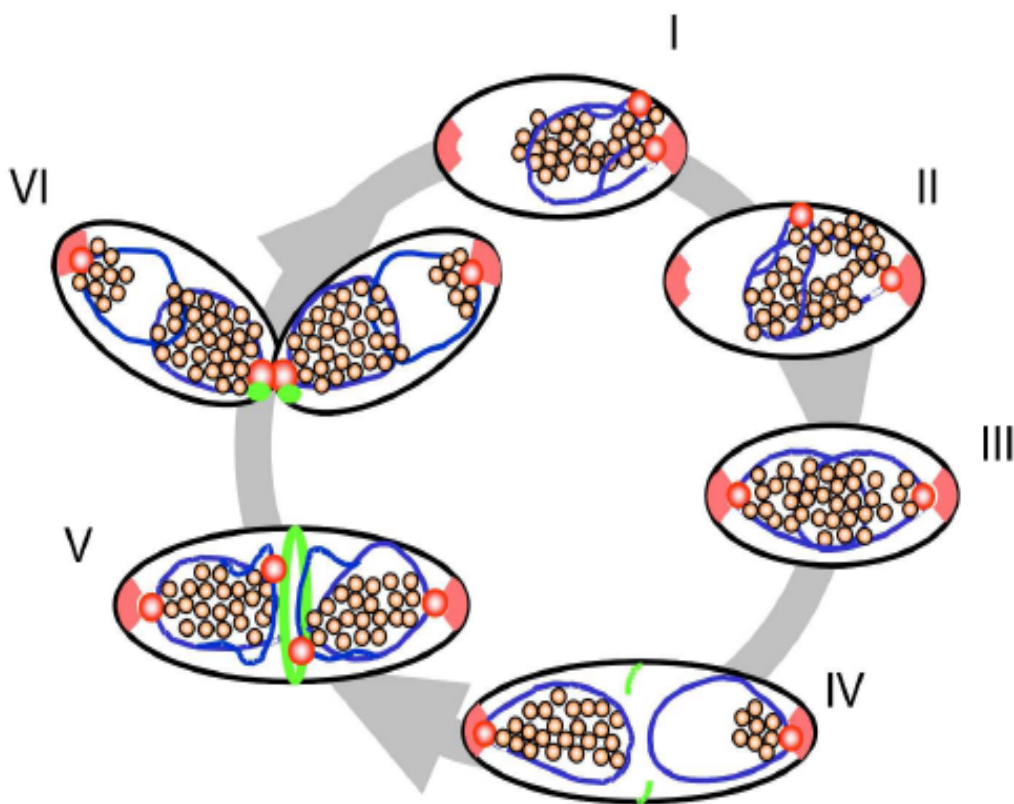
**Abb. 4.3:** Interaktionsschema der Par Proteine mit FtsZ und DivIVA aus *C. glutamicum*. Pfeile stellen die Interaktion der Proteine dar. Rote Pfeile zeigen eine starke Interaktion an.



Die mögliche Verankerung des ParB-*parS*-Komplexes durch ParA<sub>2</sub> an die Pole konnte ebenfalls durch die mikroskopischen Untersuchungen der verschiedenen Polymere unterstützt werden. So konnte gezeigt werden, dass ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> *in vitro*, abhängig von der Gegenwart von ParB und DivIVA, reproduzierbar unterschiedliche Strukturen ausbildeten. Beide ParA ATPasen banden *in vitro* an ParB, unabhängig von der Abwesenheit oder Gegenwart von DNS. In Gegenwart von DivIVA oder ParB und DNS bildeten sowohl ParA<sub>1</sub> als auch ParA<sub>2</sub> kurze, gerade Nadeln aus. Die Formierung dieser sternförmigen Nadeln konnte auch von Lim und Kollegen beschrieben werden (Lim *et al.*, 2005). Die Autoren zeigten, dass eine Inkubation von SopB (ParB), *sopC* (*parS*) Sequenzen und SopA (ParA) des F-Plasmids *in vitro*, zu kurzen, radialen Filamenten von SopA führte, während SopA alleine, lange Filamente ausbildete. Daraus schlossen Lim und Kollegen, dass SopA sowohl für die Verankerung der Plasmide als auch für die Plasmidsegregation verantwortlich ist. Neben der Ausbildung dieser radialen Nadeln von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> unterschieden sich die Polymerstrukturen signifikant, nachdem sie mit DivIVA, ParB und einer doppelsträngigen *parS* Sequenz inkubiert wurden. ParA<sub>1</sub> polymerisierte zu großen Netzwerken über den Proteinen, die durch lange Filamente verbunden waren. ParA<sub>2</sub> hingegen formierte sich zu kurzen, verdrehten Polymeren mit verdickten Enden. Diese Strukturen von ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> entstanden ausschließlich in Gegenwart der beiden Proteine DivIVA und ParB. Obwohl diese *in vitro* Daten nicht zwangsläufig die Interaktionen *in vivo* darstellen, unterstützen sie die Annahme, dass ParA<sub>2</sub> *in vivo* an den ParB-*parS*-Komplex bindet. ParA<sub>2</sub> erhöht, nach Induktion durch ParB, seine enzymatische Aktivität, wodurch es polymerisiert. Sobald dieser Komplex mit DivIVA an den Polen in Kontakt kommt, bildet es kurze, verdrehte Filamente mit Verdickungen an den Enden, welche sich in der „Klettbandstruktur“ der akkumulierten DivIVA Filamente verhakt und so diesen Komplex an den Pol verankert. ParA<sub>1</sub> hingegen bindet an die DNS und wird durch ParB negativ in seiner enzymatischen Aktivität reguliert, weshalb es nicht polymerisiert, aber das Chromosom gegen eine Ausbildung des Z-Rings schützt. Durch eine Interaktion von ParA<sub>1</sub> und DivIVA, beginnt ParA<sub>1</sub> lange Filamente auszubilden, wodurch es die Chromosomen trennt. Dadurch sind *in vivo* die höchsten Konzentrationen an ParA<sub>1</sub> an den Polen oder dem späten Septum nachweisbar. Allerdings muss der Nachweis, dass DivIVA die Polymerisationseigenschaften von ParA<sub>1</sub> beeinflusst, noch erbracht werden. Anhand der Daten könnte sich das Par System in *C. glutamicum* sowohl am

Chromosomenschutz als auch an der Trennung und der Verankerung der DNS beteiligen. Zusätzlich wird die Lokalisation der Zellteilungsebene durch die ParA ATPasen in *C. glutamicum*, wegen ihres inhibitorischen Effekts auf die FtsZ Polymerisation, negativ reguliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Hinweise erbracht werden, wie der stäbchenförmige Modellorganismus *C. glutamicum* die Lokalisation der Zellteilungsebene reguliert und das Chromosom gegen Septumformation schützt. Die Vorgänge während der Zellteilung von *C. glutamicum*, welche aufgrund der erhaltenen Daten angenommen werden, sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst.



**Abb. 4.4:** Modell des Par Systems in *C. glutamicum*. Blaue Linie: Chromosom, gelbe Kreise: ParA<sub>1</sub>, rote Kreis: ParA<sub>2</sub>-ParB-oriC-Komplex, rötliche Halbkreise: DivIVA, grün: FtsZ. Während der Replikation ist ein Replikationsursprung durch DivIVA an den Pol verankert und der zweite wird durch ParA<sub>1</sub> zu dem entgegengesetzten Pol gedrückt (Stadium I - III). Das Chromosom ist durch ParA<sub>1</sub> und der Pol durch ParA<sub>2</sub> gegen die Formation eines Z-Rings geschützt. Nach der Trennung der Chromosomen entsteht in der Zellmitte ein an ParA Proteinen freier Raum, in welchem FtsZ polymerisieren kann (Stadium IV). Während der exponentiellen Wachstumsphase initiieren die Zellen eine weitere Replikation vor Beendigung der kompletten Zellteilung und leiten somit eine weitere Zellteilung ein (Stadium V + VI). Damit ist das Par System in *C. glutamicum* sowohl an der Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene als auch am Chromosomenschutz und dessen Verankerung an den Polen beteiligt.

So wirken ParA<sub>1</sub> und ParA<sub>2</sub> als Inhibitoren der FtsZ Polymerisation und können, durch unspezifische Bindung, das Chromosom gegen eine Septumformation schützen. ParB bindet spezifisch an *parS* Sequenzen, welche nahe des Replikationsursprungs gelegen sind. An diesen ParB-*parS*-Komplex bindet ParA<sub>2</sub>, welches den Komplex an den DivIVA-Komplex und damit an den Polen verankert. Während der Replikation wird der neue ParA<sub>2</sub>-ParB-*parS*-Komplex durch Polymerisation von ParA<sub>1</sub> an den gegenüberliegenden Pol „gedrückt“ (Stadium I - III). Dabei polymerisiert ParA<sub>1</sub> insbesondere vom Pol aus, während es auf dem Chromosom gebunden bleibt und das Chromosom während der Trennung gegen die Teilung durch das Septum schützt. Nach der vollständigen Trennung der beiden Chromosomen und deren Verankerung an den gegenüberliegenden Polen entsteht, auch durch das apikale Wachstum der Zellen, ein DNS- und damit ParA-freier Raum, in dem sich das Septum ausbilden kann (Stadium IV). *C. glutamicum* Zellen, welche sich in der exponentielle Wachstumsphase befinden, initiieren bereits eine weitere Replikation bevor die Zellteilung vollständig durchgeführt wurde (Stadium V + VI), wodurch eine weitere Zellteilung eingeleitet wird.

## V. Zusammenfassung

Zellteilungsproteine und Mechanismen der Chromosomensegregation und des -schutzes sowie der Regulation der Lokalisation der Zellteilungsebene sind hauptsächlich in den stäbchenförmigen Bakterien *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Caulobacter crescentus* beschrieben worden. Da *Corynebacterium glutamicum* als stäbchenförmiges Bakterium weder ein Min System noch Proteine des Chromosomenschutzes (*nucleoid occlusion*) besitzt, sollte untersucht werden, welche Proteine diese Funktionen in diesem Modellorganismus übernehmen. So sollte im Rahmen dieser Arbeit insbesondere das Par System von *C. glutamicum* hinsichtlich seiner Funktion während der Zellteilung analysiert werden. Bisher war nicht bekannt, wodurch die Chromosomensegregation und die Lokalisation der Zellteilungsebene in *C. glutamicum* reguliert wird. Das Par System besteht in *C. glutamicum* aus einem *parA<sub>1</sub>B* Operon (*cg3427* und *cg3426*), das sich nahe des *oriC* befindet und einem zweiten, einzelnen Gen, das für eine zweite ATPase kodiert (*parA<sub>2</sub>*, *cg1610*), welche am gegenüberliegenden Teil des Chromosoms lokalisiert ist. Sowohl die Funktion von *ParA<sub>2</sub>* als auch die *parS* Sequenzen, an welche *ParB* spezifisch bindet, waren bisher unbekannt. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide ATPasen die *FtsZ* Polymerisation inhibieren. So führte eine Überexpression von *ParA<sub>1</sub>* und *ParA<sub>2</sub>* zu deutlich verlängerten Zellen. Dieser Phänotyp ist daraufhin zurückzuführen, dass durch eine Überexpression von *ParA<sub>1</sub>* und *ParA<sub>2</sub>* konzentrationsabhängig eine *FtsZ* Polymerisation erst bei verlängerten Zellen möglich war.

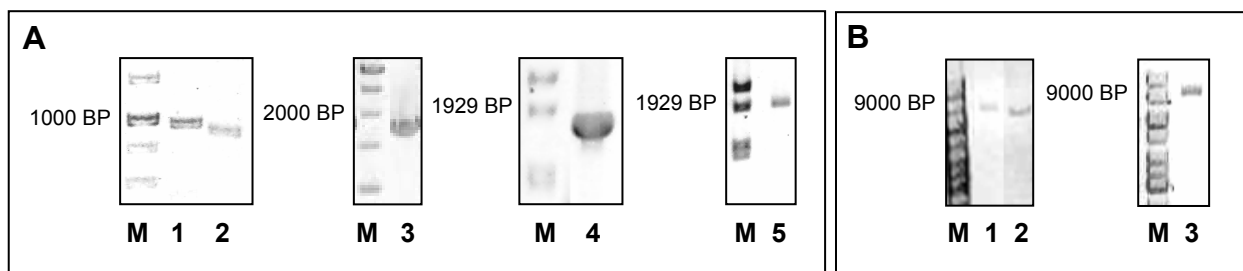
Immunofluoreszenz-Aufnahmen zeigten zudem, dass *FtsZ* nur zwischen den beiden Chromosomen polymerisierte, wo die Konzentration an *ParA* Proteinen am geringsten war. Untersuchungen mit den gereinigten ATPasen ergaben, dass beide Proteine unspezifisch DNS binden und unter Verbrauch von ATP Filamente ausbilden können. *ParA<sub>1</sub>* formiert sich *in vivo* zu großen Strukturen über dem Chromosom, während *ParA<sub>2</sub>* hauptsächlich in distinkten Regionen – am Septum und an den Polen – auf dem Chromosom lokalisiert war. *ParB* hat spezifisch an eine hochkonservierte *parS* Sequenz gebunden, welche dreimal in dem Genom von *C. glutamicum* identifiziert werden konnte, und die sich nahe dem *oriC* befinden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *ParB* mit dem *oriC* kolokalisiert. Dieses Ergebnis unterstützt das Modell, dass *ParB* an die *parS* Sequenzen bindet, und dadurch die Chromosomensegregation initiiert. Die Gegenwart von *ParB* steigerte

die ATPase-Aktivität von ParA<sub>2</sub>, während es die enzymatische Aktivität von ParA<sub>1</sub> nahezu vollständig inhibierte. So konnten mikroskopische Aufnahmen zeigen, dass ParA<sub>1</sub> DNS bindet, und sobald ParB hinzugefügt wurde, lange Filamente ausbildete. ParA<sub>2</sub> hingegen polymerisierte in Gegenwart von ParB zu kleinen, sternförmigen Strukturen. Beide ATPasen scheinen somit während der Zellteilung unterschiedliche Funktionen zu übernehmen. So könnte ParA<sub>1</sub> am Chromosomenschutz und der Segregation maßgeblich beteiligt sein. ParA<sub>2</sub> hingegen wäre für die Verankerung der Chromosome an die Zellpole verantwortlich. Auffallend war, dass ParA<sub>2</sub> größtenteils mit ParB / *oriC* kolokalisierte, was die vorangegangene Vermutung bestätigt. Ergebnisse eines bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems ergaben ergänzend, dass ParA<sub>2</sub> stark mit ParB und mit dem essentiellen Zellteilungsprotein DivIVA interagiert. DivIVA ist immer an den Polen der Zelle von *C. glutamicum* lokalisiert und definiert diese. So wäre ein ParB-*parS*-ParA<sub>2</sub>-DivIVA-Komplex möglich, der die, durch ParA<sub>1</sub> geschützten und segregierten Chromosome, an die Zellpole verankert. In dieser Arbeit konnten somit erstmals mögliche Mechanismen beschrieben werden, welche an dem Chromosomenschutz, der Chromosomensegregation und der Lokalisation der Zellteilungsebene in *C. glutamicum* beteiligt sind.

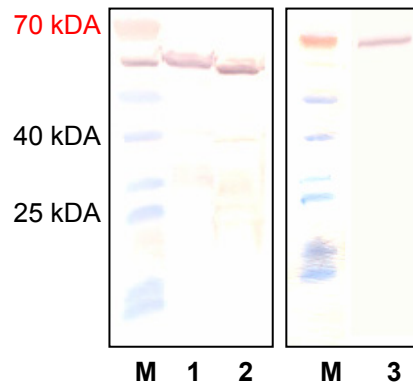
## VI. Anhang

### Anhang 1

Die Integrationen von *parA<sub>1</sub>* (AS1), *parA<sub>1</sub>+100* (AS2), *parA<sub>1</sub>+100-gfp* (AS4), *parA<sub>2</sub>+100-gfp* (AS5) und *divIVA+100-gfp* (AS9) in die jeweiligen Stämme wurde mittels PCR überprüft (Abbildung 6.1). Die Plasmide pEKEx2-*parA<sub>1</sub>*, pEKEx2-*parA<sub>2</sub>* und pEKEx2-*parB* wurden für den Nachweis der Transformation aus den entsprechenden Stämmen extrahiert. Die Fusionsproteine ParA<sub>1</sub>-GFP, ParA<sub>2</sub>-GFP und DivIVA-GFP konnten durch Nutzung eines Immunoblots detektiert werden (Abbildung 6.2). Für einen Nachweis der Überexpression der nativen Proteine waren die Antikörper nicht geeignet bzw. standen nicht zur Verfügung (ParA<sub>2</sub>, DivIVA). Dafür wurden Slot-Blot-Analysen durchgeführt, die im Text gezeigt sind.



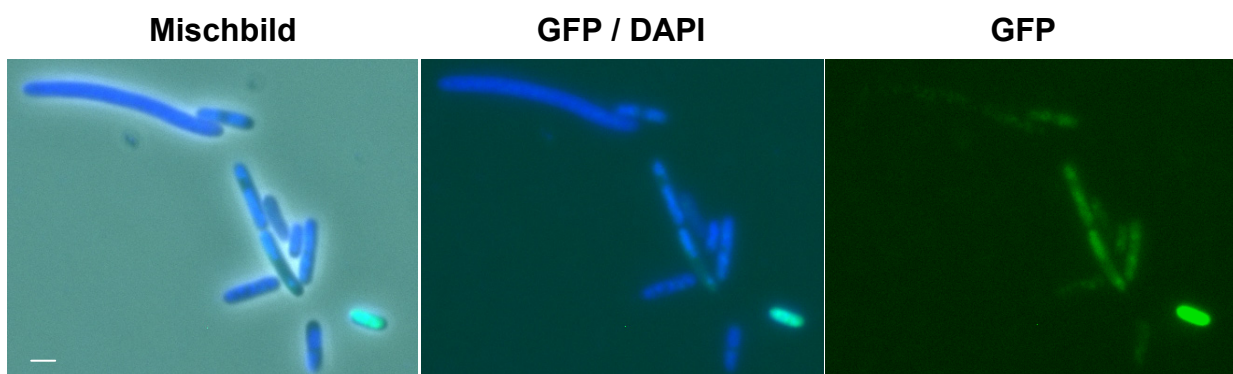
**Abb. 6.1:** **A:** Überprüfung der Integration von *parA<sub>1</sub>* (AS1), *parA<sub>1</sub>+100* (AS2), *parA<sub>1</sub>+100-gfp* (AS4), *parA<sub>2</sub>+100-gfp* (AS5) und *divIVA+100-gfp* (AS9) in die jeweiligen Stämme mittels PCR. M = Marker, 1 = *parA<sub>1</sub>* (924 BP), 2 = *parA<sub>1</sub>+100* (1024 BP), 3 = *parA<sub>1</sub>+100-gfp* (1750 BP), 4 = *parA<sub>2</sub>+100-gfp* (1700 BP) und 5 = *divIVA+100-gfp* (1920 BP). Es wurden jeweils M13 Primer aus dem Plasmid pk18mob und ein Primer des jeweiligen Gens benutzt. **B:** Aus den Stämmen Cg RES / pEKEx2-*parA<sub>1</sub>*, Cg RES / pEKEx2-*parA<sub>2</sub>* und Cg RES / pEKEx2-*parB* wurden zum Nachweis der korrekten Transformation die entsprechenden Plasmide extrahiert. M = Marker, 1 = pEKEx2-*parA<sub>1</sub>* (9085 BP), 2 = pEKEx2-*parA<sub>2</sub>* (9035 BP) und 3 = pEKEx2-*parB* (9300 BP). Alle drei Plasmide konnten in den jeweiligen Stämmen nachgewiesen werden.



**Abb. 6.2:** Immunoblot mit Anti-GFP. M = Marker, 1 = Zellysat von AS4, 2 = Zellysat von AS5 und 3 = Zellysat von AS9. ParA<sub>1</sub>-GFP (ca. 61 kDA), ParA<sub>2</sub>-GFP (ca. 59 kDA) und DivIVA-GFP (ca. 68 kDA) konnten detektiert werden. In allen drei Stämmen konnte kein freies GFP (ca. 27 kDA) nachgewiesen werden.

## Anhang 2

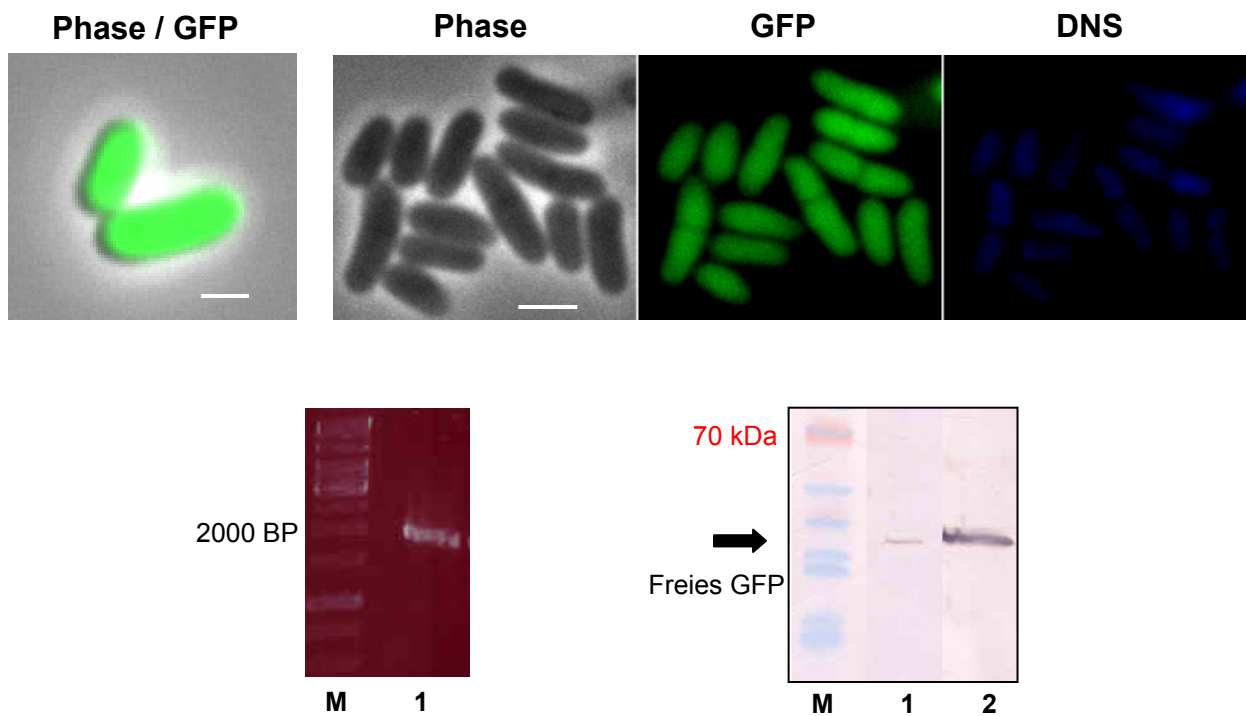
ParA<sub>1</sub>-GFP (ParA<sub>1</sub> aus *C. glutamicum*) wurde in *E. coli* Zellen exprimiert (Abbildung 6.3). ParA<sub>1</sub>-GFP war auch in diesen Zellen ausschließlich über dem Chromosom lokalisiert, wodurch die Ergebnisse des DNS-Mobilitäts-Assays unterstützt werden, dass ParA<sub>1</sub> unspezifisch an DNS bindet.



**Abb. 6.3:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* Zellen, in denen ParA<sub>1</sub>-GFP (ParA<sub>1</sub> aus *C. glutamicum*) exprimiert wird. Blau: DNS (DAPI), Grün: ParA<sub>1</sub>-GFP. ParA<sub>1</sub>-GFP konnte ausschließlich über dem Chromosom detektiert werden. Die Zellen wurden bis zu 25 µm lang, während Wildtypzellen eine durchschnittliche Länge von 5 µm erreichen. Maßstab Balken: 2 µm.

### Anhang 3

Die Integration von *ftsZ-gfp* bzw. *ftsZ+100-gfp* in das Genom von *C. glutamicum* (Stämme AS12 und AS13) führte lediglich zu einer Expression von freiem GFP (Abbildung 6.4).



**Abb. 6.4:** Oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Cg4711 (pEKEx2-*gfp*) (links) nach dreistündiger Induktion mit 0,1 mM IPTG und AS12. Grün: GFP, Blau: DNS (DAPI). In dem Stamm AS12 konnte nur freies GFP detektiert werden. Maßstabbalken: 1µm. Unten links: Nachweis der Integration des *ftsZ-gfp*-Konstruktes in das Genom mittels PCR. *FtsZ-gfp* = 2050 BP (1); M = Marker. *FtsZ-gfp* konnte nachgewiesen werden. Unten rechts: Immunoblot mit Anti-GFP. M = Marker, 1 = Zellysat von Cg AS12 und 2 = freies GFP als Kontrolle. Es konnte in dem Stamm Cg AS12 nur freies GFP nachgewiesen werden.



## VII. Literaturverzeichnis

**Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002).** Molecular Biology of the Cell, 4th ed. *Garland Science*

**Ausmees, N., Kuhn, J. R., & Jacobs-Wagner, C. (2003).** The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**, 705-713

**Autret, S., Nair, R. & Errington, J. (2001).** Genetic analysis of the chromosome segregation protein Spo0J of *Bacillus subtilis*: evidence for separate domains involved in DNA binding and interactions with Soj protein. *Mol Microbiol* **41**, 743-755

**Bernard, C.S., Sadasivam, M., Shiomi, D. & Margolin, W. (2007).** An altered FtsA can compensate for the loss of essential cell division protein FtsN in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **64**, 1289-1305

**Bernhardt, T.G. & de Boer, P.A. (2003).** The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* **48**, 1171-1182.

**Bernhardt, T.G. & de Boer, P.A. (2004).** Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. *Mol Microbiol* **52**, 1255-1269

**Bernhardt, T.G. & de Boer, P.A. (2005).** SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* **18**, 555-564

**Bi, E.F. & Lutkenhaus, J. (1991).** FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161-164

**Bigot, S., Corre, J., Louarn, J.M., Cornet, F. & Barre, F.X. (2004).** FtsK activities in Xer recombination, DNS mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* **54**, 876-886

- Bowman, G., Comolli, L., Zhu, J., Eckart, M., Koenig, M., Downing, K., Moerner, W., Earnest, T. & Shapiro, L. (2008).** A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell* **134**, 945-955
- Bramhill, D. & Thompson, C.M. (1994).** GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5813-5817
- Carballido-López, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S.D., Noirot, P. & Errington, J. (2006).** Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell* **11**, 399-409
- Casart, Y., Gamero, E., Rivera-Gutierrez, S., Gonzalez-y-Merchand, J. & Salazar, L. (2008).** *Par* genes in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium smegmatis* are arranged in an operon transcribed from „SigGC“ promoters. *BMC Microbiol* **27**,8:51
- Chen, Y., Anderson, D., Rajagopalan, M. & Erickson, H. (2007a).** Assembly dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J Biol Chem* **282**, 27736-27743
- Chen, Y. & Erickson, H. (2007b).** *In vitro* assembly studies of FtsZ/tubulin-like proteins (TubZ) from *Bacillus* plasmids. *J Biol Chem* **283**, 8102-8109
- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2172-2175
- Dajkovic, A., Mukherjee, A. & Lutkenhaus, J. (2008a).** Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J Bacteriol* **190**, 2513-2526
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S.X., Wirtz, D. & Lutkenhaus, J. (2008b).** MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr Biol* **18**, 235-244

**Daniel, R.A. & Errington, J. (2003).** Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**, 767-776

**Dasgupta, A., Datta, P., Kundu, M. & Basu J. (2006).** The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division. *Microbiol* **152**, 493-504

**Datta, P., Dasgupta, A., Singh, A.K., Mukherjee, P., Kundu, M. & Basu, J. (2006).** Interaction between FtsW and penicillin-binding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria. *Mol Microbiol* **62**, 1655-1673

**De Boer, P.A., Crossley, R.E. & Rothfield, L.I. (1989).** A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* **56**, 641-649

**De Boer, P., Crossley, R. & Rothfield, L. (1992).** The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**, 254-256

**Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M. & Granger-Schnarr, M. (1998).** A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia Coli*. *Mol Gen Genet* **257**, 205-21

**Dulley, J.R. & Grieve, P.A. (1975).** A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem* **64**, 136-141

**Dziadek, J., Madiraju, M.V., Rutherford, S.A., Atkinson, M.A. & Rajagopalan, M. (2002).** Physiological consequences associated with overproduction of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ in mycobacterial hosts. *Microbiology* **148**, 961-971

**Easter, J. Jr. & Gober, J.W. (2002).** ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol Cell* **10**, 427-434

**Ebersbach, G., Briegel, A., Jensen, G. & Jacobs-Wagner, C. (2008).** A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell* **134**, 956-968

**Ebersbach, G. & Gerdes, K. (2001).** The double par locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 15078-15083

**Ebersbach, G. & Gerdes, K. (2005).** Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet* **39**, 453-479

**Edwards, D.H., & Errington, J. (1997).** The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol* **24**, 905-915

**Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Ludtke, K.U. & Sahm, H. (1994).** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum* gltA gene encoding citrate synthase. *Microbiol* **140**, 1817-1828

**Erickson, H., Taylor, D., Taylor, K. & Bramhill, D. (1996).** Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 519-523

**Elouelji-El'Kemiri, S. 2008.** Morphologie und Zellteilung in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit

**Errington, J. (2001).** Septation and chromosome segregation during sporulation in *B. subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 660-666

**Esue, O., Tseng, Y. & Wirtz, D. (2005).** The rapid onset of elasticity during the assembly of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 508-516

**Figge, R.M., Divakaruni, A.V. & Gober, J.W. (2005).** MreB, the cell-shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **51**, 1321-1332

**Figge, R.M., Easter, J. & Gober, J.W. (2003).** Productive interaction between the chromosome partitioning proteins, ParA and ParB, is required for the progression of the cell cycle in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**, 1225-1237

**Fogel, M.A. & Waldor, M.K. (2006).** A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* **20**, 3269-3282

**Formstone, A. & Errington, J. (2005).** A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **55**, 1646-1657

**Frunzke, J., Bramkamp, M., Schweitzer, J.E. & Bott, M. (2008).** Population heterogeneity in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 caused by prophage CPG3. *J Bacteriol* **190**, 5111-5119

**Fung, E., Bouet, J.Y. & Funnell, B.E. (2001).** Probing the ATP-binding site of P1 ParA: partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis. *EMBO J* **20**, 4901-4911.

**Funnell, B.E. (1991).** The P1 plasmid partition complex at *parS*. The influence of *Escherichia coli* integration host factor and of substrate topology. *J Biol Chem* **266**, 14328-14337

**Funnell, B.E. (2005).** Partition-mediated plasmid pairing. *Plasmid* **53**, 119-125

**Geissler, B. & Margolin, W. (2005).** Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Mol Microbiol* **58**, 596-612

**Gerdes, K., Möller-Jensen, J. & Bugge Jensen, R. (2000).** Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* **37**, 455-466

**Gerdes, K., Möller-Jensen, J., Ebersbach, G., Kruse, T. & Nordstrom, K. (2004).** Bacterial mitotic machineries. *Cell* **116**, 359-366

**Gitai, Z., Dye, N., Reisenauer, A., Wachi, M. & Shapiro, L. (2005).** MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**, 329-341

**Grant, S., Jessee, J., Bloom, F. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia Coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad USA* **87**, 4645-4649

**Hale, C.A. & de Boer, P.A. (1997).** Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**, 175-185

**Harry, E.J., Pogliano, K. & Losick, R. (1995).** Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **177**, 3386-3393

**Hayes, F. & Barilla, D. (2006).** The bacterial segrosome: a dynamic nucleoprotein machine for DNA trafficking and segregation. *Nat Rev Microbiol* **4**, 133-143

**Haynes, J. & Britz, M. (1989).** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum*: growth in Tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol Let.* **61**, 329-334

**Hester, C.M. & Lutkenhaus, J. (2007).** Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 20326-20331

**Höltje, J.V. (1998).** Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 181-203

**Hu, Z. & Lutkenhaus, J. (2001).** Topological regulation of cell division in *E. coli*. spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. *Mol Cell* **7**, 1337-1343

**Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S. & Lutkenhaus, J. (1999).** The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14819-14824

**Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28

**Ireton, K., Gunther, N.W. & Grossman, A.D. (1994).** Spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**, 5320-5329

**Jakimowicz, D., Charter, K. & Zakrzewska-Czerwinska, J. (2002).** The ParB protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) recognizes a cluster of *parS* sequences within the origin-proximal region of the linear chromosome. *Mol Microbiol* **45**, 1365-1377

**Jakimowicz, D., Brzostek, A. & Zakrzewska-Czerwinska, J. (2007).** Characterization of the mycobacterial chromosome segregation protein ParB and identification of its target in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol* **153**, 4050-4060

**Jensen, R.B., Wang, S.C. & Shapiro, L. (2001).** A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* **20**, 4952-4963

**Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I. & Tauch, A. (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

**Kang, C.-M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, C. & Husson, R.N. (2005).** The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev* **19**,1692-1704

**Kouzarides, T. & Ziff, E. (1988).** The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* **336**, 646-651

**Kruse, T., Möller-Jensen, J., Lobner-Olesen, A. & Gerdes, K. (2003).** Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **22**, 5283-5292

**Lan, G., Dajkovic, A., Wirtz, D. & Sun, S.X. (2008).** Polymerization and bundling kinetics of FtsZ filaments. *Biophys J* **95**, 4045-4056

**Lau , I.F., Filipe, S.R., Søballe, B., Økstad, O.A., Barre, F.X. & Sherratt, D.J. (2003).** Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol* **49**, 731-743

**Lee, P. & Grossman, A. (2006).** The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of the replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **60**, 853-869

**Lemon, K.P. & Grossman, A.D. (2000).** Movement of Replicating DNA through a Stationary Replisome. *Molecular Cell* **6**, 1321-1330

**Leonard, A. L., Möller-Jensen, J. & Löwe, J. (2005).** Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Phil Trans R Soc* **360**, 523-535

**Letek, M., Fiuza, M., Ordonez, E., Villadangos, A. F., Ramos, A., Mateos, L. M. & Gil, J. A. (2008a).** Cell growth and cell division in the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**, 99-109



- Letek, M., Ordóñez, E., Fiuza, M., Honrubia-Marcos, P., Vaquera, J., Gil, J.A., Castro, D. & Mateos, L.M. (2007).** Characterization of the promoter region of *ftsZ* from *Corynebacterium glutamicum* and controlled overexpression of FtsZ. *Int Microbiol* **10**, 271-282
- Letek, M., Ordonez, E., Fiuza, M., Mateos, L.M. & Gil, J.A. (2006).** Deciphering the function of DivIVA in *Corynebacterium glutamicum*. Symposium 2006
- Letek, M., Ordonez, E., Vaquera, J., Margolin, W., Flärdh, K., Mateos, L. & Gil, J. (2008b).** DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **190**, 3283-3292
- Leung, A., White, E., Ross, L., Reynolds, R., DeVito, J. & Borhani, D. (2004).** Structure of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ reveals unexpected, G protein-like conformational switches. *J Mol Biol* **342**, 953-970
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **65**, 45-54
- Lim, G.E., Derman, A.I. & Pogliano, J. (2005).** Bacterial DNA segregation by dynamic SopA polymers. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 17658-17663
- Lin, D.C. & Grossman, A.D. (1998).** Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92**, 675-685
- Livny, J., Yamaichi, Y. & Waldor, M. (2007).** Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol* **189**, 8693-8703
- Löwe, J., van den Ent, F. & Amos, L.A. (2004).** Molecules of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**, 177-198
- Löwe, J. & Amos, L.A. (1998).** Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**, 203-206

**Marston, A.L., Thomaidis, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E. & Errington, J. (1998).** Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev* **12**,3419-3430

**Meinhardt, H. & de Boer, P.A. (2001).** Pattern formation in *Escherichia coli*: a model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14202-14207

**Michie, K. & Löwe, J. (2006).** Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biochem* **75**, 467-492

**Mir, M.A., Rajeswari, H.S., Veeraraghavan, U. & Ajitkumar, P. (2006).** Molecular characterisation of ABC transporter type FtsE and FtsX proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol* **185**, 147-155

**Mohl, D.A., Easter, J., Jr. & Gober, J.W. (2001).** The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **42**, 741-755

**Mohl, D.A. & Gober, J.W. (1997).** Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* **88**, 675-684

**Möller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R. B., Roepstorff, P. & Gerdes, K. (2003).** Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerisation mechanism. *Mol Cell* **12**, 1477-1487

**Mukherjee, A. & Lutkenhaus, J. (1994).** Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* **176**, 2754-2758

**Mullis, K.B., Farone, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986).** Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**, 263-273

**Murray, H. & Errington J. (2008).** Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* **135**, 74-84

**Murray, H., Ferriera, H. & Errington J. (2006).** The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from *parS* nucleation sites. *Mol Microbiol* **61**, 1352-1361

**Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B. & Bott, M. (2006).** Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI Protein. *J Biol Chem* **281**, 12300-12307

**Nielsen, H.J., Ottesen, J.R., Youngren, B., Austin, S.J. & Hansen, F.G. (2006).** The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol Microbiol* **62**, 331-338

**Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M. & Yukawa, H. (2008).** DivS, a novel SOS-inducible cell-division suppressor in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **67**, 597-608

**Osteryoung, K. W. (2001).** Organelle fission in eukaryotes. *Curr Opin Microbiol* **4**, 639-646

**Osteryoung, K. W. & Vierling, E. (1995).** Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**, 473-474

**Park, S.M., Sinskey, A.J. & Stephanopoulos, G. (1997).** Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnol Bioeng* **55**, 864-879

**Pratto, F., Cicek, A., Weihofen, W., Lurz, R. Saenger, W. & Alonso, J. (2008).** *Streptococcus pyogenes* pSM19035 requires dynamic assembly of ATP-bound Par and ParB on *parS* DNA during plasmid segregation. *Nucleic Acids Research* **36**, 3676-3689

**Ramirez-Arcos, S., Liao, M., Marthaler, S., Rigden, M. & Dillon, J.A. (2005).** *Enterococcus faecalis divIVA*: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. *Microbiol* **151**, 1381-1393

**Ramos, A., Honrubia, M.P., Valbuena, N., Vaquera, J., Mateos, L. M. & Gil, J.A. (2003).** Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiol* **149**, 3531-3542

**Raskin, D.M. & de Boer, P.A. (1999).** Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **27**, 4971-4976

**RayChaudhuri, D. (1999).** ZipA is a MAP-Tau homolog and is essential for structural integrity of the cytokinetic FtsZ ring during bacterial cell division. *EMBO J* **18**, 2372-2383

**Reddy, M. (2007).** Role of FtsEX in cell division of *Escherichia coli*: viability of ftsEX mutants is dependent on functional SufI or high osmotic strength. *J Bacteriol* **189**, 98-108

**Rothfield, L., Taghbalout, A. & Shih, Y.L. (2005).** Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat Rev Microbiol* **3**, 959-968

**Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, 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

**Schägger, H. & von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.

**Scheffers, D.J. (2008).** The effect of MinC on FtsZ polymerization is pH dependent and can be counteracted by ZapA. *FEBS letters* **582**, 2601-2608

**Schmidt, K.L., Peterson, N.D., Kustus, R.J., Wissel, M.C., Graham, B., Phillips, G.J. & Weiss, D.S. (2004).** A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 785-793

**Schumacher, M.A. & Funnell, B.E. (2005).** Structures of ParB bound to DNA reveal mechanism of partition complex formation. *Nature* **438**, 516-519

**Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnol* **1**, 784-791

**Soufo, H.J. & Graumann, P.L. (2003).** Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr Biol* **13**, 1926-1920

**Soufo, H.J. & Graumann, P.L. (2006).** Dynamic localization and interaction with other *Bacillus subtilis* actin-like proteins are important for the function of MreB. *Mol Microbiol* **62**, 1340-1356

**Stahlberg, H., Kutejova, E., Muchova, K., Gregorini, M., Lustig, A., Müller, S.A., Olivieri, V., Engel, A., Wilkinson, A.J. & Barak, I. (2004).** Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol Microbiol* **52**, 1281-1290

**Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990).** Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89

**Suefuji, K., Valluzzi, R. & RayChaudhuri, D. (2002).** Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *PNAS* **99**, 16776-16781

**Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A. & Kalinowski, J. (2002).** Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr Microbiol* **45**, 362-367

**Teleman, A.A., Graumann, P.L., Lin, D.C., Grossman, A.D. & Losick, R. (1998).** Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol* **8**, 1102-1109

**Thanbichler, M. & Shapiro, L. (2006).** MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* **126**, 147-162

**Thanbichler, M. & Shapiro, L. (2007).** Getting organized – how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**, 28-40

**Thanky, N.R., Young, D.B. & Robertson, B.D. (2007).** Unusual features of the cell cycle in mycobacteria: polar-restricted growth and the snapping-model of cell division. *Tuberculosis (Edinb)* **87**, 231-236

**Thakur, M. & Chakraborti, P.K. (2006).** GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA.. *J Biol Chem* **281**, 40107-40113

**Thomaides, H.B., Freeman, M., El Karoui, M. & Errington, J. (2001).** Division site selection protein DivIVA in *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev* **15**, 1662-1673

**Valbuena, N., Letek, M., Ordóñez, E., Ayala, J., Daniel, R.A., Gil, J.A. & Mateos, L.M. (2007).** Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol Microbiol* **66**, 643-657

**Valbuena, N., Letek, M., Ramos, A., Ayala, J., Nakunst, D., Kalinowski, J., Mateos, L.M. & Gil, J.A. (2006).** Morphological changes and proteome response of *Corynebacterium glutamicum* to a partial depletion of FtsI. *Microbiol* **152**, 2491-2503

**Van den Ent, F., Amos, L.A. & Löwe, J. (2001).** Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**, 39-44

**Van den Ent, F., Möller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K. & Löwe, J. (2002).** F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J* **21**, 6935-6943

**Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H. & Shapiro, L. (2004).** Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9257-9262

**Wang, X., Liu, X., Possoz, C. & Sherratt, D.J. (2006a).** The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev* **20**, 1727-1731

**Wang, S.C., West, L. & Shapiro, L. (2006b).** The bifunctional FtsK protein mediates chromosome partitioning and cell division in *Caulobacter*. *J Bacteriol* **188**, 1497-508

**White, E.L., Ross, L.J., Reynolds, R.C., Seitz, L.E., Moore, G.D. & Borhani, D.W. (2000).** Slow polymerization of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J Bacteriol* **182**, 4028-4034

**Wu, L. J. & Errington, J. (2004).** Coordination of cell division and chromosome segregation by nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**, 915-925

**Yamaichi, Y., Fogel, M., McLeod, S., Hui, M. & Waldor M. (2007).** Distinct centromere-like *parS* sites on the two chromosomes of *Vibrio* spp.. *J Bacteriol* **189**, 5314-5324

**Yu, X.-C. & Margolin, W. (1997).** Ca<sup>2+</sup>-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks *in vitro*. *EMBO J* **16**, 5455-546

# Danksagung

Ich danke:

- Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und seine wertvollen Ratschläge
- Frau Prof. Dr. Karin Schnetz, für die freundliche Übernahme des Koreferats
- Marc Bramkamp, für die tolle Betreuung, die guten Tipps und die Motivation
- Jule Reihlen, für die super Einarbeitung in die Manipulation von *Corynebacterium*
- Anja, Ute und Gabi für die tolle Unterstützung!
- Christian Schultz, für die gute Zusammenarbeit
- Bettine, dafür dass du da warst!
- Philipp, für die Eroberung von großen Kisten und tiefen Löchern
- Suey und Catriona, für viel Spass und gute Gespräche
- Martin, Vera, Sascha, Gerd, Kay, Ines, Kirsten, Jeannine, Markus, Frank, Jens und dem gesamten Rest der AG Kämer für die gute Zeit!
- Claudia, Alex, Johannes, Flo, Miri, Jan, Nuran und Darius für das Interesse, die Unterstützung und z.T. für das Korrekturlesen
- Volker, Micha, Karsten, Hans, Sabine, Martin, dem anderen Martin, Runa, Andi, Marc und Peter für die Zerstreung und kritische Nachfragen
- Meiner Familie



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß und nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jede, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, März 2009

Unterschrift

