



Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum*

Graziella Bosco

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

Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum*

Graziella Bosco

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 45

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-754-2

Inhaltsverzeichnis

I. Abstract	1
II. Zusammenfassung	3
III. Einleitung	5
1. Glutamat-Produktion durch Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase	6
2. Signaltransduktion durch Serin-/Threonin-Proteinkinasen (STPKs)	10
3. Das putative Operon <i>glnX-glnH-pknG</i>	12
4. Das Thema der Arbeit	16
IV. Material und Methoden	17
1. Antibiotika, Pufferlösungen und andere Stammlösungen	17
2. Nährmedien	18
3. Oligonukleotide	19
4. Plasmide	22
5. Bakterienstämme	24
6. Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	25
7. Stammhaltung von Bakterienstämmen	27
8. Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	28
9. Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen und der Zelltrockenmasse von <i>C. glutamicum</i>	29
10. Kultivierung von <i>E. coli</i>	29
11. Molekularbiologische Methoden	29
12. Proteinbiochemische Methoden	35
13. Enzymatische Aktivitätstests	41
14. DNA-Microarray-Technologie	42
15. Bestimmung von Glucose und organischen Säuren mittels HPLC	44
16. Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed-phase</i> HPLC	44

II Inhaltsverzeichnis

V. Ergebnisse	46
1. Transkriptionelle Organisation des putativen Operons <i>glnX-glnH-pknG</i>	46
2. Phänotypische Charakterisierung verschiedener <i>C. glutamicum</i> -Deletionsmutanten	50
3. Untersuchungen zum OdhI-Phosphorylierungsstatus in <i>C. glutamicum</i> -Deletionsmutanten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	62
4. Charakterisierung von <i>C. glutamicum</i> Δ <i>glnX2</i> -Suppressormutanten	65
5. Bioinformatische und experimentelle Analyse der Topologie des integralen Membranproteins GlnX	79
6. Biochemische Charakterisierung des Lipoproteins GlnH	81
7. Charakterisierung der Deletionsmutanten Δ <i>cg3041</i> und Δ <i>cg3042</i>	83
8. Co-Reinigungsversuche der Proteine GlnX und GlnH	84
9. Lokalisation der Ser-/Thr-Proteinkinase PknG in Abhängigkeit von der Kohlenstoff-Quelle	87
VI. Diskussion	89
1. Einfluss der Proteine GlnX, GlnH und PknG auf die Aktivität des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes in <i>C. glutamicum</i>	89
2. Das Membranprotein GlnX in <i>C. glutamicum</i>	93
3. Einfluss der Sekundärmutationen auf OdhI	97
4. GlnH-GlnX-PknG: Eine neuartige Signaltransduktionskaskade	102
5. Zusammenfassende Darstellung	103
VII. Literaturverzeichnis	105
VIII. Anhang	116
1. Sequenz der Gene <i>glnX</i> , <i>glnH</i> und <i>pknG</i> aus <i>C. glutamicum</i>	116
2. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	120
3. Transkriptomvergleich <i>C. glutamicum</i> Δ <i>glnX2</i> -K1 gegen Wildtyp	126
4. Peptidmassen- <i>Fingerprint</i> -Analysen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie	128