

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Aufbau ATP-abhängiger Proteasen.....	5
2.2 Aufbau und Domänenstruktur von Clp-Proteasen	6
2.3 Funktion der Clp-Protease	8
2.4 Substraterkennung und Adaptoren von Clp-Proteasen	9
2.5 ATP-abhängige Proteolyse in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
2.6 Ziele der Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Chemikalien und Enzyme	16
3.2 Stammlösungen	16
3.3 Bakterienstämme und Plasmide.....	17
3.3.1 Bakterienstämme.....	17
3.3.2 Plasmide	18
3.4 Oligonukleotide	20
3.5 Nährmedien	22
3.6 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien.....	23
3.6.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	23
3.6.2 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> -Stämmen	23
3.6.3 Stammhaltung von Bakterien	23
3.6.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen	24
3.7 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.7.1 Isolierung von DNA.....	24
3.7.1.1 Plasmid-Isolierung	24
3.7.1.2 Isolierung chromosomaler DNA.....	24
3.7.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	25
3.7.2 Reinigung und Konzentration von DNA.....	25
3.7.2.1 Reinigung von PCR-Produkten.....	25
3.7.2.2 Konzentration von DNA-Lösungen mit Mikrokonzentratoren	25
3.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	25
3.8 Rekombinante DNA-Techniken.....	26
3.8.1 Restriktion.....	26

3.8.2	5'-Dephosphorylierung von linearer Plasmid-DNA	26
3.8.3	Ligation.....	26
3.8.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.9	Klonierungsexperimente	28
3.9.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode	28
3.9.2	Herstellung elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	28
3.9.3	Transformation Rubidiumchlorid-kompeter <i>E. coli</i> -Zellen.....	29
3.9.4	Elektroporation elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	29
3.9.5	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR) ...	30
3.9.6	Kolonie-PCR	31
3.9.7	Konstruktion von Deletionsmutanten	31
3.9.8	Ortsgerichtete Mutagenese.....	32
3.9.9	DNA-Sequenzanalyse.....	34
3.10	Biochemische Methoden.....	34
3.10.1	Zellaufschluss von <i>C. glutamicum</i> mit Glasperlen	34
3.10.2	Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle.....	35
3.10.3	Reinigung von Proteinen mit StrepTag-II.....	35
3.10.4	Entfernung von ClpP-ST aus dem Eluat der StrepTactin-Affinitätschromatographie	36
3.10.5	Konzentration von Proteinen.....	36
3.10.6	Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	36
3.10.7	N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen	37
3.10.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.10.9	Western-Blot	37
3.10.10	Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen.....	38
3.10.11	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau	39
3.10.12	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen	39
3.10.13	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	40
3.10.14	MALDI-ToF Massenspektrometrie	41
4	Ergebnisse.....	43
4.1	„Fangen“ von Clp-Protease-Substraten <i>in vivo</i>	43
4.1.1	Konstruktion der Substratfallenstämme	44
4.1.1.1	Deletion der Gene <i>smpB</i> , <i>clpE</i> und <i>clpX</i> in dem Stamm <i>C. glutamicum</i> P_{tetA} - <i>clpP1P2</i>	45
4.1.1.2	Gerichtete Mutagenese von <i>clpP1</i> und <i>clpP2</i>	46
4.1.1.3	Konstruktion von ClpCP1 ^{TRAP} und ClpCP2 ^{TRAP}	48
4.1.2	Co-Reinigung von Substraten mit ClpP	49
4.1.3	Kontrollen zur Spezifität der Co-Reinigung.....	53

4.1.3.1	Versuche zur Konstruktion eines Stammes mit Deletionen von <i>clpC</i> , <i>clpE</i> und <i>clpX</i>	53
4.1.3.2	Versuche zur Reinigung von aktivem ClpP1 und ClpP2	54
4.1.3.3	Reinigung von ClpP1 mit einem N-terminalen StrepTag-II.....	57
4.1.3.4	Reinigung der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	59
4.2	Identifizierung von potentiellen Substraten der ClpCP-Protease	62
4.3	Ableitung und Überprüfung von Erkennungsmotiven	68
4.3.1	Ableitung der Sequenzmotive.....	68
4.3.2	Überprüfung der Relevanz der abgeleiteten Motive.....	70
4.3.3	Einfluss des N-Terminus von ClgR auf dessen Stabilität.....	75
4.4	Bioinformatische Auswertung möglicher Substrate der ClpXP-Protease	76
5	Diskussion.....	79
5.1	Identifizierung von potentiellen Substraten der ClpCP-Protease	79
5.1.1	Co-Reinigung von potentiellen Substraten mit inaktivem ClpP1 und ClpP2	79
5.1.2	Kontrollen zur Spezifität der Co-Reinigung	80
5.1.3	Identifizierung der mit ClpP1 bzw. ClpP2 co-gereinigten Proteine.....	82
5.2	Ableitung und Überprüfung potentieller Erkennungsmotive von ClpC	83
5.3	ClpCP-abhängige Degradation der putativen Substrate	84
5.4	ClgR – ein konditionales Substrat der ClpCP-Protease.....	90
5.5	Potentielle Substrate der <i>C. glutamicum</i> ClpXP-Protease	92
5.6	Ausblick	93
6	Literatur	95
7	Anhang.....	110