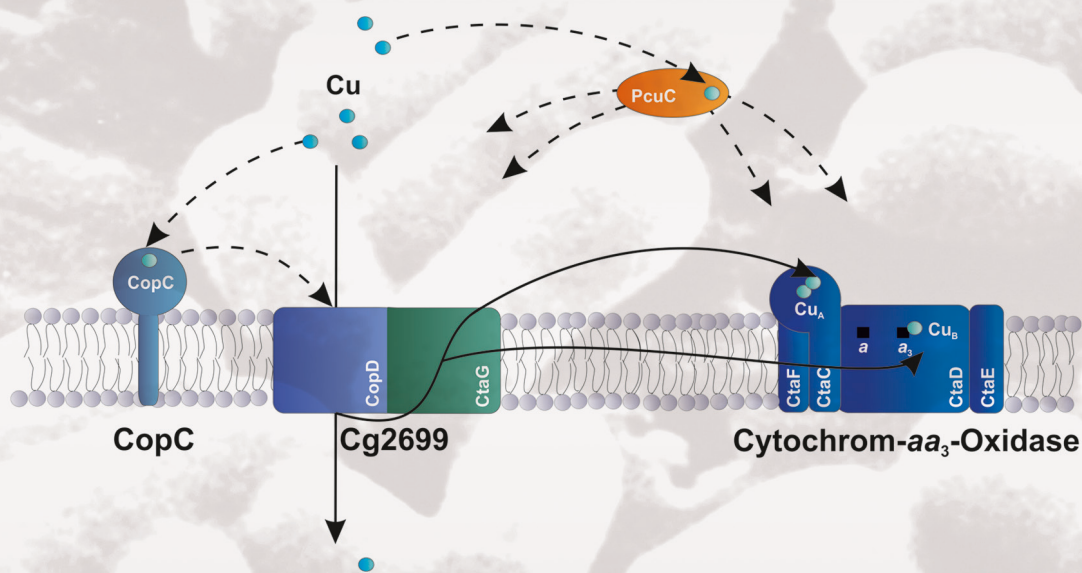


Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*

Xenia Schuplezow



Gesundheit / Health
Band / Volume 80
ISBN 978-3-95806-085-2

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

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Kupfer-Homöostase in *Corynebacterium glutamicum*

Xenia Schuplezow

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 80

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-95806-085-2

Inhaltsverzeichnis:

Abstract	1
Zusammenfassung	3
Einleitung	5
1 Rolle von Kupfer in biologischen Systemen.....	5
2 Regulation der Kupfer-Homöostase in Bakterien.....	5
3 Kupfer-Homöostase in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
3.1 Das Zweikomponentensystem CopSR	7
3.1.1 Die Sensorkinase CopS.....	8
3.2 Die Atmungskette in <i>C. glutamicum</i>	10
4 Ziele der Arbeit	11
Material und Methoden	12
1 Material	12
1.1 Bakterienstämme	12
1.2 Plasmide	12
1.3 Oligonukleotide	17
1.4 Medien.....	19
1.4.1 Nährmedien.....	19
1.4.2 Puffer und Stammlösungen.....	20
2 Methoden	21
2.1 Stammhaltung von Bakterienstämmen.....	21
2.2 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	21
2.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen	23
2.5 Bestimmung der Glucosekonzentration mittels HPLC	23
2.6 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.7 Herstellung und Transformation kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	24
2.8 DNA-Techniken.....	24
2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.8.2 Isolierung von RNA	25
2.8.3 Reinigung von PCR-Produkten.....	25
2.8.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
2.8.5 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	26
2.8.6 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	26

2.8.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.8.8	Restriktionsverdau.....	27
2.8.9	Ligation	27
2.8.10	DNA-Sequenzanalyse.....	27
2.8.11	Klonierung mittels In-Fusion TM Advantage PCR Cloning Kit	28
2.8.12	Ortsgerichtete Mutagenese	28
2.8.13	Plasmidkonstruktion.....	29
2.8.13.1	Konstruktion von pET-Derivaten	29
2.8.13.2	Konstruktion von pEKEx2- und pVWEx2-Derivaten	30
2.8.13.3	Konstruktion von pK19 <i>mobsacB</i> -Deletionsplasmiden	31
2.8.14	Konstruktion der Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19 <i>mobsacB</i> -Systems	32
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.9.1	Zellaufschluss.....	32
2.9.2	Solubilisierung von Membranproteinen	33
2.9.3	Bestimmung von Proteinkonzentration	33
	Bradford-Methode:	33
	UV-Absorption:	33
2.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.9.5	Westernblot-Analyse	35
2.9.6	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	35
2.9.7	Strep-Tactin-Chromatographie.....	36
2.9.8	TEV-Protease-Verdau	36
2.9.9	Größenausschlusschromatographie.....	37
2.9.10	Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinlösungen	37
2.9.11	Proteinidentifizierung mittels MALDI-ToF-MS Analyse	38
2.9.12	Bestimmung der Proteinstabilität von CtaD _{St}	39
2.10	DNA-Microarray-Technologie.....	39
2.10.1	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	40
2.10.2	Prähybridisierung	40
2.10.3	Hybridisierung	41
2.10.4	Posthybridisierung.....	41
2.10.5	Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen.....	41
2.10.6	Normierung und statistische Analyse von DNA-Microarray-Daten	42
2.10.7	Archivierung von DNA-Microarray-Daten	43
2.11	Analyse von Cytochromspektren.....	43

2.12	Fluoreszenzmikroskopie	43
2.13	Röntgenstrukturanalyse der Sensorkinase CopS.....	44
2.13.1	Proteinkristallisation.....	44
	Microbatch:	44
	Evaporationsmethode:	45
	<i>Lipidic sponge phase</i> :.....	45
	Verwendung der Lipopeptid-Detergenzien:.....	46
2.13.2	Messung der Röntgenbeugungsmuster von Proteinkristallen.....	46
2.14	Festkörper-NMR mit rekonstituierter Sensorkinase-CopS.....	47
2.14.1	Rekonstitution von N _{GHM} CopS ₂₀₆ in <i>E. coli</i> -Liposomen	47
2.14.2	Bestimmung von DDM-Konzentration	48
2.14.3	Saccharose-Dichtegradient.....	49
2.14.4	Festkörper-NMR-Spektroskopie	49
	Ergebnisse	51
1.	Strukturelle Untersuchungen der Sensorkinase CopS.....	51
1.1	Kristallisation von CopS für Röntgenstrukturanalyse.....	51
1.1.1	Kristallisation von N _{GHM} CopS	51
1.1.2	Kristallisation verschiedener CopS-Derivate	54
1.2	Festkörper-NMR mit der Sensorkinase CopS	57
1.2.1	Probenvorbereitung für Festkörper-NMR	57
1.2.2	Suche nach einem geeigneten C-terminal verkürzten CopS-Derivat	58
1.2.3	Überproduktion, Reinigung und TEV-Verdau von NHis ₆ -TEV-CopS ₂₀₆	59
1.2.4	Rekonstitution von N _{GHM} CopS ₂₀₆ für Festkörper-NMR	62
2.	Funktionelle Untersuchungen zu Kupfer-Mangel in <i>C. glutamicum</i>	65
2.2	Auswirkungen der Kupfer-limitierenden Bedingungen auf <i>C. glutamicum</i> WT	65
2.3	Charakterisierung von ausgewählten Genen aus dem Kupfer-Mangel-Stimulon von <i>C. glutamicum</i>	68
2.3.1	Wachstumsverhalten der Δcg2699-Deletionsmutante	71
2.3.2	Transkriptomvergleich Δcg2699-Deletionsmutante vs. WT.....	73
2.3.3	Cytochromspektren der Δcg2699-Deletionsmutante	74
2.3.4	Nachweis von CtaD _{St} in ΔctaDΔcg2699/pJC1-CtaD _{St}	75
2.3.5	Ko-Reinigungsexperimente mit CtaD _{St} und QcrB _{St}	77
2.3.6	Vorbereitungen für FRET zum Nachweis einer Interaktion zwischen CtaD und Cg2699	79
2.3.7	Charakterisierung der ΔcopC-Deletionsmutante	80
	Diskussion	83

1.	Strukturelle Untersuchungen der Sensorkinase CopS.....	83
2.	Bedeutung von Kupfer-Mangel für <i>C. glutamicum</i>	86
2.1	Evidenzen für eine duale Funktion von Cg2699 beim Kupfer-Import und -Einbau.....	88
2.2	Beteiligung der Proteine CopC und PcuC an der Kupfer-Homöostase in <i>C. glutamicum</i>	92
2.3	Möglicher Mechanismus des Kupfer-Imports und der Kupfer-Insertion in die Cytochrom- <i>aa</i> ₃ - Oxidase	94
	Literaturverzeichnis	96
	Anhang	107
1.	Initiale Kristallisationsbedingungen für N _{GHM} CopS.....	107
2.	Transkriptomvergleiche <i>C. glutamicum</i> WT unter Kupfer-Mangel vs. WT und Δcg2699 vs. WT	107
3.	Wachstum der Δcg2699-Mutante bei leichtem Kupfer-Überschuss.....	112
4.	Sequenzvergleiche.....	113

Gesundheit / Health
Band / Volume 80
ISBN 978-3-95806-085-2

