



Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*: Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne

Sabine Krawczyk

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

Signaltransduktion in *Corynebacterium glutamicum*: Studien zur Rolle von Proteinen mit einer FHA-Domäne

Sabine Krawczyk

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 49

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-771-9

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
1 Abstract	11
2 Zusammenfassung	12
3 Einleitung	13
3.1 Signaltransduktion durch Serin/Threonin-Proteinkinasen in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	13
3.2 Rolle der FHA-Domänen-Proteine in <i>C. glutamicum</i>	15
3.3 Posttranslationale Regulation des ODH-Komplexes in <i>C. glutamicum</i>	18
4 Material und Methoden	23
4.1 Pufferlösungen und andere Stammlösungen.....	23
4.2 Nährmedien.....	24
4.3 Oligonukleotide.....	25
4.4 Bakterienstämme.....	26
4.5 Plasmide.....	27
4.5.1 Konstruktion von pJC1-Derivaten.....	29
4.5.2 Konstruktion von pET-TEV-Derivaten.....	29
4.5.3 Konstruktion von pAN6-Derivaten.....	30
4.5.4 Konstruktion des Plasmids pEKEx2- <i>fhaAB</i>	31
4.6 Stammhaltung von Bakterienstämmen.....	31
4.7 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	31
4.7.1 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> zur Proteinüberproduktion.....	31
4.7.2 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> zur Untersuchung des Einflusses von Glutamin auf den Phosphorylierungsstatus von OdhI.....	32
4.8 Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
4.8.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Proteinüberproduktion.....	33
4.9 Bestimmung des Wachstums von Bakterien.....	33
4.10 Molekularbiologische Methoden.....	33
4.10.1 Isolierung von genomischer DNA.....	33
4.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA.....	34
4.10.3 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	34
4.10.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	34
4.10.5 Rekombinante DNA-Techniken.....	34
4.10.6 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen.....	35
4.10.7 Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	36
4.10.8 Polymerasekettenreaktion.....	36
4.10.9 Ortsgerichtete Mutagenese.....	37

4.10.10	DNA-Sequenzanalyse	38
4.11	Proteinbiochemische Methoden	38
4.11.1	Zellaufschluss, Zellfraktionierung und Solubilisierung von Proteinen aus Zellmembranen.....	38
4.11.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	39
4.11.3	Affinitätschromatographie mittels „Ni ²⁺ - Nitrilotriessigsäure“ (NTA)-Agarose..	40
4.11.4	Affinitätschromatographie mittels <i>StrepTactin</i> - Sepharose.....	40
4.11.5	Pufferaustausch durch Gelfiltration mittels PD-10- Säulchen	41
4.11.6	Konzentrierung von Proteinlösungen	41
4.11.7	Größenausschlusschromatographie	41
4.11.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
4.11.9	Western-Blot.....	42
4.11.10	N-terminale Proteinsequenzierung	43
4.11.11	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	43
4.11.12	Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Technik.....	44
4.12	Mikroskopische Methoden	45
4.12.1	Phasenkontrast-Mikroskopie.....	45
4.13	HPLC-Methoden	46
4.13.1	Bestimmung von Glucose und organischen Säuren.....	46
4.13.2	Bestimmung von Aminosäuren	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Charakterisierung der Interaktion zwischen der ODH-Komplex-Untereinheit OdhA und dem FHA-Domänen-Protein OdhI	47
5.1.1	Eingrenzung interagierender Proteindomänen in OdhA mittels Koreinigungsexperimenten	47
5.1.2	Eingrenzung interagierender Proteindomänen in OdhI mittels Koreinigungsexperimenten	50
5.1.3	Eingrenzung interagierender Proteindomänen mittels SPR-Technik.....	51
5.2	Untersuchung des Einflusses von Glutamin auf den OdhI-Phosphorylierungsstatus	55
5.3	Wachstumsanalyse von <i>C. glutamicum</i> $\Delta odhI$	57
5.3.1	Komplementation der <i>odhI</i> -Deletion.....	59
5.4	Biochemische Charakterisierung der Proteine FhaA und FhaB	61
5.4.1	Bioinformatische Analyse der Domänenstruktur von FhaA und FhaB	61
5.4.2	Bestimmung des nativen Translationsstarts von FhaA.....	62
5.4.3	Analyse der Lokalisation von FhaB	63
5.4.4	Überproduktion, Reinigung und Bestimmung der nativen molekularen Masse von FhaA und FhaB	64
5.4.5	Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in FhaA und FhaB	68
5.4.6	Funktionale Untersuchung von FhaA.....	70
5.5	Charakterisierung der Stämme <i>C. glutamicum</i> $\Delta fhaA$ und $\Delta fhaB$	72
5.5.1	Wachstumsanalyse von <i>C. glutamicum</i> $\Delta fhaA$ und $\Delta fhaB$	72
5.5.2	Komplementation der <i>fhaA</i> - und <i>fhaB</i> -Deletion.....	76
5.5.3	Untersuchung der Zellmorphologie von <i>C. glutamicum</i> $\Delta fhaA$ und $\Delta fhaB$	77
5.6	Identifizierung von Interaktionspartnern von FhaA und FhaB.....	79
5.6.1	Koreinigungsexperimente mit FhaA und FhaB.....	79

6	Diskussion	81
6.1	Charakterisierung der OdhA-OdhI-Interaktion	81
6.2	Untersuchungen zur physiologischen Funktion von OdhI in <i>C. glutamicum</i>	82
6.3	Biochemische Eigenschaften von FhaA und FhaB	86
6.4	Funktion von FhaA und FhaB in <i>C. glutamicum</i>	89
	Literaturverzeichnis	93
	Anhang	104



Gesundheit / Health
Band / Volume 49
ISBN 978-3-89336-771-9

