



Pupylierung in *Corynebacterium glutamicum*

Andreas Küberl

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Bio- and Geosciences (IBG)
Biotechnology (IBG-1)

Pupylisierung in *Corynebacterium glutamicum*

Andreas Küberl

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 74

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-969-0

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Bedeutung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	3
1.2 Die Ubiquitinierung.....	5
1.3 Die Pupylierung.....	6
1.3.1 Der Ablauf der Pupylierung in <i>Mycobacterium</i> sp.	6
1.3.1 Pupylierung und Proteasom in Actinobakterien.....	7
1.3.2 Proteine der Pupylierungsmaschinerie	9
1.3.3 Die physiologische Relevanz der Pupylierung	12
1.3.4 <i>C. glutamicum</i> und die Pupylierung	14
1.4 Ziele dieser Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Stammlösungen	17
2.2 Nährmedien	18
2.3 Bakterienstämme und Plasmide.....	19
2.4 Oligonukleotide	22
2.5 Kultivierung von Bakterienstämmen	25
2.5.1 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienstämmen	25
2.5.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	25
2.5.3 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> im Schüttelkolben.....	26
2.5.4 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> im BioLector	26
2.6 Molekularbiologische Methoden	27
2.6.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	27
2.6.2 DNA-Sequenzierung.....	27
2.6.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i>	27
2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
2.6.5 Reinigung von DNA-Fragmenten	28
2.6.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.6.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	28
2.6.8 Rekombinante DNA-Techniken	29
2.6.9 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29

2.6.10	Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	29
2.6.11	Herstellung von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	30
2.6.12	Isolierung von RNA	31
2.7	Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	31
2.7.1	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivate zur Deletion von Genen	31
2.7.2	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivate zur chromosomalen Insertion von Affinitäts-Tags an Gene oder Mutationen in Gene	32
2.7.3	Konstruktion der <i>E. coli</i> -Expressionsplasmide (pET-Derivate)	33
2.7.4	Konstruktion von pVWEx1-Derivaten als Expressionsplasmide für <i>C. glutamicum</i>	34
2.8	Proteinbiochemische Methoden	35
2.8.1	Zellaufschluss von <i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i>	35
2.8.2	Affinitätsreinigung von Proteinen mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC)	36
2.8.3	Affinitätsreinigung von Proteinen mittels Streptactin-Sepharose	36
2.8.4	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	36
2.8.5	Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen	36
2.8.6	Proteinverdau mittels TEV-Protease	37
2.8.7	<i>In-vitro</i> -Pupylisierung von Substraten	37
2.8.8	Herstellung eines Anti-Pup-Antikörpers	38
2.8.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.8.10	Western-Blot	38
2.9	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	39
2.9.1	Quantifizierung von Aminosäuren	39
2.9.2	Quantifizierung von organischen Säuren und Glucose	40
2.10	Methoden der Transkriptomik und Proteomik	40
2.10.1	Transkriptomanalysen mittels DNA-Microarrays	40
2.10.2	Proteomanalysen mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE)	42
2.10.3	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	44
2.10.4	MudPIT-Massenspektrometrie	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Der <i>pup</i> -Gencluster in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	47
3.2	Reinigung und Identifizierung des Pupyloms aus <i>C. glutamicum</i>	50
3.2.1	Konstruktion eines <i>C. glutamicum pup</i> -Expressionsstammes und Reinigung des Pupyloms	51
3.2.2	Identifizierung pupylierter Proteine in <i>C. glutamicum</i> mittels multidimensionaler Proteinidentifizierungstechnik	53
3.3	Etablierung eines Systems zur <i>in-vitro</i> -Pupylisierung	58
3.3.1	Ferritin als Modellsubstrat der <i>in-vitro</i> -Pupylisierung	58
3.3.2	Untersuchungen zur Pupylisierung von Arginin-Resten	60
3.4	Untersuchungen zur physiologischen Rolle der Pupylisierung in <i>C. glutamicum</i>	62

3.4.1	Untersuchungen zum Wachstum der Δpup -Mutante auf verschiedenen Kohlenstoff-/ Energiequellen sowie unter verschiedenen Stress-/Mangelbedingungen	63
3.4.2	Untersuchungen zum Wachstum von <i>C. glutamicum</i> unter Eisenmangel	64
3.4.3	Untersuchungen des Transkriptoms und des zytosolischen Proteoms der Δpup -Mutante unter Eisenmangel	70
3.4.4	Deletionsmutanten der Depupylase <i>dop</i> und der ATPase <i>arc</i> unter Eisenmangel	76
3.4.5	Identifizierung möglicher Interaktionspartner von ARC unter Eisenmangel	78
3.5	Die pupylierten Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps	79
3.5.1	Charakterisierung von Deletionsmutanten der Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps	79
3.5.2	Die Pupylieung von Ferritin und Dps unter Eisenmangel	82
3.5.3	Stabilität von Ferritin in <i>C. glutamicum</i> WT und Δpup unter Eisenmangel	85
4	Diskussion	87
4.1	Die Pupylieung in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	87
4.1.1	Die Pup-Ligase PafA und Erkennung von Zielproteinen	88
4.1.2	Die regulatorische AAA+-ATPase ARC: Entfaltung ohne Proteolyse?	90
4.1.3	Die Depupylase Dop und die Bedeutung des Pup-Recyclings	91
4.1.4	Der <i>pup</i> -Gencluster	92
4.2	Das Pupylom von <i>Corynebacterium glutamicum</i> im Vergleich mit dem anderer Actinobakterien	94
4.3	Physiologische Untersuchungen von <i>C. glutamicum</i> unter Eisenmangel	96
4.3.1	Die Eisenspeicherproteine Ferritin und Dps in <i>C. glutamicum</i>	96
4.3.2	Die Rolle der Pupylieung unter Eisenmangel	98
4.4	Putativer Pup-vermittelter Mechanismus der Eisensfreisetzung aus Ftn und Dps	101
5	Literaturverzeichnis	105
6	Anhang	119
6.1	MALDI-TOF/TOF-MS-Daten	119
6.2	Zusätzliche Daten zu den MudPIT-Messungen	141
6.3	Zusätzliche SDS-Gele und Western-Blots	157
6.4	Microarrayergebnisse	158
	Danksagungen	162
	Erklärung	163

