

## Inhaltsverzeichnis

I	<b>Abstract</b> .....	1
II	<b>Zusammenfassung</b> .....	3
III	<b>Einleitung</b> .....	5
1	Die Rolle der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase bei der Glutamat-Produktion mit <i>C. glutamicum</i> .....	5
2	Posttranslationales Regulationsmodell der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in <i>C. glutamicum</i> .....	8
3	Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in <i>C. glutamicum</i> .	10
4	Das Thema der Arbeit.....	14
IV	<b>Material und Methoden</b> .....	15
1	<b>Pufferlösungen, Antibiotika und andere Stammlösungen</b> .....	15
2	<b>Nährmedien</b> .....	16
3	<b>Oligonukleotide</b> .....	17
4	<b>Bakterienstämme</b> .....	18
5	<b>Plasmide</b> .....	20
5.1	Konstruktion des Plasmids pET28b-odhI.....	22
5.2	Konstruktion des Plasmids pK18mob-odhI-Strep.....	23
5.3	Konstruktion der Plasmide pET16b-pknA-KD, pET16b-pknB-KD, pET16b-pknG-KD und pET16b-pknL-KD.....	23
5.4	Konstruktion von Plasmiden zur Expression von mutierten OdhI-Derivaten.....	24
6	<b>Stammhaltung von Bakterienstämmen</b> .....	24
7	<b>Kultivierung von <i>C. glutamicum</i></b> .....	25
7.1	Kultivierung unter Glutamat-induzierenden Bedingungen.....	25
7.2	Kultivierung zur Identifizierung von OdhI-Phosphorylierungsstimuli.....	26
7.3	Bestimmung des Wachstums von Bakterien und der Zelltrockenmasse von <i>C. glutamicum</i> .....	26
8	<b>Kultivierung von <i>E. coli</i></b> .....	27
8.1	Expressionskulturen.....	27

<b>9</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>27</b>
9.1	Isolierung von genomischer DNA.....	27
9.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
9.3	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	28
9.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	28
9.5	Rekombinante DNA-Techniken.....	29
9.6	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
9.7	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen..	30
9.8	Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> - Systems.....	31
9.9	Polymerasekettenreaktion.....	32
9.10	Ortsgerichtete Mutagenese.....	33
9.11	DNA-Sequenzanalyse.....	34
<b>10</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>34</b>
10.1	Zellaufschluss, Zellfraktionierung und Solubilisierung von Proteinen aus Zellmembranen.....	34
10.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
10.3	Affinitätschromatographie mittels <i>StrepTactin</i> -Sepharose.....	36
10.4	Affinitätschromatographie mittels „Ni <sup>2+</sup> -Nitrilotriacetic acid“ (NTA)- Agarose.....	37
10.5	Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen.....	37
10.6	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen.....	37
10.7	Größenausschlusschromatographie.....	38
10.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
10.9	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
10.10	Antiserumgewinnung.....	39
10.11	Western-Blot.....	39
10.12	2-D-Gelelektrophorese.....	40
10.13	Phosphorylierungsexperimente.....	41
10.14	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	42
<b>11</b>	<b>Mikroskopische Methoden.....</b>	<b>44</b>
11.1	Phasenkontrast-Mikroskopie.....	44
<b>12</b>	<b>Enzymatisch-photometrische Glucose-Bestimmung.....</b>	<b>45</b>
<b>13</b>	<b>Bestimmung von Glutamat mittels <i>reversed-phase</i> HPLC.....</b>	<b>46</b>

<b>V</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>1</b>	<b>Charakterisierung des OdhI-Phosphorylierungsstatus und der Glutamat-Produktion verschiedener <i>C. glutamicum</i>-Stämme.....</b>	<b>48</b>
1.1	Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse von OdhI.....	48
1.2	Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus in <i>C. glutamicum</i> Wildtyp sowie den Mutanten $\Delta pknG$ und $\Delta ppp$ .....	51
1.3	Überprüfung der OdhI-OdhA-Interaktion.....	52
1.3.1	Konstruktion des Stammes <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032:: pK18 <i>mob-odhI</i> <sub>Strep</sub> und Verwendung in Coreinigungs-experimenten.....	52
1.4	Einfluss einer <i>pknG</i> -Deletion auf die Glutamat-Produktion.....	54
1.5	Einfluss der Deletion von <i>odhI</i> oder <i>odhI</i> und <i>pknG</i> auf die Glutamat-Produktion.....	56
1.6	Komplementation einer <i>odhI</i> -Deletion und Einfluss auf die Glutamat-Produktion.....	57
1.7	Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer <i>pknG</i> - und <i>odhI</i> -Deletion auf die Glutamat-Produktion.....	59
1.8	Untersuchungen des OdhI-Phosphorylierungsstatus in <i>C. glutamicum</i> Wildtyp unter Glutamat-induzierenden Bedingungen..	60
1.9	Versuche zur Identifizierung von OdhI-Phosphorylierungsstimuli.....	61
<b>2</b>	<b>Einfluss von PknA, PknB und PknL auf den <i>in-vivo</i>-OdhI-Phosphorylierungsstatus in <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>63</b>
2.1	Konstruktion und Charakterisierung verschiedener Ser-/Thr-Proteinkinase-Deletionsmutanten.....	63
2.2	Untersuchungen zum OdhI-Phosphorylierungsstatus in diversen Ser-/Thr-Proteinkinase-Deletionsmutanten.....	70
2.3	Einfluss einer <i>pknA</i> -, <i>pknB</i> - und <i>pknL</i> -Deletion auf die Ethambutol-induzierte Glutamat-Produktion.....	74
<b>3</b>	<b><i>In-vitro</i>-OdhI-Phosphorylierung durch PknA, PknB, PknG und PknL.....</b>	<b>76</b>
3.1	Bioinformatische Analyse zur Bestimmung der Lokalisation der Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL.....	76

3.2	Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse der Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL.....	77
3.3	Versuche zur Bestimmung der Odhl-Phosphorylierungsstelle.....	82
3.3.1	<i>In-vitro</i> -Phosphorylierungsassays mit den gereinigten Kinasedomänen und Odhl sowie massenspektrometrische Analysen.....	82
3.3.2	<i>In-vitro</i> -Phosphorylierungsassays mit mutierten Odhl-Derivaten.....	86
3.3.3	Massenspektrometrische Analysen mittels ESI-MS/MS.....	88
4	<b>Identifizierung von FtsZ und Icd als weitere <i>in-vitro</i>-Substrate für Ser-/Thr-Proteinkinasen in <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>90</b>
VI	<b>Diskussion.....</b>	<b>95</b>
1	<b>Welche Rolle spielen Odhl und PknG in <i>C. glutamicum</i>?.....</b>	<b>95</b>
2	<b>Welche Rolle spielen PknA, PknB, PknL und Ppp bei der Odhl-Phosphorylierung in <i>C. glutamicum</i>?.....</b>	<b>98</b>
3	<b>Welche Rolle spielen Odhl und die Ser-/Thr-Proteinkinasen bei der Glutamat-Produktion mit <i>C. glutamicum</i>?.....</b>	<b>104</b>
4	<b>Identifizierung neuer Substrate für Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>107</b>
5	<b>Zusammenfassende Darstellung der posttranslationalen Regulation durch Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>112</b>
VII	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
VIII	<b>Anhang.....</b>	<b>128</b>
A1	<b>Sequenz des Gens <i>odhl</i> aus <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>128</b>
A2	<b>Sequenz der Gene <i>pknA</i> und <i>pknB</i> aus <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>129</b>
A3	<b>Sequenz des Gens <i>pknG</i> aus <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>132</b>
A4	<b>Sequenz des Gens <i>pknL</i> aus <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>135</b>
A5	<b>Restriktionskarten der konstruierten Plasmide.....</b>	<b>138</b>
A6	<b>MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerprintanalysen.....</b>	<b>141</b>
A7	<b>2-D-Gele.....</b>	<b>144</b>