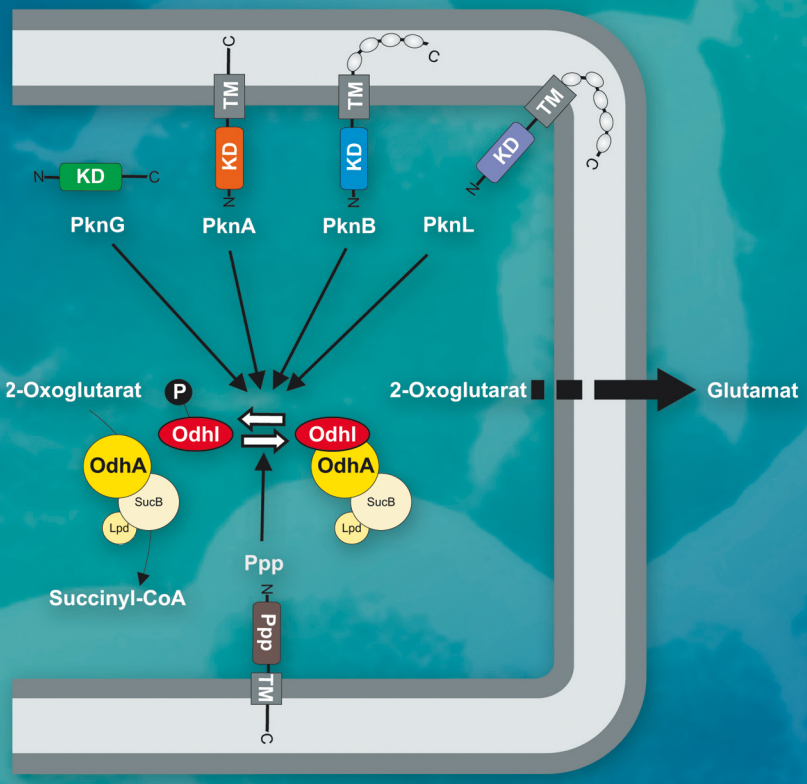


Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*

Christian Schultz

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 10

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie (IBT-1)

Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum*

Christian Schultz

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 10

ISSN 1866-1785 ISBN 978-3-89336-560-9

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: http://www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2009

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 10

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2008)

ISSN 1866-1785
ISBN: 978-3-89336-560-9

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter http://www.fz-juelich.de/zb/juwel

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Teile dieser Arbeit erschienen in den folgenden Publikationen:

Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B., Bott, M. (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J. Biol. Chem*. **281**: 12300-12307.

Schultz, C., Niebisch, A., Gebel, L., and Bott, M. (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 691-700.

Inhaltsverzeichnis

I Abstract……..1

II Zusammenfassung……..3

III Einleitung……..5

1 Die Rolle der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase bei der Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum*……..5

2 Posttranslationales Regulationsmodell der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *C. glutamicum*……8

3 Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in *C. glutamicum.*10

4 Das Thema der Arbeit……...14

IV Material und Methoden……...15

1 Pufferlösungen, Antibiotika und andere Stammlösungen……. 15

2 Nährmedien……. 16

3 Oligonukleotide……... 17

4 Bakterienstämme……...18

5 Plasmide……...20

5.1 Konstruktion des Plasmids pET28b-*odhI*…….22

5.2 Konstruktion des Plasmids pK18*mob*-*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 Stammhaltung von Bakterienstämmen……24

7 Kultivierung von *C. glutamicum*…… 25

7.1 Kultivierung unter Glutamat-induzierenden Bedingungen…….25

7.2 Kultivierung zur Identifizierung von OdhI-Phosphorylierungs-stimuli……. 26

7.3 Bestimmung des Wachstums von Bakterien und der Zelltrocken-masse von *C. glutamicum*…….. 26

8 Kultivierung von *E. coli*…… 27

8.1 Expressionskulturen…… 27

9 Molekularbiologische Methoden……27
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 *E. coli*-Zellen……30
9.7 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen.. 30
9.8 Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19*mobsacB*-Systems…… 31
9.9 Polymerasekettenreaktion…….. 32
9.10 Ortsgerichtete Mutagenese…… 33
9.11 DNA-Sequenzanalyse…… 34
10 Proteinbiochemische Methoden…… 34
10.1 Zellaufschluss, Zellfraktionierung und Solubilisierung von Proteinen aus Zellmembranen……...34
10.2 Proteinkonzentrationsbestimmung…… 35
10.3 Affinitätschromatographie mittels *Strep*Tactin-Sepharose…… 36
10.4 Affinitätschromatographie mittels „Ni^{2+}-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
11 Mikroskopische Methoden…….. 44
11.1 Phasenkontrast-Mikroskopie…… 44
12 Enzymatisch-photometrische Glucose-Bestimmung……... 45
13 Bestimmung von Glutamat mittels *reversed-phase* HPLC……46

V Ergebnisse……48

1 Charakterisierung des OdhI-Phosphorylierungsstatus und der Glutamat-Produktion verschiedener *C. glutamicum*-Stämme……48

1.1 Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse von OdhI……..... 48

1.2 Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum* Wildtyp sowie den Mutanten Δ*pknG* und Δ*ppp*……...51

1.3 Überprüfung der OdhI-OdhA-Interaktion……..52

1.3.1 Konstruktion des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032:: pK18*mob*-*odhI*$_{Strep}$ und Verwendung in Coreinigungs-experimenten…….. 52

1.4 Einfluss einer *pknG*-Deletion auf die Glutamat-Produktion……...54

1.5 Einfluss der Deletion von *odhI* oder *odhI* und *pknG* auf die Glutamat-Produktion…… 56

1.6 Komplementation einer *odhI*-Deletion und Einfluss auf die Glutamat-Produktion…… 57

1.7 Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer *pknG*- und *odhI*-Deletion auf die Glutamat-Produktion……..59

1.8 Untersuchungen des OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum* Wildtyp unter Glutamat-induzierenden Bedingungen..60

1.9 Versuche zur Identifizierung von OdhI-Phosphorylierungsstimuli….. 61

2 Einfluss von PknA, PknB und PknL auf den *in-vivo*-OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum*……...63

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 *pknA*-, *pknB*- und *pknL*-Deletion auf die Ethambutol-induzierte Glutamat-Produktion……74

3 *In-vitro*-OdhI-Phosphorylierung durch PknA, PknB, PknG und PknL……..76

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 OdhI-Phosphorylierungsstelle……. 82
3.3.1 *In-vitro*-Phosphorylierungsassays mit den gereinigten Kinasedomänen und OdhI sowie massenspektrometrische Analysen…….. 82
3.3.2 *In-vitro*-Phosphorylierungsassays mit mutierten OdhI-Derivaten…… 86
3.3.3 Massenspektrometrische Analysen mittels ESI-MS/MS……..88

4 Identifizierung von FtsZ und Icd als weitere *in-vitro*-Substrate für Ser-/Thr-Proteinkinasen in *C. glutamicum*……... 90

VI Diskussion…… 95

1 Welche Rolle spielen OdhI und PknG in *C. glutamicum*?.....95

2 Welche Rolle spielen PknA, PknB, PknL und Ppp bei der OdhI-Phosphorylierung in *C. glutamicum*?..... 98

3 Welche Rolle spielen OdhI und die Ser-/Thr-Proteinkinasen bei der Glutamat-Produktion mit *C.glutamicum*?.....104

4 Identifizierung neuer Substrate für Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in *C. glutamicum*……..107

5 Zusammenfassende Darstellung der posttranslationalen Regulation durch Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in *C. glutamicum*……..112

VII Literaturverzeichnis……...114

VIII Anhang……..128

A1 Sequenz des Gens *odhI* aus *C. glutamicum*…….128

A2 Sequenz der Gene *pknA* und *pknB* aus *C. glutamicum*……...129

A3 Sequenz des Gens *pknG* aus *C. glutamicum*……...132

A4 Sequenz des Gens *pknL* aus *C. glutamicum*……135

A5 Restriktionskarten der konstruierten Plasmide…...138

A6 MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerprintanalysen.141

A7 2-D-Gele……...144

Abkürzungen

2-D	zweidimensional
ε	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
Ø	Durchmesser
µ	mikro (10^{-6}) oder Wachstumsrate
Ω	Ohm
Δ	Delta
A	Ampère oder Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AHT	Anhydrotetracyclin
AS	Aminosäure(n)
ATP/ADP	Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat
Amp^R	Ampicillinresistenz
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	Brain Heart Infusion
BHIS	Brain Heart Infusion – Sorbitol
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin oder Carboxyterminus
ca.	circa
Cam^R	Chloramphenicolresistenz
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammono]-1-propansulfonat
Ci	Curie
Da	Dalton
DDM	Dodecylmaltosid
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
et al.	et alii (und andere)
F	Faraday-Konstante (96487 C mol^{-1})
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
G	Guanin
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid
k	Kilo (10^3)
Kan^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaar(e)
KD	Kinasedomäne
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani

m	milli (10^{-3}) oder Meter oder methyliert oder Masse
M	molar (mol/l) oder Mega
max.	maximal(e)
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MOPS	3-*N*-Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
n	nano (10^{-9})
N	Aminoterminus
NAD^+/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidiert/reduziert
$NADP^+$/NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, oxidiert/reduziert
Na_2EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTA	nitrilotriacetic acid
OD_{600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ODS	Octadecylsilan
orf	open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Teilchen pro Million
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris base – Acetic acid – EDTA
TCA	Trichloressigsäure oder Tricarbonsäurezyklus
TE	Tris base – EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranhelix
TNI	Tris base – NaCl – Imidazol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	4-Octylphenolpolyethoxylat
TZ	Trockenzellen
U	Unit (1 Unit = 1 µmol/min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation
ÜN	über Nacht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
vs.	versus
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Ladung

Drei- und Ein-Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I Abstract

Corynebacterium glutamicum is industrially used for the annual production of about 1.5 million tons of the flavour enhancer L-glutamate. In this process the reduced activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODH) plays a decisive role. Recently, a novel mechanism for posttranslational regulation of ODH activity was identified in our working group. The 15-kDa OdhI protein binds in its unphosphorylated state with high affinity to OdhA, the E1 subunit of ODH, and inhibits the activity of the complex. Phosphorylation of OdhI at threonine-14 by the serine/threonine protein kinase (STPK) PknG prevents binding to OdhA and therefore inhibition of ODH activity.

In the first part of this work the role of this novel regulatory mechanism in glutamate production was investigated. For this purpose, glutamate formation of the wild type and different deletion mutants was investigated under four different conditions, which are known to induce glutamate excretion: biotin limitation, addition of penicillin G, addition of Tween-40 and addition of ethambutol. A Δ*odhI* mutant formed only 1 – 13 % of the glutamate concentration of the wild type under all tested conditions. This defect was abolished by complementation of the Δ*odhI* mutant with an *odhI* expression plasmid. Consequently, the presence of OdhI protein is essential for an efficient glutamate production. Analysis of a Δ*pknG* mutant revealed a significantly increased glutamate production under strong biotin limitation and after addition of ethambutol, but not after addition of Tween-40. Penicillin G resulted in decreased growth of the Δ*pknG* mutant but led to an increased specific glutamate productivity. Thus, influence of a *pknG* deletion on glutamate formation depends on the induction conditions.

A Western blot assay for the *in vivo* analysis of the OdhI phosphorylation status was established in this work allowing differentiation and semiquantitative analysis of phosphorylated and unphosphorylated OdhI. It was shown by this assay that particularly biotin limitation leads to an increased dephosphorylation of the OdhI protein. In addition, it was shown that dephosphorylation of OdhI is inhibited in a mutant lacking the gene *ppp* for the only annotated phospho-serine/threonine protein phosphatase of *C. glutamicum*. Therefore, Ppp was identified as the phosphatase responsible for the dephosphorylation of OdhI.

Former analyses had shown that OdhI is still partially phosphorylated in a Δ*pknG* mutant. Therefore, in a third part of this work the question was analysed, which STPKs besides PknG are involved in the phosphorylation of OdhI. For this purpose, a set of further mutants was constructed in which the four STPK genes were deleted either individually or in combination. The fact that the mutants Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknB*Δ*pknG*, Δ*pknL*Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknL*, Δ*pknB*Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* and Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* could be obtained shows that none of the four STPKs is essential in *C. glutamicum*. The only combination which seems to be lethal is the combined deletion of *pknA* and *pknB*. Western blot analyses with these mutants after growth in BHI medium with glucose revealed that PknA is primary responsible for the phosphorylation of OdhI besides PknG, but PknB and PknL also contribute marginally to OdhI phosphorylation. These *in vivo* analyses were supported by *in vitro* experiments which showed that the isolated kinase domains of PknA, PknB and PknL phosphorylated the OdhI protein. Threonine-15 and serine-46 were identified as additional phosphorylation sites within the OdhI protein by mass spectrometric analyses.

In a fourth part of this work it was analyzed how the deletion of the different STPK genes affects ethambutol-induced glutamate formation. It was shown that the mutants Δ*pknA*, Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* and Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* revealed a similarly increased glutamate formation as the Δ*pknG* mutant, whereas the Δ*pknB* and the Δ*pknL* mutant formed no glutamate after 48 h. These results demonstrate that the four STPKs have very different influences on glutamate production, molecular basis of which is completely unclear so far.

In a fifth part of the work the GTPase FtsZ, which is involved in cell division, and the tricarboxylic acid cycle enzyme isocitrate dehydrogenase were identified as additional *in vitro* substrates of STPKs and FtsZ additionally as *in vivo* substrate of the phosphatase Ppp in *C. glutamicum*. In the case of FtsZ several phosphopeptides as well as one phosphorylation site were identified, whereas this was not possible for isocitrate dehydrogenase up to now. Moreover, the physiological effects of the phosphorylation on the activities of FtsZ and isocitrate dehydrogenase are still unknown.

II Zusammenfassung

Corynebacterium glutamicum wird industriell für die jährliche Produktion von ca. 1,5 Millionen Tonnen des Geschmacksverstärkers L-Glutamat eingesetzt. Bei diesem Prozess spielt die reduzierte Aktivität des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (ODH) eine wichtige Rolle. Vor kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe ein neuartiger Mechanismus zur posttranslationalen Regulation der ODH-Aktivität identifiziert werden. Das 15-kDa OdhI-Protein bindet im unphosphorylierten Zustand mit hoher Affinität an OdhA, die E1-Untereinheit von ODH, und inhibiert die Aktivität des Komplexes. Durch Phosphorylierung von OdhI an Threonin-14 durch die Serin/Threonin-Proteinkinase (STPK) PknG wird die Bindung an OdhA und damit die Hemmung der ODH-Aktivität verhindert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, welche Bedeutung der neue ODH-Regulationsmechanismus für die Glutamat-Produktion hat. Dazu wurde die Glutamat-Bildung des Wildtyps und verschiedener Deletionsmutanten unter vier verschiedenen Bedingungen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie die Glutamat-Exkretion induzieren: Biotin-Mangel, Zugabe von Penicillin G, Zugabe von Tween-40 und Zugabe von Ethambutol. Eine Δ*odhI*-Mutante bildete unter allen getesteten Bedingungen nur noch 1 – 13 % der Glutamat-Konzentration des Wildtyps. Dieser Defekt konnte durch Komplementation der Δ*odhI*-Mutante mit einem *odhI*-Expressionsplasmid größtenteils wieder aufgehoben werden. Somit ist die Anwesenheit des OdhI-Proteins essentiell für eine effiziente Glutamat-Produktion. Bei der Analyse einer Δ*pknG*-Mutante war unter starker Biotin-Limitierung und bei Zugabe von Ethambutol eine deutlich gesteigerte Glutamat-Produktion im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten, bei Zugabe von Tween-40 dagegen nicht. Penicillin G führte zu schlechterem Wachstum der Δ*pknG*-Mutante, aber einer erhöhten spezifischen Glutamat-Produktivität. Im Fall der Δ*pknG*-Mutante ist also der Effekt auf die Glutamat-Bildung abhängig von den Induktionsbedingungen.

Zur *in-vivo*-Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus wurde in dieser Arbeit ein Western-Blot-Assay etabliert, der eine Unterscheidung und halbquantitative Analyse von phosphoryliertem und unphosphoryliertem OdhI erlaubt. Mit Hilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Biotin-Limitierung zu einer verstärkten Dephosphorylierung des OdhI-Proteins führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung von OdhI in einer Mutante gehemmt ist, der das Gen *ppp* für die einzige in *C. glutamicum* annotierte Phospho-Ser/Thr-Proteinphosphatase fehlt. Somit konnte Ppp als die für die Dephosphorylierung von OdhI verantwortliche Phosphatase identifiziert werden.

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass OdhI auch in einer Δ*pknG*-Mutante noch teilweise phosphoryliert vorliegt. In einem dritten Teil dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, welche STPKs außer PknG an der Phosphorylierung von OdhI beteiligt sind. Dazu wurde ein Satz von weiteren Mutanten konstruiert, in denen die vier STPK-Gene einzeln oder in Kombination deletiert wurden. Die Tatsache, dass die Mutanten Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknB*Δ*pknG*, Δ*pknL*Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknL*, Δ*pknB*Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* erhalten wurden, zeigt, dass keine der vier STPKs für *C. glutamicum* essentiell ist. Die einzige Kombination, die letal zu sein scheint, ist eine gemeinsame Deletion von *pknA* und *pknB*. Western-Blot-Analysen

mit den Mutanten ergaben, dass bei Wachstum in BHI-Medium mit Glucose neben PknG primär PknA für die Phosphorylierung von OdhI verantwortlich ist, dass aber auch PknB und PknL geringfügig zur OdhI-Phosphorylierung beitragen. Diese *in-vivo*-Untersuchungen wurden durch *in-vitro*-Experimente unterstützt, die zeigten, dass die isolierten Kinasedomänen von PknA, PknB und PknL gereinigtes OdhI-Protein phosphorylieren. Dabei konnten mittels massenspektrometrischer Analysen Threonin-15 und Serin-46 als weitere Phosphorylierungsstellen im OdhI-Protein identifiziert werden.

In einem vierten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie sich die Deletion der verschiedenen STPK-Gene auf die Ethambutol-induzierte Glutamat-Bildung auswirkt. Es zeigte sich, dass die Mutanten Δ*pknA*, Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* eine ähnlich gesteigerte Glutamat-Bildung aufwiesen wie die Δ*pknG*-Mutante, während die Δ*pknB*- und die Δ*pknL*-Mutante nach 48 h gar kein Glutamat gebildet hatten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die vier STPKs sehr unterschiedliche Einflüsse auf die Glutamat-Produktion haben, deren molekulare Ursachen bisher noch völlig unklar sind.

In einem fünften Teil der Arbeit wurden die in die Zellteilung involvierte GTPase FtsZ und das Tricarbonsäurezyklus-Enzym Isocitrat-Dehydrogenase als weitere *in-vitro*-Substrate für STPKs und FtsZ zusätzlich als *in-vivo*-Substrat für die Phosphatase Ppp in *C. glutamicum* identifiziert. Während im Fall von FtsZ eine Reihe von Phosphopeptiden sowie eine Phosphorylierungsstelle bestimmt werden konnten, gelang dies bei der Isocitrat-Dehydrogenase noch nicht. Ebenso ist bisher der physiologische Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivitäten von FtsZ und Isocitrat-Dehydrogenase noch nicht bekannt.

III Einleitung

1 Die Rolle der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase bei der Glutamat-Produktion mit *Corynebacterium glutamicum*

Im Jahr 1908 entdeckte Kikunae Ikeda, Professor der Tokio-Universität und späterer Gründer der Firma Ajinomoto, Mononatrium-Glutamat als Hauptgeschmackskomponente der traditionell in der japanischen Küche verwendeten Alge *Laminaria japonica* (*kon-bu*), welche heute neben salzig, sauer, süß und bitter als fünfte Geschmacksrichtung (*umami* = *wohlschmeckend*) gilt. Im Jahr 1909 wurde Mononatrium-Glutamat von der Firma Ajinomoto erstmals auf den Markt gebracht, wobei diese Aminosäure noch durch saure Hydrolyse von Weizen, Soja und anderen pflanzlichen oder tierischen Proteinquellen gewonnen wurde. Erst 1956 wurde *Corynebacterium glutamicum* von Kinoshita und Mitarbeitern (Kinoshita *et al*., 1957) in Japan bei der Suche nach Glutamat-produzierenden Bakterien isoliert und charakterisiert. Die mikrobielle Produktion von Aminosäuren hat gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, nur die natürliche L-Form hervorzubringen (Kinoshita, 2005). *C. glutamicum*, damals als *Micrococcus glutamicus* bezeichnet (Udaka, 1960), ist ein Gram-positives, Biotin-auxotrophes und apathogenes Bodenbakterium, welches unter Biotin-limitierenden Kultivierungsbedingungen große Mengen Glutamat sekretieren kann (Shiio *et al*., 1962a, b). Weitere Charakteristika dieses fakultativ anaeroben Bakteriums (Takeno *et al*., 2007; Nishimura *et al*., 2007) sind die stäbchen- bis keulenförmige Zellmorphologie und die Unbeweglichkeit (Abe *et al*., 1967).

Die Gattung *Corynebacterium* wird taxonomisch der Klasse der *Actinobacteria* und dort der Unterordnung der *Corynebacterineae* zugeordnet. Heute wird *C. glutamicum* als Biokatalysator für die großtechnische Produktion von jährlich etwa 1,5 Millionen Tonnen L-Glutamat, aber auch anderer Aminosäuren wie z.B. L-Lysin eingesetzt (Eggeling and Sahm, 1999; Hermann, 2003; Kimura, 2003; Kelle *et al*., 2005; Leuchtenberger *et al*., 2005). Auf Grund dieses wirtschaftlichen Interesses wurde das 3,3 Mbp-große Genom entschlüsselt (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003) und es wurden Transkriptom- und Proteomanalysen etabliert (Wendisch, 2003; Schaffer *et al*., 2001). *C. glutamicum* hat auch auf Grund seiner apathogenen Eigenschaften als Vertreter der *Corynebacterineae* große Bedeutung erlangt als Modellorganismus für die nahverwandten humanpathogenen Spezies wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* oder *Corynebacterium diphtheriae*. Eine Zusammenfassung geben Monographien von Eggeling und Bott (2005) sowie von Burkovski (2008).

Neben Biotin-Mangel sind in der Zwischenzeit auch weitere Kultivierungsbedingungen wie z.B. die Zugabe von β-Laktam Antibiotika wie Penicillin G (Nunheimer *et al*., 1970), die Zugabe von Detergenzien wie Tween-40 (Duperray *et al*., 1992) oder Tween-60 (Takinami *et al*., 1965) oder die Zugabe von Ethambutol (Radmacher *et al*., 2005) bekannt, die zur Ausscheidung von Glutamat ins Medium führen. Des Weiteren kann eine Glutamat-Ausscheidung auch von Glycerin- oder Fettsäure-auxotrophen Stämmen (Kanzaki *et al*., 1967; Okazaki *et al*., 1967; Nakao *et al*., 1972; Kimura *et al*., 1997) oder temperatursensitiven Stämmen, die bei hohen Temperaturen kultiviert werden, erzielt werden (Momose and Takagi, 1978; Delaunay *et al*., 1999). Der molekulare Mechanismus dieser Glutamat-induzierenden Bedingungen ist bis heute jedoch noch größtenteils unverstanden (Eggeling *et al*., 2001; Kimura, 2002). Penicillin G greift in die Synthese des Peptidoglykans der Zellwand ein, indem es die Aktivität von Transpeptidasen hemmt, und Tween-40 beeinflusst als Detergenz vermutlich die Membranpermeabilität. Ethambutol fungiert wiederum als Inhibitor der Arabinosyltransferase Emb, welche für die Arabinogalactan-Synthese der Zellwand benötigt wird (Radmacher *et al*., 2005). Lange Zeit wurde die Glutamat-Sekretion durch das sogenannte „*leak*"-Modell erklärt, bei dem Glutamat durch eine veränderte Membranpermeabilität oder Zellwandzusammensetzung ausgeschleust wird. Später wurde das sogenannte „*carrier-inversion*"-Modell, bei dem Glutamat durch einen mittels veränderter Membranpermeabilität in seiner Aktivität beeinflussten Exporter sekretiert werden soll, als Erklärung herangezogen (Hoischen and Krämer, 1989, 1990; Gutmann *et al*., 1992; Eggeling *et al*., 2001; Nampoothiri *et al*., 2002), doch gibt es bis heute kein einheitliches Modell bzgl. der Rolle der Membranpermeabilität für eine effektive Glutamat-Sekretion unter den verschiedenen Glutamat-induzierenden Bedingungen (Neubeck *et al*., 1993; Bokas *et al*., 2007). In diesem Zusammenhang konnte kürzlich ein putativer Glutamat-Exporter (Cg1434) in *C. glutamicum* identifiziert werden, der eine entscheidende Rolle bei der Glutamat-Sekretion spielt. Eine Deletion des Gens *cg1434* führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der Glutamat-Sekretion (Nakamura *et al*., 2007).

Neue Erkenntnisse erlauben jedoch die Annahme, dass neben der Bedeutung der Zellwand- und Membranbeschaffenheit sowie des Exports von Glutamat metabolische Regulationsprozesse ebenfalls eine große Einflussnahme auf die Glutamat-Produktion haben. Dies wird durch Fluss-Analysen des Metaboloms in *C. glutamicum* Wildtyp-Zellen unterstützt, die unter Biotin-limitierenden Bedingungen kultiviert bzw. mit Tween-40 behandelt wurden (Shimizu *et al*., 2003; Shirai *et al*., 2005) sowie durch Arbeiten mit temperatursensitiven Stämmen (Uy *et al*., 2003), die zeigten, dass der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (ODH) im Tricarbonsäurezyklus von entscheidender Bedeutung für die Glutamat-Produktion ist. Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der ODH-Aktivität

und der Glutamat-Produktion in diesen Arbeiten aufgezeigt werden. In diesem Zusammenhang wird eine um 40 – 60 % erniedrigte Enzymaktivität der ODH unter Biotin-limitierenden Bedingungen, nach Behandlung der Zellen mit Tween-40 oder Penicillin G und bei Verwendung temperatursensitiver Stämme beschrieben (Shiio *et al*., 1961; Shingu and Terui, 1971; Kawahara *et al*., 1997; Uy *et al*., 2005).

Der aus drei Untereinheiten aufgebaute multimere ODH-Komplex katalysiert im Tricarbonsäurezyklus die Umsetzung von 2-Oxoglutarat, NAD^+ und Coenzym A zu Succinyl-CoA, NADH + H^+ und CO_2. OdhA (Usuda *et al*., 1996) wird durch das Gen *cg1280* kodiert und stellt die E1o-Untereinheit (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase) von ODH dar. Die beiden anderen Untereinheiten sind SucB (E2o-Untereinheit, Dihydrolipoamid-Succinyltransferase), kodiert durch das Gen *cg2421* (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003) und Lpd (Schwinde *et al*., 2001) (E3-Untereinheit, Dihydrolipoyl-Dehydrogenase), kodiert durch das Gen *cg0790*. Der ODH-Komplex zeigt eine hohe Affinität zu 2-Oxoglutarat und NAD^+ (K_m-Wert 80 µM bzw. 86 µM) und wird durch Acetyl-CoA aktiviert bzw. durch *cis*-Aconitat, Succinyl-CoA, NADPH, NADH, Pyruvat und Oxalacetat inhibiert (Shiio and Ujigawa-Takeda, 1980; Schwinde *et al*., 2001).

Das Substrat 2-Oxoglutarat wird neben dem ODH-Komplex aber auch noch von der Glutamat-Dehydrogenase (Gdh) (Börmann *et al.*, 1992) genutzt, welche v.a. bei Stickstoff-Überfluss die reversible reduktive Aminierung zu Glutamat katalysiert (vgl. Abb. 3.1).

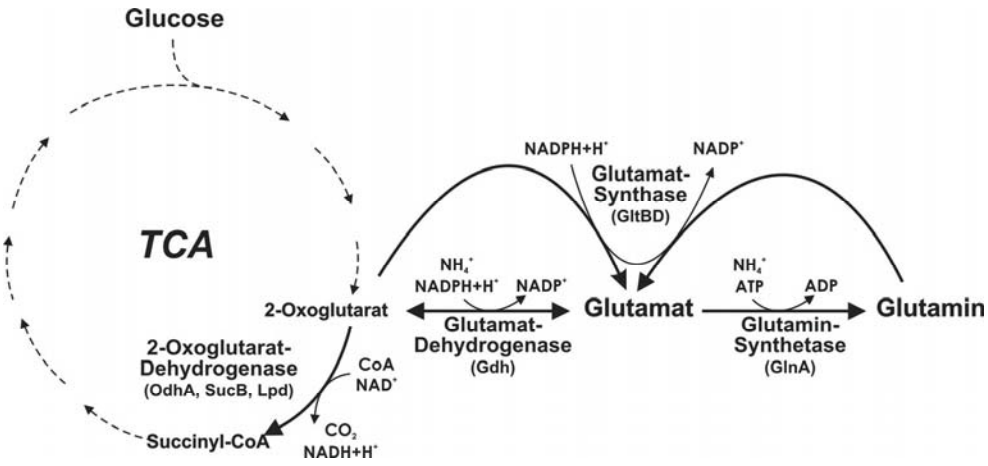


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Reaktion und des Stickstoff-Metabolismus.

Die Gdh hat allerdings als Konkurrenz-Reaktion gegenüber der ODH einen ungefähr 70-mal höheren K_m-Wert für 2-Oxoglutarat (5,7 mM gegenüber 0,08 mM) (Shiio and Ozaki, 1970), so dass eine ODH-Inhibition unter Glutamat-produzierenden Bedingungen verständlich wird. Eine weitere Stickstoff-Assimilation unter v.a. Stickstoff-Mangel (Tesch *et al*., 1998) findet in *C. glutamicum* mittels Glutamin-Synthetase (GlnA) (Jakoby *et al.,* 1997) und Glutamat-Synthase (GltBD) (Beckers *et al.,* 2001; Schulz *et al*., 2001) statt (vgl. Abb. 3.1). Eine Erhöhung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität findet unter Glutamat-induzierenden Bedingungen wie Biotin-Limitation oder nach Zugabe von Tween-40 nicht statt (Shirai *et al*., 2005). Somit gilt der ODH-Komplex als Schlüsselenzym für die Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum* (Asakura *et al*., 2007; Kim *et al*., 2008), da eine reduzierte ODH-Aktivität die Umsetzung von 2-Oxoglutarat zu Glutamat fördert (Shimizu *et al*., 2003; Shirai *et al*., 2005). Es konnte allerdings keine direkte Ursache für die reduzierte ODH-Aktivität in *C. glutamicum* auf molekularer Ebene gefunden werden. Im Jahr 2006 konnten Kataoka *et al*. mittels Transkriptomanalysen Hinweise darauf liefern, dass die Gene *odhA* und *sucB* unter Biotin-Limitation sowie nach Zugabe von Penicillin G weniger stark exprimiert werden, so dass eine transkriptionelle Regulation eine Teilerklärung für die reduzierte ODH-Aktivität unter diesen Bedingungen liefern könnte. Eine derartige Repression von *odhA* und *sucB* konnte nach Tween-40-Zugabe (Kataoka *et al*., 2006) und unter Ethambutol-induzierten Bedingungen allerdings nicht festgestellt werden (Radmacher *et al*., 2005).

2 Posttranslationales Regulationsmodell der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *C. glutamicum*

Die Regulation von Enzymen des Tricarbonsäurezyklus wie der ODH ist für die Adaptation von Bakterien an sich verändernde Umweltbedingungen, insbesondere für die Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen, von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang kann eine Regulation prinzipiell auf allen möglichen Ebenen erfolgen (transkriptional, translational, posttranslational, allosterisch, regulierte Proteolyse, u.s.w.). In *C. glutamicum* sind bisher eine Reihe von Beispielen für eine Regulation auf transkriptionaler Ebene beschrieben (Wendisch, 2006; Bott, 2007). Es gibt jedoch auch einige wenige Beispiele für regulative Prozesse auf posttranslationaler Ebene wie z.B. der Proteinkontrolle durch Proteolyse (Engels *et al.*, 2004, 2005; Strösser *et al.*, 2004).

Im Jahr 2006 konnten Niebisch *et al.* erstmals einen posttranslationalen Regulationsmechanismus des ODH-Komplexes aufdecken, bei dem die beiden Proteine Cg1630 und Cg3046 eine entscheidende Rolle spielen. Cg3046 ist eine Ser-/Thr-Proteinkinase (STPK), die ATP-abhängig Proteine an Serin- oder/und Threoninresten

phosphoryliert und auf Grund von Sequenzvergleichen mit anderen Spezies wie *M. tuberculosis* als PknG bezeichnet wird. Niebisch *et al*. (2006) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine *C. glutamicum* Δ*pknG*-Deletionsmutante einen starken Wachstumsdefekt auf Minimalmedium mit Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle aufweist. Während keine Hinweise für eine defekte Glutamin-Aufnahme erhalten wurden, ergaben Messungen der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen eine zweifach erhöhte Glutamat-Konzentration in der Δ*pknG*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Glutamin-Konzentration war unverändert. Daraus wurde geschlossen, dass die Δ*pknG*-Mutante einen Defekt im Glutamat-Katabolismus hat. Nachfolgende Untersuchungen zur Identifizierung von *in-vivo*-Phosphorylierungssubstraten für PknG offenbarten bei vergleichenden Proteomanalysen zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und der Δ*pknG*-Mutante, wobei beide Stämme zuvor in Glutamin-Medium mit wenig Glucose kultiviert wurden, drei Proteinspots mit unterschiedlicher Intensität, welche in massenspektrometrischen Analysen allesamt als Cg1630 identifiziert werden konnten. Zwei dieser drei Cg1630-Proteinspots zeigten eine für phosphorylierte Proteine typische Verschiebung des pI-Wertes und kamen in der Δ*pknG*-Mutante in deutlich geringerer Quantität vor als im Wildtyp. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte eine PknG-abhängige Phosphorylierung von Cg1630 angenommen werden. Cg1630 (im folgenden als OdhI bezeichnet) ist ein 15-kDa Protein (143 Aminosäuren) mit einer FHA-Domäne (*fork**h**ead-**a**ssociated domain*) von Aminosäureposition 68 – 131. FHA-Domänen können Phosphothreonin-Epitope binden und somit phosphorylierungsabhängig Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Pallen *et al*., 2002). In Verbindung mit weiteren massenspektrometrischen Analysen konnte durch *in-vitro*-Studien mit gereinigten Proteinen gezeigt werden, dass PknG das OdhI-Protein am Threoninrest-14 phosphoryliert.

Um Interaktionspartner für OdhI zu finden, führten Niebisch *et al*. (2006) Coreinigungsexperimente u.a. mit dem Stamm *C. glutamicum* Δ*odhI*/pJC1-*odhI*-T14A durch, wobei das plasmid-kodierte OdhI einen Aminosäureaustausch an genau diesem Threoninrest-14 gegen Alanin aufweist, so dass eine PknG-abhängige OdhI-Phosphorylierung nicht stattfinden kann. Bei diesen Experimenten wurden das *Strep*-„getaggte“ OdhI-T14A-Protein und die E1o-Untereinheit des ODH-Komplexes (OdhA) cogereinigt, wohingegen Coreinigungsexperimente mit dem Stamm *C. glutamicum* Δ*odhI*/pJC1-*odhI*, bei dem OdhI noch durch PknG am Threoninrest-14 phosphoryliert werden kann, nur sehr geringe Mengen an cogereinigtem OdhA ergaben. Daraus wurde geschlossen, dass es eine Interaktion von unphosphoryliertem OdhI und OdhA gibt.

In Enzymaktivitätsmessungen konnte schließlich gezeigt werden, dass unphosphoryliertes OdhI-Protein die ODH-Aktivität in Zellextrakten des *C. glutamicum*-Stammes Δ*pknG*Δ*odhI* konzentrationsabhängig hemmt, wobei eine halbmaximale Inhibition mit ~ 4 nM OdhI erzielt wurde. Diese Hemmung der ODH-Aktivität durch unphosphoryliertes

OdhI konnte auch bei Verwendung von gereinigtem ODH-Komplex nachgewiesen werden. Es konnte hingegen keine ODH-Inhibition mit einem OdhI-Protein erhalten werden, das mit PknG phosphoryliert worden war. Somit wurde Cg1630 nachträglich als OdhI (*oxoglutarate dehydrogenase inhibitor*) bezeichnet (vgl. Abb. 3.2).

Diese posttranslationale Regulation der ODH könnte eine Erklärung für die unter Glutamat-induzierenden Bedingungen gemessene ODH-Aktivitätsreduzierung liefern. Im Kontext der posttranslationalen Regulation des ODH-Komplexes durch OdhI postulierten Niebisch *et al*. (2006) auf Grund ihrer Experimente zusätzlich zur PknG-abhängigen auch noch eine PknG-unabhängige OdhI-Phosphorylierung (siehe unten).

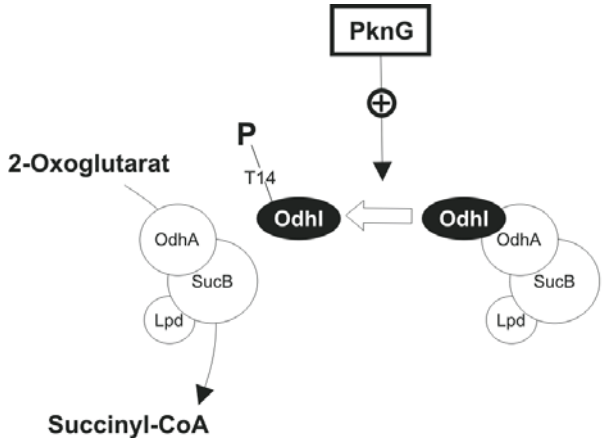


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der posttranslationalen Regulation des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OdhA, SucB, Lpd) durch OdhI und PknG in *C. glutamicum*.

3 Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in *C. glutamicum*

1979 wurde die Isocitrat-Dehydrogenase aus *E. coli* als erstes bakterielles Enzym überhaupt entdeckt, das durch eine Serinphosphorylierung reguliert wird (Garnak and Reeves, 1979a, b; LaPorte, 1993). In *E. coli* wird die Isocitrat-Dehydrogenase durch das bifunktionelle Enzym Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase AceK, welches allerdings nicht zur Klasse der Ser-/Threonin-Proteinkinasen (STPKs) zu zählen ist, am Serinrest-113 phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung dieses Serinrestes zur Inaktivierung des Enzyms führt. Lange Zeit wurden STPKs als spezifisch für Eukaryonten angesehen, die dort das Rückgrat von Signaltransduktionswegen zur Verarbeitung extrazellulärer in intrazelluläre Signale darstellen (Hunter, 2000). Mittlerweile sind neben den klassischen Zweikomponenten-Systemen (Stock

et al., 1989) aber auch STPKs in Prokaryonten wie z.B. *M. tuberculosis* (Av-Gay and Everett, 2000; Kennelly, 2002; Krupa and Srinivasan, 2005; Narayan *et al*., 2007; Wehenkel *et al*., 2008) beschrieben.

In *C. glutamicum* sind neben PknG noch drei weitere Gene annotiert, die im Gegensatz zur cytosolischen Ser-/Thr-Proteinkinase PknG für membranintegrale STPKs kodieren. Bei diesen noch nicht näher charakterisierten Proteinen handelt es sich um PknA (Cg0059; 50,4 kDa), PknB (Cg0057; 68,2 kDa) und PknL (Cg2388; 78,9 kDa) (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003).

In *M. tuberculosis* wurden die homologen Proteine PknA (Chaba *et al*., 2002), PknB (Av-Gay *et al*., 1999), PknG (Koul *et al*., 2001; Walburger *et al*., 2004; Cowley *et al*., 2004; Nguyen *et al*., 2005; Scherr *et al*., 2007) und PknL (Lakshminarayan *et al*., 2008) hingegen schon relativ intensiv biochemisch sowie strukturell charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Kinaseaktivitäten bei PknA, PknB, PknG und PknL entweder durch Autophosphorylierung (Boitel *et al*., 2003; Cowley *et al*., 2004; Durán *et al*., 2005; Molle *et al*., 2006a; Lakshminarayan *et al*., 2008; Thakur *et al*., 2008; Canova *et al*., 2008a) oder wie bei PknB durch eine Konformationsänderung wie eine Dimerisierung (Young *et al*., 2003; Ortiz-Lombardía *et al*., 2003; Wehenkel *et al*., 2006) reguliert werden kann.

Des Weiteren konnten in *M. tuberculosis* im Gegensatz zu *C. glutamicum* bereits einige endogene Substrate der STPKs identifiziert werden. Darunter fallen z.B. ein putativer ABC-Transporter (Rv1747) (Grundner *et al*., 2005); ein Protein noch unbekannter Funktion (Rv1422) und das Zellteilungsprotein Wag31 (Kang *et al*., 2005); die in die Mykolsäure-Biosynthese involvierten FabD, KasA und KasB des Fettsäure-Synthase-Systems FAS-II (Molle *et al*., 2006b); ein für die Arabinogalactan-Biosynthese zuständiger Transkriptionsregulator namens EmbR (Molle *et al*., 2003b; Sharma *et al*., 2006), verschiedene Sigma-, Anti-Sigma- und Anti-Anti-Sigma-Faktoren (Greenstein *et al*., 2007b; Park *et al*., 2008) und das in die Peptidoglykan-Biosynthese involvierte MurD (Thakur and Chakraborti, 2008). In *M. tuberculosis* sowie anderen Spezies spielen diese Substrate in nahezu allen Bereichen des bakteriellen Lebens eine wichtige Rolle, v.a. aber bei Zellteilung, Pathogenität und Stressantwort. Darüber hinaus sind die Genprodukte von *pknA* und *pknB* in *M. tuberculosis* essentiell (Sassetti *et al*., 2003; Kang *et al*., 2005; Fernandez *et al*., 2006).

Die zur Proteinphosphorylierung reverse Reaktion, die Dephosphorylierung von Serin- und Threoninresten, wird in *M. tuberculosis* durch die Phospho-Ser-/Thr-Proteinphosphatase (STPP) Rv0018c (Chopra *et al*., 2003; Boitel *et al*., 2003; Sharma *et al*., 2006; Dasgupta *et al*., 2006; Molle *et al*., 2006b) vollzogen. In *C. glutamicum* ist analog dazu eine ebenfalls noch nicht näher charakterisierte Phospho-Ser-/Thr-Proteinphosphatase annotiert, kodiert durch das Gen *cg0062* (*ppp*) (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003).

Die Lokalisation der Gene für die STPKs und die STPP im Chromosom von *C. glutamicum* sind in Abb. 3.3 schematisch dargestellt. Die Gene *ppp* (1353 bp), *pknA* (1407 bp) und *pknB* (1938 bp) sind in einem putativen Operon mit *rodA* (*cg0061*) und *pbpA* (*cg0060*) lokalisiert, die für Proteine der Zellteilungsmaschinerie kodieren. Zusätzlich in diesem Operon befinden sich die Gene *cg0055*, welches für ein hypothetisches Membranprotein kodiert, sowie *cg0064* und *cg0063*, die für membrangebundene Proteine mit FHA-Domänen kodieren. In *M. tuberculosis* wird PbpA (Rv0016c) von PknB (Dasgupta *et al*., 2006) und Rv0020c (homolog zu Cg0064) u.a. von PknB phosphoryliert (Grundner *et al*., 2005). Das Gen *pknG* (2466 bp) ist in einem putativen Operon mit *glnX*, einem hypothetischen Membranprotein mit vier Transmembranhelices (*cg3044*) und *glnH*, einem putativen periplasmatischen Glutamin-bindenden Lipoprotein (*cg3045*), lokalisiert (Niebisch *et al*., 2006). Das *pknL*-Gen (2220 bp) ist mit zwei hypothetischen Membranprotein-kodierenden Genen (*cg2389* und *cg2390*) in einem putativen Operon lokalisiert. *pknL* liegt darüber hinaus divergent zu einem putativen Transkriptionsregulator (*cg2386*) und zum sogenannten *dcw*-Cluster (*division cell wall*), welches die Gene *cg2360 – cg2378* umfasst (in Abb. 3.3 nicht dargestellt). Die Gene dieses *dcw*-Clusters kodieren hauptsächlich für Zellteilungsproteine (Letek *et al*., 2008). In diesem Zusammenhang konnte bereits die Phosphorylierung des in der Nachbarschaft kodierten putativen Transkriptionsregulators Rv2175c und von FtsZ (Rv2150c), welches im *dcw*-Cluster lokalisiert ist, in *M. tuberculosis* gezeigt werden (Canova *et al*., 2008a; Thakur and Chakraborti, 2006).

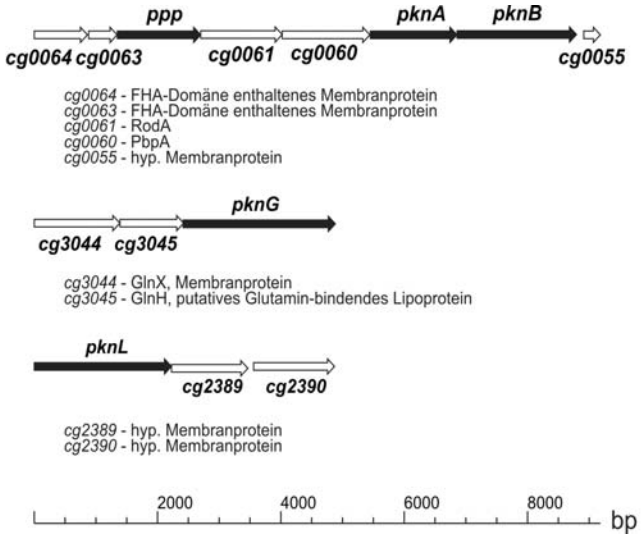


Abbildung 3.3: Physikalische Karten der Genbereiche von *ppp*, *pknA*, *pknB*, *pknG* und *pknL* in *C. glutamicum*.

Neben der PknG-abhängigen OdhI-Phosphorylierung postulierten Niebisch *et al*. (2006) die Involvierung mindestens einer weiteren Ser-/Thr-Proteinkinase in die OdhI-Phosphorylierung, da bei den Proteomanalysen in der Δ*pknG*-Mutante immer noch eine einfach-phosphorylierte OdhI-Form detektierbar war. In der phylogenetisch nahverwandten Spezies *M. tuberculosis* konnte bereits gezeigt werden, dass PknB *in vitro* das zu OdhI homologe Protein GarA (69 %-ige Sequenzidentität) am Threoninrest-22 phosphoryliert (Villarino *et al*., 2005), wobei dieser Threoninrest dem Threoninrest-15 im OdhI-Protein entspricht. GarA kann aber *in vitro* darüber hinaus auch von PknD, PknE und PknF phosphoryliert werden, so dass eine multiple Regulation durch mehrere Ser-/Thr-Proteinkinasen angenommen wird (Villarino *et al*., 2005). GarA (*glycogen accumulation regulator*) wurde erstmals in *Mycobacterium. smegmatis* beschrieben (Belanger and Hatfull, 1999). In *M. smegmatis* supprimiert die Überexpression von GarA den Temperatur-sensitiven Phänotyp einer *glgE*-Mutante. Das Gen *glgE* kodiert für eine Glukanase und eine *glgE*-Mutante weist eine erhöhte intrazelluläre Glykogenmenge bei 42 °C auf. GarA konnte jedoch in diesem Zusammenhang bisher noch keine eindeutige Funktion im Glykogen-Stoffwechsel zugeordnet werden.

Da in *M. tuberculosis* keine 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tian *et al*., 2005a, b), gibt es Indizien auf einen nicht-funktionellen ODH-Komplex. In *M. tuberculosis* wurde statt der Umsetzung von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA die Umsetzung von 2-Oxoglutarat zu Succinatsemialdehyd durch die 2-Oxoglutarat-Decarboxylase-Aktivität des zu OdhA homologen Proteins SucA (E1o-Untereinheit) beschrieben. Im Anschluss wird Succinatsemialdehyd durch eine Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase (GabD1/GabD2) zu Succinat umgesetzt (Tian *et al*., 2005a, b). Auf Grund der hohen Sequenzidentität (59 %) von *C. glutamicum*-OdhA und *M. tuberculosis*-SucA ist es wahrscheinlich, dass GarA mit SucA wechselwirken kann und einen Einfluss auf die 2-Oxoglutarat-Decarboxylase-Aktivität des Enzyms hat, so dass die in *C. glutamicum* gewonnenen Erkenntnisse auch einen großen Nutzen für andere Spezies wie z.B. *M. tuberculosis* haben könnten.

Das Thema der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das posttranslationale Regulationsmodell der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase v.a. im Hinblick auf die Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum* weiter charakterisiert werden.

Im ersten Teil sollte der Einfluss einer *odhI*- und einer *pknG*-Deletion auf die Glutamat-Produktion unter vier verschiedenen Kultivierungsbedingungen (Biotin-Limitation bzw. Zugabe von Tween-40, Penicillin G und Ethambutol) analysiert werden.

In einem weiteren Teil sollte der OdhI-Phosphorylierungsstatus mittels Anti-OdhI-Antikörper im Western-Blot auf Grund unterschiedlicher apparenter Massen von phosphoryliertem und unphosphoryliertem OdhI im Polyacrylamidgel in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht werden.

Im dritten Teil sollten für *in-vivo*-Experimente weitere Ser-/Thr-Proteinkinase-Deletionsmutanten konstruiert und für *in-vitro*-Experimente die löslichen Kinasedomänen von PknA, PknB und PknL aufgereinigt werden, um ihre Rolle bei der OdhI-Phosphorylierung zu untersuchen. Im Anschluss daran sollte mittels massenspektrometrischer Analysen die PknG-unabhängige(n) OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) bestimmt werden.

In einem vierten Teil sollte untersucht werden, wie sich die Deletion von *pknA*, *pknB* und *pknL* auf die mit Ethambutol-induzierte Glutamat-Produktion auswirkt.

In einem letzten Teil sollte durch vergleichende Proteomanalysen zwischen dem Wildtyp-Stamm und einer Δ*ppp*-Mutante versucht werden, weitere Ser-/Thr-Proteinkinase-Substrate in *C. glutamicum* zu identifizieren.

IV Material und Methoden

1 Pufferlösungen, Antibiotika und andere Stammlösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt.

Ampicillin:	100 mg ml^{-1} (sterilfiltriert)
ATP:	20 mM
Biotin:	200 mg l^{-1} (sterilfiltriert)
Calciumchlorid:	10 g l^{-1} (sterilfiltriert)
Chloramphenicol:	10 mg ml^{-1} (sterilfiltriert)
Glucose:	50 % (w/v) (autoklaviert), 2,78 M (550 g l^{-1} Glucose · H_2O)
Kanamycin:	50 mg ml^{-1} (sterilfiltriert)
Kinase-Puffer:	25 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,5
KP-Puffer:	50 mM KH_2PO_4, 50 mM K_2HPO_4, pH 6,5
PBS-Puffer:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4
PBST-Puffer:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4, 0,05 % Tween-20
Puffer E:	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM Desthiobiotin, pH 8,0
Puffer E^+:	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM Desthiobiotin, 0,1 % (w/v) Dodecylmaltosid, pH 8,0
Puffer R:	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM HABA, pH 8,0
Puffer W:	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0
Puffer W^+:	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Dodecylmaltosid, pH 8,0
SDS:	10 % (w/v)
“Strip”-Puffer:	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM Na_2EDTA, pH 7,9
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA, pH 8,0
TNIx-Puffer:	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, x mM Imidazol, pH 7,9
6 x SDS-Ladepuffer:	350 mM Tris-HCl, 10 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,175 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
50 x TAE-Puffer:	37,2 g l^{-1} Na_2EDTA · 2 H_2O, 242 g l^{-1} Tris, mit Eisessig pH 8,5 einstellen

2 Nährmedien

BHI-Medium: 37 g l^{-1} Brain Heart Infusion-Medium (Difco)

BHIS-Medium: 37 g l^{-1} Brain Heart Infusion-Medium (Difco) und 182 g l^{-1} Sorbitol (Merck) (separat autoklaviert)

CGXII-Medium: 20 g l^{-1} $(NH_4)_2SO_4$ (Merck), 5 g l^{-1} Harnstoff (Merck), 1 g l^{-1} KH_2PO_4 (Merck), 1 g l^{-1} K_2HPO_4 (Merck), 0,25 g l^{-1} $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (Merck), 13,3 mg l^{-1} $CaCl_2$ (Merck), 42 g l^{-1} MOPS (Roth), pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml l^{-1} Biotin (0,2 g l^{-1}) (Merck), 1 ml l^{-1} Protokatechusäure (30 g l^{-1} in 1 M NaOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml l^{-1} Spurensalzlösung und 40 g l^{-1} Glucose (222 mM; Merck) zugeben

Glutamin-Medium: 1 g l^{-1} KH_2PO_4 (Merck), 1 g l^{-1} K_2HPO_4 (Merck), 0,25 g l^{-1} $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (Merck), 13,3 mg l^{-1} $CaCl_2$ (Merck), 42 g l^{-1} MOPS (Roth), pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml l^{-1} Biotin (0,2 g l^{-1}) (Merck), 1 ml l^{-1} Protokatechusäure (30 g l^{-1} in 1 M NaOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml l^{-1} Spurensalzlösung und 14,6 g l^{-1} L-Glutamin (100 mM; Sigma) zugeben

LB-Medium: 10 g l^{-1} Trypton (Difco), 5 g l^{-1} Hefeextrakt (Difco), 10 g l^{-1} NaCl (Merck)

SOC-Medium: 20 g l^{-1} Trypton (Difco), 5 g l^{-1} Hefeextrakt (Difco), 0,6 g l^{-1} NaCl (Merck), 0,2 g l^{-1} KCl (Merck), nach dem Autoklavieren 1 g l^{-1} $MgCl_2$ (Merck) (sterilfiltriert) und 4 g l^{-1} Glucose (Merck) (separat autoklaviert) zugeben

Spurensalzlösung: 10 g l^{-1} $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (Merck), 10 g l^{-1} $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Merck), 1 g l^{-1} $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (Merck), 0,2 g l^{-1} $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (Merck), 20 mg l^{-1} $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (Merck), zum Lösen mit HCl ansäuern (pH 1)

Für entsprechende Nährböden wurde den Medien 15 g l^{-1} Agar-Agar (Difco) zugesetzt. Wenn erforderlich wurde den Nährmedien Kanamycin zu einer Endkonzentration von 50 µg ml^{-1} (*E. coli*) oder 25 µg ml^{-1} (*C. glutamicum*), Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg ml^{-1} (*E. coli*) und Chloramphenicol zu einer Endkonzentration von 25 µg ml^{-1} (*E. coli*) zugesetzt.

3 Oligonukleotide

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Die *Strep*Tag-II Sequenz ist kursiv und gegen Alanin ausgetauschte Serin- oder Threoninreste im *odhI*-Gen fett dargestellt. Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies oder MWG Biotech bezogen.

Name	**Sequenz (5´ → 3´)**	**Restriktions-endonuklease**
Primer zur Konstruktion von pET28b-*odhI*		
OdhI-NdeI	ACTGCATATGAGCGACAACAACGGCACC	NdeI
OdhI-NheI	ACTGGCTAGCTTACTCAGCAGGGCCTGCGAG	NheI
Primer zur Konstruktion von pK18*mob*-*odhI*-Strep		
OdhI-EcoRI	ACTGGAATTCATGAGCGACAACAACGGCAC	EcoRI
OdhI-Strep-KpnI	ACTGGGTACCTTA*CTTCTCGAACTGTGGGTGGGACCA* AGCTGCCTCAGCAGGGCCTGCGAGGA	KpnI
Primer zur Überprüfung der Integration von pK18*mob*-*odhI*-Strep		
OdhI-for	AACCTTCCTGCAGGATCTGC	
pK18mob-rev	CAGTCTAGCTATCGCCATGT	
Primer zur Überprüfung der Deletion von Δ*pknA*		
Δ*pknA*-4	TGAGCATGCGGAGGTTTGAGTCATGGC	SphI
Δ*pknA*-for	GGAAGCCTCAGAGCGCAATAC	
Δ*pknA*-rev2	CGACCACACCGAGAGAATAA	
Primer zur Überprüfung der Deletion von Δ*pknB*		
Δ*pknB*-1	TGAGCATGCTGTGCGCCTTGGCAAGCG	SphI
Δ*pknB*-for	AACTGCCAAACGAGAGTGCC	
Δ*pknB*-rev2	ACATCGTCGAAGAAGCCAGC	
Primer zur Überprüfung der Deletion von Δ*pknG*		
Δ*pknG*-for	GCTGCGCGGTTTTGAAGTGG	
Δ*pknG*-rev	GATCGATCCAGAGCGTAACGC	
Δ*pknG*-rev2	GAAGTTGTAGGCCTTCACGA	
Primer zur Überprüfung der Deletion von Δ*pknL*		
Δ*pknL*-for	CATCGTTACGGTGATCATCG	
Δ*pknL*-rev	GGATGCTAATGGATGGTCGG	
Δ*pknL*-rev2	GTGAGCAGCTCAAAGAGCAC	
Primer zur Konstruktion von pET16b-*pknA*-KD		
PknA-NdeI	ATGCCATATGAGTCAAGAAGACATCAC	NdeI
PknA-XhoI	ATGCCTCGAGCGGGCGCTTGCCAAGGCGCA	XhoI
Primer zur Konstruktion von pET16b-*pknB*-KD		
PknB-NdeI	ATGCCATATGGTGACCTTCGTGATCGCTGA	NdeI
PknB-XhoI	ATGCCTCGAGTGCGGCATGGGAGACTGCAT	XhoI

Primer zur Konstruktion von pET16b-*pknG*-KD		
PknG-NdeI	ATGCCATATGAAGGATAATGAAGATTT	NdeI
PknG-XhoI	ATGCCTCGAGTACTTCGGGTGCTTGGAATC	XhoI
Primer zur Konstruktion von pET16b-*pknL*-KD		
PknL-NdeI	ATGCCATATGGCAAACTTGAAGGTCGG	NdeI
PknL-XhoI	ATGCCTCGAGAACCGGCACAGGGACCCGGA	XhoI
Primer zur Mutagenese von *odhI*		
OdhI-S2A-for	CGAGGGCAAAAAATG**GCC**GACAACAACGGCACC	
OdhI-S2A-rev	GGTGCCGTTGTTGTC**GGC**CATTTTTTGCCCTCG	
OdhI-T7A-for	GAGCGACAACAACGGC**GCC**CCGGAGCCACAGGTCG	
OdhI-T7A-rev	CGACCTGTGGCTCCGG**GGC**GCCGTTGTTGTCGCTC	
OdhI-S16A-for_2	CAGGTCGAGGCCGCC**GCC**GTATTCCGCGCTGATC	
OdhI-S16A-rev_2	GATCAGCGCGGAATAC**GGC**GGCGGCCTCGACCTG	
OdhI-T7A-for_2	GGCCGACAACAACGGC**GCC**CCGGAGCCACAGGTCG	
OdhI-T7A-rev_2	CGACCTGTGGCTCCGG**GGC**GCCGTTGTTGTCGGCC	
Primer für Sequenzierungen		
M13-for	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC	
M13-rev	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	
pET-Promotor	CGAAAT TAATACGACTCACTATAGG	
pET-Terminator	TATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTG	
pAN3K-for	CTCCCTATCAGTGATAGAGA	
pAN3K-rev	CGCCATTTTTCACTTCACAG	

4 Bakterienstämme

Tabelle 4.2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
C. glutamicum		
ATCC 13032	Wildtyp-Stamm, Biotin-auxotroph	Abe *et al.*, 1967
ATCC 13032:: pK18*mob-odhI*$_{Strep}$	Derivat von ATCC 13032 zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von chromosomal-exprimiertem OdhI$_{Strep}$ mittles *Strep*Tactin-Sepharose, am *odhI*-Genlocus liegt das Plasmid pK18*mob-odhI*-Strep integriert vor	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ*ppp*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame"-Deletion des *ppp*-Gens (*cg0062*)	Schultz *et al.*, 2007
ATCC 13032 Δ*odhI*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame"-Deletion des *odhI*-Gens (*cg1630*)	Niebisch *et al.*, 2006

ATCC 13032 Δ*pknA*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknA*-Gens (*cg0059*)	Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten
ATCC 13032 Δ*pknB*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknB*-Gens (*cg0057*)	Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten
ATCC 13032 Δ*pknG*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknG*-Gens (*cg3046*)	Niebisch *et al*., 2006
ATCC 13032 Δ*pknL*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknL*-Gens (*cg2388*)	Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten
ATCC 13032 Δ*pknG*Δ*odhI*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknG*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *odhI*-Gens	Niebisch *et al*., 2006
ATCC 13032 Δ*pknA*Δ*pknL*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknA*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknL*-Gens	Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten
ATCC 13032 Δ*pknB*Δ*pknL*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknB*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknL*-Gens	Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten
ATCC 13032 Δ*pknA*Δ*pknG*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknA*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknG*-Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ*pknB*Δ*pknG*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknB*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknG*-Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ*pknL*Δ*pknG*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknL*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknG*-Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknA*Δ*pknL*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknG*-Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*	Derivat von ATCC 13032 Δ*pknB*Δ*pknL*, enthält eine „in-frame“-Deletion des *pknG*-Gens	Diese Arbeit
ATCC 13032 Δ*odhA*	Derivat von ATCC 13032, enthält eine „in-frame“-Deletion des *odhA*-Gens (*cg1280*)	Hoffelder, unveröffentlichte Daten
E. coli		
DH5α	F^- *supE44* Δ*lacU169* (Φ80*lacZ*ΔM15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*; Stamm für Klonierungen	Invitrogen
BL21(DE3)	F^- *ompT* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ *gal dcm* (λclts857 *ind1* Sam7 *nin5 lacUV5*-T7 gene 1); Wirtsstamm für die Überproduktion der pET-kodierten rekombinanten Proteine; enthält den lysogenen Phagen λDE3, der das T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors trägt	Studier and Moffatt, 1986

BL21(DE3)/pLysS	Derivat von BL21(DE3), beinhaltet zusätzlich das Plasmid pLysS, welches für das T7-Lysozym kodiert (Cam^R)	Studier and Moffatt, 1986
BB1553	MC4100 Δ*dnaK::cat sidB1* (Cam^R)	Tomoyasu *et al.*, 2001

5 Plasmide

Tabelle 4.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevante Charakteristika	Herkunft/Referenz
pK18*mob*	Kan^R; mobilisierbarer *E. coli*-Vektor für die Konstruktion von Insertionsmutanten von *C. glutamicum.*	Schäfer *et al*., 1994
pK18*mob*-*odhI*-Strep	Kan^R; Derivat von pK18*mob* zur chromosomalen Synthese von $OdhI_{Strep}$ aus *C. glutamicum*, enthält in den EcoRI- und KpnI-Schnittstellen ein 476-bp-Fragment des *odhI*-Gens, wobei das native Stopcodon durch eine *Strep*Tag-II-kodierende Sequenz und ein anschließendes artifizielles Stopcodon ersetzt wurde.	Diese Arbeit
pK19*mobsacB*-Δ*pknG*	Kan^R; pK19*mobsacB*-Derivat zur Deletion des *pknG*-Gens in *C. glutamicum*, enthält ein 1135-bp-PCR-Fragment, das die *pknG* flankierenden Bereiche umfasst und mittels der eingeführten SalI- und XbaI-Schnittstellen kloniert wurde.	Niebisch *et al*., 2006
pET16b	Amp^R; P_{T7}, *lacI*, *oriV* aus pBR322, Vektor zur IPTG-induzierbaren Überexpression von Genen in *E. coli*, der das Anfügen eines N-terminalen „Tags“ aus 10 Histidin-Resten ermöglicht.	Novagen
pET16b-*pknA*-KD	Amp^R; Derivat von pET16b für die heterologe Überproduktion eines PknA-Derivates von Aminosäure 1 – 287 aus *C. glutamicum*, das am N-Terminus 21 zusätzliche Aminosäurereste (MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRH) enthält; kloniert wurde ein 878-bp-Fragment von *pknA* in die NdeI- und XhoI-Schnittstellen des Vektors.	Diese Arbeit
pET16b-*pknB*-KD	Amp^R; Derivat von pET16b für die heterologe Überproduktion eines PknB-Derivates von Aminosäure 1 – 287 aus *C. glutamicum*, das am N-Terminus 21 zusätzliche Aminosäurereste (MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRH) enthält; kloniert wurde ein 878-bp-Fragment von *pknB* in die NdeI- und XhoI-Schnittstellen des Vektors.	Diese Arbeit

pET16b-*pknG*-KD	Amp^R; Derivat von pET16b für die heterologe Überproduktion eines PknG-Derivates von Aminosäure 1 – 342 aus *C. glutamicum*, das am N-Terminus 21 zusätzliche Aminosäurereste (MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRH) enthält; kloniert wurde ein 1043-bp-Fragment von *pknG* in die NdeI- und XhoI-Schnittstellen des Vektors.	Diese Arbeit
pET16b-*pknL*-KD	Amp^R; Derivat von pET16b für die heterologe Überproduktion eines PknL-Derivates von Aminosäure 1 – 287 aus *C. glutamicum*, das am N-Terminus 21 zusätzliche Aminosäurereste (MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRH) enthält; kloniert wurde ein 878-bp-Fragment von *pknL* in die NdeI- und XhoI-Schnittstellen des Vektors.	Diese Arbeit
pET28b	Kan^R; P_{T7}, *lacI*, *oriV* aus pBR322, Vektor zur IPTG-induzierbaren Überexpression von Genen in *E. coli*, der das Anfügen eines N-terminalen „Tags“ aus 6 Histidin-Resten ermöglicht.	Novagen
pET28b-*odhI*	Kan^R; Derivat von pET28b für die heterologe Überproduktion von OdhI aus *C. glutamicum*, das am N-Terminus 20 zusätzliche Aminosäurereste (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH) enthält; kloniert wurde ein 449-bp-Fragment von *odhI* in die NdeI- und NheI-Schnittstellen des Vektors.	Diese Arbeit
pJC1-*odhI*	Kan^R; Derivat des *E. coli-C. glutamicum* „shuttle“-Vektors pJC1 (Kopienzahl 10 – 30) zur Synthese von OdhI aus *C. glutamicum*, das am C-Terminus eine zusätzliche *Strep*Tag-II-Sequenz (WSHPQFEK) enthält; kloniert wurde ein 609-bp-Fragment von *odhI* inklusive der nativen *odhI*-Promotorsequenz (-137 bis +1 in Bezug auf das ATG-Startcodon) in die BamHI-Schnittstelle des Vektors.	Niebisch *et al*., 2006
pAN3K-*odhI*	Kan^R; Derivat des *E. coli*-Expressionsvektors pASK-IBA3C (IBA, Göttingen, Deutschland), in den eine Kanamycin-Kassette sowie ein Gen für die Replikation in *C. glutamicum* aus dem Vektor pJC1 eingebracht wurde; enthält einen mit Anhydrotetracyclin induzierbaren *tetA*-Promotor und ermöglicht die Überproduktion von rekombinanten Proteinen mit einem C-terminalen *Strep*Tag-II (WSHPQFEK); erlaubt die Überproduktion von OdhI aus *C. glutamicum*; kloniert wurde ein 460-bp-Fragment von *odhI* in die BsmBI-Schnittstelle des Vektors.	Niebisch *et al*., 2006
pAN3K-*odhI*-T14A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*; kodiert für OdhI-T14A	Niebisch *et al*., 2006
pAN3K-*odhI*-T15A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*; kodiert für OdhI-T15A	Niebisch *et al*., 2006
pAN3K-*odhI*-T14A/T15A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*; kodiert für OdhI-T14A/T15A	Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten
pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-T14A/T15A; kodiert für OdhI-S2A/T14A/T15A	Diese Arbeit

pAN3K-*odhI*-T7A/ T14A/T15A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-T14A/T15A; kodiert für OdhI-T7A/T14A/T15A	Diese Arbeit
pAN3K-*odhI*-T14A/ T15A/S16A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-T14A/T15A; kodiert für OdhI-T14A/T15A/S16A	Diese Arbeit
pAN3K-*odhI*-S2A/ T7A/T14A/T15A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A; kodiert für OdhI-S2A/T7A/T14A/T15A	Diese Arbeit
pAN3K-*odhI*-S2A/ T14A/T15A/S16A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A; kodiert für OdhI-S2A/T14A/T15A/S16A	Diese Arbeit
pAN3K-*odhI*-T7A/ T14A/T15A/S16A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-T7A/T14A/T15A; kodiert für OdhI-T7A/T14A/T15A/S16A	Diese Arbeit
pAN3K-*odhI*-S2A/ T7A/T14A/T15A/S16A	Kan^R; Derivat von pAN3K-*odhI*-S2A/T7A/T14A/T15A; kodiert für OdhI-S2A/T7A/T14A/T15A/S16A	Diese Arbeit

5.1 Konstruktion des Plasmids pET28b-*odhI*

Für die heterologe Überproduktion von OdhI inklusive eines aminoterminalen Hexahistidin-„Tags“ zur affinitätschromatographischen Reinigung mittels Ni^{2+}-NTA-Agarose wurde das Plasmid pET28b-*odhI* konstruiert (vgl. Abb. A5.1). Ein 449-bp-DNA-Fragment des vollständigen *odhI*-Gens wurde durch PCR mit den Primern OdhI-NdeI/OdhI-NheI sowie chromosomaler *C. glutamicum* ATCC 13032-DNA als Matrize erhalten. Nach Verdau des DNA-Fragmentes mit NdeI und NheI wurde es in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pET28b kloniert und auf Fehlerfreiheit mittels DNA-Sequenzierung und den Primern pET-Promotor/pET-Terminator hin überprüft. Das von pET28b-*odhI* kodierte Protein $OdhI_{His}$ (17,5 kDa) enthält am aminoterminalen Ende 20 zusätzliche Aminosäure-Reste (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH) einschließlich einer Schnittstelle für die Endoproteinase Thrombin (LVPRGS). Die Expression des *odhI*-Gens steht im pET-Vektor unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der nicht von der *E. coli*-RNA-Polymerase, sondern von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Daher erfolgte die Expression im *E. coli*-Stamm BL21(DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors trägt. Die Induktion der Zielgenexpression wird durch Zugabe von Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG) erreicht, welches an den Repressor LacI bindet, der daraufhin vom Operator dissoziiert und die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens freigibt. Ein weiterer *lac*-Operator befindet sich auf dem pET28b-Vektor stromabwärts des T7-Promotors. Dadurch wird die Basalexpression des Zielgens noch stärker inhibiert.

5.2 Konstruktion des Plasmids pK18*mob*-*odhI*-Strep

Für die affinitätschromatographischen Coreinigungsexperimente mit dem Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob*-*odhI*$_{Strep}$ wurde das Plasmid pK18*mob*-*odhI*-Strep konstruiert (vgl. Abb. A5.6). Ein 476-bp-DNA-Fragment des *odhI*-Gens (ohne Stopcodon) wurde durch PCR mit den Primern OdhI-EcoRI/OdhI-Strep-KpnI sowie chromosomaler *C. glutamicum* ATCC 13032-DNA als Matrize erhalten. Der Primer OdhI-Strep-KpnI beinhaltet die *Strep*Tag-II-kodierende DNA-Sequenz (WSHPQFEK). Nach Verdau des DNA-Fragmentes mit EcoRI und KpnI wurde es in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pK18*mob* kloniert und auf Fehlerfreiheit mittels DNA-Sequenzierung und den Primern M13-for/M13-rev hin überprüft. Der Vektor pK18*mob* ist in *C. glutamicum* nicht frei replizierbar. Nach einer Transformation von *C. glutamicum* mit dem Plasmid pK18*mob*-*odhI*-Strep tragen somit nur kanamycin-resistente Zellen dieses Plasmid auf Grund von homologer Rekombination am *odhI*-Genlocus integriert. *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob*-*odhI*$_{Strep}$ kodiert für ein OdhI-Protein inklusive einer carboxyterminalen *Strep*Tag-II-Sequenz, so dass eine affinitätschromatographische Reinigung mittels *Strep*Tactin-Sepharose erfolgen kann.

5.3 Konstruktion der Plasmide pET16b-*pknA*-KD, pET16b-*pknB*-KD, pET16b-*pknG*-KD und pET16b-*pknL*-KD

Zur heterologen Überproduktion der aminoterminalen cytoplasmatisch lokalisierten Kinasedomänen von PknA (Aminosäuren 20 – 281), PknB (Aminosäuren 9 – 275), PknG (Aminosäuren 175 – 342) und von PknL (Aminosäuren 14 – 272) wurde der Vektor pET16b verwendet, der die Modifikation des Zielproteins mit einem aminoterminalen Decahistidin-„Tag“ erlaubt. Zu diesem Zweck wurden 878-bp-DNA-Fragmente der Gene *pknA*, *pknB* und *pknL* bzw. ein 1043-bp-DNA-Fragment von *pknG* durch PCR mit den Primern PknA-NdeI/PknA-XhoI, PknB-NdeI/PknB-XhoI, PknL-NdeI/PknL-XhoI bzw. PknG-NdeI/PknG-XhoI sowie chromosomaler *C. glutamicum* ATCC 13032-DNA als Matrize erhalten. Diese amplifizierten DNA-Sequenzen kodieren für die Aminosäuren 1 – 287 der Gene *pknA*, *pknB* bzw. *pknL* bzw. für die Aminosäuren 1 – 342 des Gens *pknG*. Nach Verdau dieser DNA-Fragmente mit NdeI und XhoI wurden diese in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pET16b kloniert. Die Sequenzierung der erhaltenen Plasmide mittels der Primer pET-Promotor/pET-Terminator ergab, dass die klonierten *pknA*-, *pknB*-, *pknG*- und *pknL*-Fragmente keine Mutationen enthielten. Es resultierten somit die Plasmide pET16b-*pknA*-KD, pET16b-*pknB*-KD, pET16b-*pknG*-KD und pET16b-*pknL*-KD (vgl. Abb. A5.2-A5.5), die nach Transfer in *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3)/pLysS die Zielgenexpression

nach IPTG-Induktion gestatten. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pLysS trägt zusätzlich ein Gen für das T7-Lysozym, welches neben seiner Zellwand-lysierenden Eigenschaft auch die T7-RNA-Polymerase hemmen kann. Die von pET16b-*pknA*-KD, pET16b-*pknB*-KD, pET16b-*pknG*-KD und pET16b-*pknL*-KD kodierten Proteine PknA-KD_{His} (34,0 kDa), PknB-KD_{His} (33,4 kDa), PknG-KD_{His} (40,1 kDa) und PknL-KD_{His} (33,6 kDa) enthalten am aminoterminalen Ende 21 zusätzliche Aminosäure-Reste (MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRH) einschließlich einer Schnittstelle für die Endoproteinase Factor Xa (IEGR).

5.4 Konstruktion von Plasmiden zur Expression von mutierten OdhI-Derivaten

Das bereits vorliegende Plasmid pAN3K-*odhI*-T14A/T15A (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten), welches für ein OdhI-Protein mit den Aminosäureaustauschen T14A und T15A sowie einer carboxyterminalen *Strep*Tag-II-Sequenz (WSHPQFEK) kodiert, wurde als Ausgangsplasmid verwendet. Mittels Mutagenese-PCR (QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) unter Verwendung der Primer OdhI-S2A-for/OdhI-S2A-rev und pAN3K-*odhI*-T14A/T15A als Matrize wurde das Plasmid pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A konstruiert. Eine nachfolgende DNA-Sequenzierung mit der Primerkombination pAN3K-for/pAN3K-rev bestätigte die zusätzlich eingebrachte Mutation an Position 2. In analoger Weise wurden die nachfolgenden Plasmide konstruiert: pAN3K-*odhI*-T7A/T14A/T15A mit Hilfe der Primer OdhI-T7A-for/OdhI-T7A-rev und pAN3K-*odhI*-T14A/T15A als Matrize; pAN3K-*odhI*-T14A/T15A/S16A mit Hilfe der Primer OdhI-S16A-for_2/OdhI-S16A-rev_2 und pAN3K-*odhI*-T14A/T15A als Matrize; pAN3K-*odhI*-S2A/T7A/T14A/T15A mit Hilfe der Primer OdhI-T7A-for_2/OdhI-T7A-rev_2 und pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A als Matrize; pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A/S16A mit Hilfe der Primer OdhI-S16A-for_2/OdhI-S16A-rev_2 und pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A als Matrize; pAN3K-*odhI*-T7A/T14A/T15A/S16A mit Hilfe der Primer OdhI-S16A-for_2/OdhI-S16A-rev_2 und pAN3K-*odhI*-T7A/T14A/T15A als Matrize und pAN3K-*odhI*-S2A/T7A/T14A/T15A/S16A mit Hilfe der Primer OdhI-S16A-for_2/OdhI-S16A-rev_2 und pAN3K-*odhI*-S2A/T7A/T14A/T15A als Matrize. Der *tetA*-Promotor im pAN3K-Vektor erlaubt eine Zielgenexpression mittels Anhydrotetracyclin (AHT), welches ein nicht bakteriostatisch wirkendes Derivat von Tetracyclin darstellt.

6 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Die Kultivierung von Bakterien zur Stammhaltung erfolgte entweder in Reagenzgläsern mit 5 ml BHI-Medium, die 12 – 15 h mit 170 Upm bei 30 °C inkubiert wurden (*C. glutamicum*)

oder in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium, die 12 – 15 h mit 170 Upm bei 37 °C inkubiert wurden (*E. coli*). Anschließend wurde 1 ml Kultur mit 1 ml sterilem Glycerin gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde bei -20 °C, das andere bei -75 °C gelagert.

7 Kultivierung von *C. glutamicum*

C. glutamicum wurde standardmäßig in 500-ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen kultiviert, die 50 ml CGXII-Minimalmedium (Keilhauer *et al*., 1993; es wurden zusätzlich 30 mg l^{-1} Protokatechusäure als Eisenchelator hinzugefügt) oder 50 ml BHI-Komplexmedium mit je 4 % (w/v) Glucose (222 mM) als Kohlenstoffquelle enthielten und bei 30 °C und 120 Upm inkubiert wurden. Zum Animpfen der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als 7 Tage waren. Die Vorkultivierung erfolgte über Nacht (ÜN) für ca. 16 h bei 30 °C und 170 Upm in 5 oder 25 ml BHI-Medium mit 4 % (w/v) Glucose, bevor die 50 ml BHI-Hauptkultur direkt oder die 50 ml CGXII-Hauptkultur nach Waschen der Zellen mit 0,9 % (w/v) NaCl zu einer OD_{600} von 1 inokuliert wurde. Zur Kultivierung des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ wurde eine 500 ml BHI-Hauptkultur mit 4 % (w/v) Glucose in einem 2-L Erlenmeyerkolben mit seitlichen Schikanen verwendet, die bei 30 °C und 120 Upm inkubiert wurde.

7.1 Kultivierung unter Glutamat-induzierenden Bedingungen

Zur Kultivierung unter Glutamat-induzierenden Bedingungen wurden in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose vorkultivierte Zellen in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose zu einer OD_{600} von 1 inokuliert. Die Induktion der Glutamatausscheidung durch 500 mg l^{-1} Ethambutol (Sigma, Taufkirchen) erfolgte gleich zu Beginn der Hauptkultivierung, wohingegen die Zugabe von 750 U l^{-1} Penicillin G (Sigma, Taufkirchen) oder 2 g l^{-1} Tween-40 (Sigma, Taufkirchen) zum Kulturmedium erst bei Erreichen einer OD_{600} von 5 – 8 erfolgte. Bei der Glutamat-Induktion durch Biotin-Limitierung wurde eine zweite Vorkultivierung für 24 h in 50 ml CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose verwendet, wobei anstelle der sonst eingesetzten Konzentration von 200 µg l^{-1} Biotin nur 2,5 µg l^{-1} Biotin zugesetzt wurde (Biotin-Vorlimitierung). Die eigentliche Hauptkultivierung erfolgte dann in 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose und 1 µg l^{-1} Biotin (Biotin-Limitierung). Für die Inokulation wurden die Zellen der Vorkulturen jeweils steril entnommen, 5 min bei 5.500 *g* abzentrifugiert, mit 30 ml steriler 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und dann in einem geeigneten Volumen physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert.

7.2 Kultivierung zur Identifizierung von OdhI-Phosphorylierungsstimuli

Für die Suche nach Bedingungen, die den Phosphorylierungsstatus von OdhI beeinflussen, wurde der *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm über Nacht in 5 ml BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose vorkultiviert und dann in 50 ml CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose zu einer OD_{600} von 1 inokuliert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 5 wurden die Zellen steril 5 min bei 5.500 *g* abzentrifugiert und zweimal mit modifiziertem CGXII-Medium gewaschen, dem Ammoniumsulfat und Harnstoff fehlte. Die Hauptkultivierung fand in 50 ml dieses modifizierten CGXII-Minimalmediums statt, dem 50 mM Glutamin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zugesetzt wurde. Als Kontrolle diente die Kultivierung in Standard-CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose. Des Weiteren wurden Kultivierungsbedingungen geschaffen, die zur Stickstoff-, Kohlenstoff-, Phosphat- bzw. Eisen-Limitierung führten. Hierbei fand die Kultivierung erneut in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose bis zu einer OD_{600} von 5 statt, bevor die Zellen zweimal mit 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen wurden. Die Hauptkultivierungen fanden in entsprechend abgewandeltem CGXII-Medium statt: Zur Stickstoff-Limitierung wurde CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose, aber ohne Ammoniumsulfat und Harnstoff verwendet; zur Kohlenstoff-Limitierung wurde CGXII-Medium ohne Glucose verwendet; zur Phosphat-Limitierung wurde CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose, aber ohne K_2HPO_4 und KH_2PO_4 eingesetzt; zur Eisen-Limitierung wurde CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose verwendet, wobei eine Spurensalzlösung zugesetzt wurde, die kein Eisensulfat enthielt. In einem anderen Ansatz wurde den Kulturen nach Erreichen einer OD_{600} von 5 Kaliumcyanid in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt, um durch Hemmung der Cytochrom aa_3-Oxidase Energiemangelbedingungen zu erzeugen (Matsushita *et al*., 1998).

7.3 Bestimmung des Wachstums von Bakterien und der Zelltrockenmasse von *C. glutamicum*

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der scheinbaren optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) mit einem Ultrospec 1100 pro-Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der scheinbaren optischen Dichte ist bis zu einer Extinktion von 0,3 bis 0,4 gegeben. Lag die gemessene Extinktion höher als 0,4, wurde die Probe mit Wasser oder dem entsprechendem Kultivierungsmedium verdünnt.

Es wurde gezeigt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen Zelltrockenmasse (TZ) und optischer Dichte gibt (Kabus *et al.*, 2007). Aus dem ermittelten linearen Bereich ergibt

sich die folgende Beziehung zwischen optischer Dichte und Trockengewicht: OD_{600} = 1 entspricht 0,25 (g TZ) l^{-1}.

8 Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde routinemäßig Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet (Sambrook *et al*., 1989). Nur zur Regeneration der Zellen nach einer Transformation bzw. bei der Kultivierung zur Herstellung kompetenter Zellen wurde SOC-Komplexmedium (Sambrook *et al*., 1989) eingesetzt. Alle *E. coli*-Stämme wurden in Schüttelkolben, in Röhrchen bzw. auf Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Die Kultivierungen zur Plasmid-Isolierung erfolgten im Allgemeinen in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium, die für 15 – 20 h mit 170 Upm geschüttelt wurden.

8.1 Expressionskulturen

Für die Überproduktion von Proteinen in *E. coli* wurden 100 ml oder 500 ml LB-Medium mit einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes, der das gewünschte Expressionsplasmid trug, zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 130 Upm inkubiert. Bei einer OD_{600} von ca. 0,5 wurde die Expression des Zielgens durch Zusatz von 1 mM Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG) oder 200 ng ml^{-1} Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Anschließend wurden die Zellen bei 30 °C 4 Stunden weiterinkubiert, bevor die Zellernte durch Zentrifugation (30 min, 6.000 Upm, 4 °C) erfolgte. Die sedimentierten Zellen wurden bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Expression wurde unmittelbar vor Induktion sowie 1, 2, 3 und 4 Stunden danach die OD_{600} bestimmt sowie jeweils 1-ml Proben entnommen, abzentrifugiert, die Zellen in (OD_{600} x 100) µl 1 x SDS-Ladepuffer resuspendiert und bis zur SDS-PAGE-Analyse bei -20 °C gelagert.

9 Molekularbiologische Methoden

9.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurden Zellen einer 5-ml Übernacht-Kultur vollständig sedimentiert, in 400 µl Lysispuffer (2,42 g l^{-1} Tris, 0,74 g l^{-1} Na_2EDTA, 1,2 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0) mit 20 mg ml^{-1} Lysozym (frisch zugesetzt) resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden 80 µl 10 % (w/v) SDS und 25 µl Proteinase K (20 mg ml^{-1} in TE-Puffer) zugegeben, kurz gevortext und 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1;

pH 7,5 – 8,0) und vortexen wurden die Phasen durch 3-minütige Zentrifugation bei 15.300 Upm (Sigma Zentrifuge 2K15) getrennt, die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml eiskaltem abs. Ethanol versetzt, gevortext und 10 min mit 15.300 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Sigma Zentrifuge 2K15). Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, das Ethanol vollständig abgenommen, die DNA luftgetrocknet und in 250 µl EB-Puffer (Qiagen, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst. Die Ausbeute nach dieser Methode beträgt ca. 0,5 mg DNA.

9.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der QIAprep-Spin Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen (Birnboim and Doly, 1979).

9.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm am Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000 PeQLab Biotechnologie GmbH) bestimmt. Dabei wurde mit folgendem Umrechnungsfaktor gearbeitet (Sambrook *et al.*, 1989): OD_{260} = 1 entspricht einer Konzentration von 50 ng μl^{-1} doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten $OD_{260}/OD_{280\ (Protein)}$ bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen liegt der Wert unter 1,8.

9.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Gelelektrophoretische Auftrennungen von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Für die Gele wurde 1 oder 2 %-ige (w/v) Agarose (GibcoBRL Ultra Pure Agarose) in 1 x TAE-Puffer verwendet, der gleichzeitig auch als Elektrophorese-Puffer diente. Die Auftrennung erfolgte mit einer Spannung von max. 120 V. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch mindestens 10-minütige Inkubation des Gels in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg ml^{-1}) mit anschließendem Waschen in bidest. Wasser. Durch Belichtung mit UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Image Master VDS System (Amersham Biosciences). Zur Größenbestimmung der DNA wurde je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente der DNA-Längenstandard XIV[1] von Roche Diagnostics, ein Gemisch der

[1] Der DNA-Längenstandard XIV enthält Fragmente folgender Größen: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1100 bp, 1200 bp, 1300 bp, 1400 bp, 1500 bp und 2642 bp

DNA-Längenstandards II[2] und III[3] von Roche Diagnostics oder der DNA-Längenstandard GeneRuler™ 1 kb[4] von Fermentas verwendet.

9.5 Rekombinante DNA-Techniken

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs oder Roche Diagnostics bezogen. Der Verdau von DNA erfolgte in 20 – 100 µl Ansätzen unter Verwendung eines geeigneten ,,SuRE/Cut Buffers for Restriction Enzymes" (Boehringer Mannheim) und 5 U Enzym. Die Restriktionsansätze mit Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurden mindestens 2 h, chromosomale DNA über Nacht bei 37 °C inkubiert.
Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde durch Behandlung linearer Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektoranteils bei der Ligationsreaktion vermieden. Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Zur Dephosphorylierung wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 15 min bei 65 °C.
Für Ligationen wurde entweder der ,,Rapid DNA Ligation Kit" (Roche Diagnostics) verwendet, wobei Ligationsansätze 30 min bei RT inkubiert wurden. Alternativ wurde geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA zusammen mit entsprechend geschnittener PCR-Fragment-DNA mit 500 µl abs. Ethanol im Verhältnis von mind. 1:3 gemeinsam für mind. 30 min bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurde die DNA 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Ligation wurde der Ansatz in 16 µl bidest. Wasser gelöst und 2 µl T4-DNA-Ligase (Fermentas) sowie 2 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz wiederum mit 500 µl abs. Ethanol gefällt, getrocknet und in 5 µl bidest. Wasser gelöst.

---

[2] Der DNA-Längenstandard II enthält Fragmente folgender Größen: 564 bp, 2027 bp, 2322 bp, 4361 bp, 6557 bp, 9416 bp und 23130 bp

[3] Der DNA-Längenstandard III enthält Fragmente folgender Größen: 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1375 bp, 1584 bp, 1904 bp, 2027 bp, 3530 bp, 4268 bp, 4973 bp, 5148 bp und 21226 bp

[4] Der DNA-Längenstandard GeneRuler™ 1 kb enthält Fragmente folgender Größen: 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp, 10000 bp

9.6 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine $RbCl_2$-Behandlung erhielten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan, 1985). Einige 2 – 3 mm große Kolonien von einer frischen LB-Platte wurden in 1 ml SOC-Medium resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD_{600} von ~ 0,5 bei 37 °C und 160 Upm inkubiert. Danach wurden die Zellen in 50-ml Falcontubes überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 15 min bei 16.000 *g* und 4 °C geerntet, in 17 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 4 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und dann in 100-µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

RF1-Lösung

$RbCl_2$	100	mM
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	50	mM
K-Acetat	30	mM
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10	mM
Glycerin	15	%
mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8		

RF2-Lösung

Morpholinopropansulfonsäure	10	mM
$RbCl_2$	10	mM
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	75	mM
Glycerin	15	%
mit 6 M NaOH auf pH 6,8		

Zur Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und je 50 µl mit bis zu 10 µl Ligationsansatz oder max. 1 µg Plasmid gemischt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 500 µl SOC-Medium (auf 37 °C erwärmt) zugegeben und der Ansatz für weitere 45 – 60 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert, bevor die transformierten Zellen auf geeigneten Selektivböden bei 37 °C ÜN inkubiert wurden.

9.7 Herstellung und Transformation kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von kompetenten *C. glutamicum*-Zellen erfolgte nach der Methode von van der Rest (van der Rest *et al.*, 1999). Aus einer Übernacht-Vorkultur in

LB-Medium mit 2 % (w/v) Glucose wurde die Hauptkultur in 200 ml EPO-Medium (2 g Trypton, 2 g NaCl und 1 g Hefeextrakt in 160 ml bidest. Wasser lösen und autoklavieren; 800 mg Isonicotinsäure-Hydrazid, 5 g Glycin und 0,2 ml Tween-80 in 40 ml bidest. Wasser lösen, sterilfiltrieren und zum Medium hinzugeben) auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 18 °C für 28 h. Die Kulturen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert, die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4.000 Upm), anschließend dreimal mit 10 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen und dann in 2 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert. 100-µl Aliquots wurden bei -75 °C gelagert.

Die Transformation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden 100 µl kompetente Zellen mit max. 3 µg Plasmid in einer eisgekühlten sterilen Elektroporationsküvette gemischt. Die Elektroporation (Gene Pulser, BioRad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 600 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 800 µl BHIS-Medium (auf 46 °C vorgewärmt) suspendiert, einem Hitzeschock unterzogen (6 min bei 46 °C) und abschließend mind. 1 h bei 30 °C inkubiert. 20 µl und 100 µl des Ansatzes sowie der Rest wurden auf BHIS-Platten mit 25 µg ml^{-1} Kanamycin ausplattiert.

9.8 Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pK19*mobsacB*-Systems

C. glutamicum-Deletionsmutanten wurden nach Niebisch und Bott (Niebisch and Bott, 2001) in Anlehnung an die von Link *et al.* (1997) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) konstruiert. Dazu wurde das Plasmid pK19*mobsacB*-Δ*pknG* (Niebisch *et al*., 2006) verwendet, das mittels Elektroporation in die *C. glutamicum*-Mutanten Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknL* und Δ*pknB*Δ*pknL* transferiert wurde. Die transformierten Zellen wurden auf BHIS-Nährböden mit 25 µg ml^{-1} Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* kann in *C. glutamicum* nicht repliziert werden. Daher sollte bei Kanamycin-resistenten Klonen das Plasmid durch homologe Rekombination am *pknG*-Genlocus in das Chromosom integriert worden sein. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden Kanamycin-resistente Klone zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % (w/v) Glucose ohne Kanamycin kultiviert und anschließend wurden jeweils 100 µl einer 1:10 und 1:100-Verdünnung der Kulturen auf BHIS-Nährböden mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in ihre Monosaccharide Fructose und Glucose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan umsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose letal für *C. glutamicum* ist (Jäger *et al.*, 1992). Daher sollte bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres

Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein. Bei diesem zweiten Rekombinationsereignis kann entweder die Wildtyp-Situation wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt werden. Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern, die in Tabelle 5.3 angegeben sind, analysiert.

9.9 Polymerasekettenreaktion

Die PCR (Mullis and Faloona, 1987) wurde sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanden und Deletionsmutanten) als auch präparative Zwecke (*in-vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten) genutzt. Falls im Text nicht anders vermerkt, wurde für präparative PCR-Ansätze der Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics) verwendet, der neben der *Taq*-DNA-Polymerase auch die *Tgo*-DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität beinhaltet. Durch Kombination der beiden Polymerasen und die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der *Tgo*-DNA-Polymerase wird die Fehlerrate der DNA-Synthese um den Faktor 3 reduziert. Für analytische PCR-Ansätze wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Die Reaktionen wurden in einem Primus Thermocycler (MWG Biotech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden bei Verwendung des Expand High Fidelity Kit entsprechend den Angaben des Herstellers wie folgt gewählt: Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielten 0,1 – 0,75 µg Matrizen-DNA, je 300 nM der beiden Primer, 2,6 U *Taq*/*Tgo*-DNA-Polymerase sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C wurden 30 Zyklen mit folgenden Parametern durchlaufen: 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s „Annealing" bei T_m -5 °C und x s Elongation bei 72 °C. Die Annealing-Temperatur wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m der Primer gewählt. Die Schmelztemperatur T_m der DNA kann mit der Formel T_m [°C] = [(G + C) x 4] + [(A + T) x 2] abgeschätzt werden. Als Elongationszeit x wurde 1 min pro 1 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Zur Kontrolle von *C. glutamicum*-Transformanden bzw. -Deletionsmutanten wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher zunächst auf eine neue Agarplatte ausgestrichen und der am Zahnstocher verbliebene Rest der Zellen als Matrize direkt in die Kolonie-PCR-Ansätze unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase gegeben. Zur Analyse wurden Aliquots der PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Reinigung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit oder dem QIAEX II Gel Extraction Kit (beide Qiagen, Hilden) eluiert und gereinigt oder alternativ mit dem QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt, wenn die Gelelektrophorese keine Nebenprodukte erkennen ließ.

9.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Mutation wurden zwei komplementäre Oligonukleotide ausgewählt, die im zentralen Bereich die gewünschte Mutation enthielten. Die für die OdhI-Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Für die Mutagenesereaktion wurden folgende Ansätze hergestellt:

Mutagenesereaktion (ad 50 µl bidest. Wasser)

5 µl 10 x Reaktionspuffer
x µl Plasmid (10 ng)
x µl Primer-forward (125 ng)
x µl Primer-reverse (125 ng)
1 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
3 µl QuikSolution
1 µl *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase (2,5 U μl^{-1})

Die Mutagenesereaktion wurde im Thermocycler (Primus 25, MWG Biotech) gemäß folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung der DNA	1 min	95 °C	1 x
Denaturierung der DNA	50 s	95 °C	
Primer-„Annealing“	50 s	60 °C	18 x
Primer-„Elongation“ (1 min/kb)	7 min	68 °C	
Primer-„Elongation“	8 min	68 °C	

Im ersten Zyklus binden die Primer nur an die Ausgangs-DNA. Nach der Elongation entsteht eine Heteroduplex aus einem zirkulären Wildtypstrang und einem mutierten Strang, der dort, wo das elongierte 3’-Ende auf das 5’-Ende des Primers trifft, eine Lücke („Nick“) enthält. Der mutierte Strang ist demnach ein lineares Molekül. Nach erneuter Denaturierung können die Primer auch an die von der *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase neu synthetisierten Stränge binden, aber nicht elongiert werden. Daraus folgt, dass bei allen durchlaufenen Zyklen ausschließlich die Ausgangs-DNA als Matrize für die Neusynthese der mutierten Stränge dient. Dadurch werden Fehler, die bei den neuen Strängen in seltenen Fällen auftreten können, nicht amplifiziert. Nach 18 Zyklen erhält man so ein Verhältnis 18:1 von mutierten Strängen zu Ausgangs-DNA. Das Ausgangsplasmid wurde aus *E. coli* DH5α isoliert und war daher durch die DNA-Adenin-Methylase (*dam*-Genprodukt) methyliert. Die DNA-Adenin-Methylase

transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die N6-Position des Adenin-Restes in der Sequenz GATC, die bei einem G+C-Gehalt von 50 % durchschnittlich einmal in 256 bp vorkommt. Der in der Mutagenese-Reaktion neu synthetisierten DNA fehlt diese Methylierung. Die Parental-DNA wurde mit DpnI geschnitten, einem Restriktionsenzym, welches spezifisch die hemimethylierte oder vollständige methylierte Sequenz 5'-Gm6ATC-3' schneidet. Es wurde 1 µl DpnI (10 U μl^{-1}) je Reaktionsansatz hinzugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert.
Kompetente Zellen von *E. coli* DH5α wurden mit 5 µl des DpnI-geschnittenen Mutageneseansatzes transformiert, auf selektive LB-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolierung sowie eine DNA-Sequenzanalyse mehrerer Klone.

9.11 DNA-Sequenzanalyse

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde das ,,BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit V3.1" (Applied Biosystems), das „DyeEx-Kit 2.0“ (Qiagen) sowie ein ABI PRISM® 3100 Avant-Kapillarsequenziergerät (Applied Biosystems) nach Angaben der Hersteller genutzt. Es wurde eine 50 cm lange Kapillare mit dem Polymer POP-6 verwendet. Vergleiche der in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen mit DNA-Sequenzen aus Datenbanken wurden mit Hilfe des Programmes ,,Blast-Blast 2 Sequences" (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm ,,Clone Manager 7" für Windows XP (Version 7.03, Scientific & Educational Software). In einzelnen Fällen erfolgte die DNA-Sequenzanalyse bei AGOWA (Berlin).

10. Proteinbiochemische Methoden

10.1 Zellaufschluss, Zellfraktionierung und Solubilisierung von Proteinen aus Zellmembranen

Für den Aufschluss von Zellen aus 100-ml bzw. 500-ml *E. coli*- oder *C. glutamicum*-Kulturen für affinitätschromatographische Proteinreinigungen oder Coreinigungsexperimente wurden diese in 50 ml Aufschlusspuffer (TNI5-Puffer, Puffer W bzw. Puffer W^+) gewaschen und im gleichen Puffer (10 ml) resuspendiert. Zur Hemmung von Proteasen wurde 100 µl Proteaseinhibitor-Mix (100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 100 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP) in wasserfreiem Ethanol) oder 1 ml Complete EDTA-free Protease-Inhibitormix (Roche Diagnostics) hinzugefügt. Der Zellaufschluß erfolgte durch

dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments, Rochester) bei einem Druck von 108 MPa (*E. coli*) bzw. durch fünf- bis zehnmalige Passage bei einem Druck von 172 MPa (*C. glutamicum*). Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min bei 5.500 *g*, 4 °C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (60 min bei 180.000 *g*, 4 °C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Für die affinitätschromatographischen Reinigungen wurde der Überstand der Ultrazentrifugation (= lösliche Proteinfraktion) eingesetzt.

Für die Präparation von membranintegralen Proteinen in den Coreinigungsexperimenten mit dem Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ wurde das Sediment der Ultrazentrifugation in 2 ml PBS-Puffer resuspendiert. Die Membransuspension wurde tropfenweise mit einer 10 %-igen (w/v) Lösung des Detergenz Dodecylmaltosid versetzt, bis die gewünschte Endkonzentration von 2 g Dodecylmaltosid pro g Protein erreicht wurde. Dabei wurde die Suspension auf Eis mit einem Rührfisch gerührt. Es folgte eine 60-minütige Inkubation auf Eis, während der die Solubilisierungsansätze weiterhin mit einem Rührfisch gerührt wurden. Um solubilisierte Proteine von den Membranen zu trennen, erfolgte erneut eine 60-minütige Ultrazentrifugation (180.000 *g*, 4 °C). Der resultierende Überstand enthielt die solubilisierten Proteine.

Für den Aufschluss von 5- oder 10-ml *C. glutamicum*-Kulturaliquots für Western-Blot-Analysen wurden die Zellen in 10 ml PBS-Puffer gewaschen und in lediglich 1 ml PBS-Puffer inklusive 100 µl Complete EDTA-free Protease-Inhibitormix (Roche Diagnostics) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Glasperlen (ca. 1 g; Ø = 0,1 mm, Roth), wobei die Zellen 3 x 30 s mechanisch im Amalgamator (Silamat S5, Vivadent) aufgeschlossen wurden. Nach jedem Durchgang wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Zelltrümmer wurden durch 30-minütige Zentrifugation (Sigma Zentrifuge 2K15) bei 15.300 Upm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und für 1 h bei 180.000 *g* und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand (= lösliche Proteinfraktion) wurde für die Western-Blot-Analysen eingesetzt.

10.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden standardmäßig mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test (Smith *et al*., 1985) bestimmt. Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf der Reduktion von Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{+}-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Durch die anschließende Chelatbildung von Cu^{+} mit zwei Molekülen BCA wird ein blau-violetter Komplex gebildet, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches linear zur Proteinkonzentration. Es wurden 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay

Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 1100 pro-Photometer, Amersham Biosciences). Neben dem BCA-Test wurde die Bradford-Methode (Bradford, 1976) zur Proteinkonzentrationsbestimmung angewandt. Diese Methode beruht auf der Komplexbildung von Proteinen mit freiem Farbreagenz (Coomassie-Blau) in saurer Lösung, wodurch sich das Absorptionsspektrum von 470 nm zu 595 nm verschiebt. Hierbei wurden 50 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) versetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde bei beiden Methoden Rinder-Serumalbumin verwendet.
Alternativ wurde die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bei 280 nm am Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000 PeQLab Biotechnologie GmbH) unter Verwendung folgender molarer Extinktionskoeffizienten bestimmt, die mit Hilfe des ExPASy ProtParam-Tools (http://www.expasy.org/tools/protparam.html) ermittelt wurden: $OdhI_{Strep}$ und seine mutierten Derivate: 6990 M^{-1} cm^{-1}; PknA-KD_{His}: 19940 M^{-1} cm^{-1}; PknB-KD_{His}: 10555 M^{-1} cm^{-1}; PknG-KD_{His}: 18910 M^{-1} cm^{-1}; PknL-KD_{His}: 10430 M^{-1} cm^{-1}; $FtsZ_{His}$: 5960 M^{-1} cm^{-1}; Icd_{His}: 67505 M^{-1} cm^{-1}.

10.3 Affinitätschromatographie mittels *Strep*Tactin-Sepharose

OdhI und seine Derivate mit einem C-terminalen *Strep*Tag-II (Sequenz: WSHPQFEK) wurden durch Affinitätschromatographie mit *Strep*Tactin-Sepharose gereinigt (Skerra and Schmidt, 2000). Die lösliche Proteinfraktion wurde zunächst zur Absättigung biotinylierter Proteine (BCCP in *E. coli*) mit 50 µl tetramerer Avidin-Lösung (5 mg ml^{-1}, aus Hühnereiweiß, Sigma, Seelze) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Säule mit *Strep*Tactin-Sepharose (2 ml Bettvolumen, IBA, Göttingen) gegeben, die zuvor mit einer Fritte abgedeckt und mit 10 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0) oder für die Coreinigungsexperimente mit Puffer W^+ (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Dodecylmaltosid, pH 8,0) äquilibriert worden war. Nach Waschen mit 5 x 2 ml Puffer W bzw. 20 ml Puffer W^+ wurde spezifisch gebundenes Protein mit 6 x 1 ml Puffer E bzw. Puffer E^+ durch vorhandenes Desthiobiotin (5 mM Endkonz.; Sigma) eluiert. Die Säule wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 ml Puffer R regeneriert und bei 4 °C gelagert. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden gegebenenfalls vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

10.4 Affinitätschromatographie mittels „Ni^{2+}-Nitrilotriacetic Acid“ (NTA)-Agarose

Die Proteinaufreinigung der verschiedenen Polyhistidin-„getaggten“ Ser-/Thr-Proteinkinasedomänen sowie OdhI erfolgte über separate 15-ml Polypropylen-Säulen (Qiagen, Hilden), die luftblasenfrei mit je 4 ml suspendierter Ni^{2+}-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) gefüllt wurden, was einem Bettvolumen von 2 ml entsprach. Das Material wurde mit einer Fritte abgedeckt. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der UZ-Überstand auf die Säule gegeben. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch stufenweises Waschen mit je 10 ml TNI5, TNI30, TNI50 und TNI100-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 10 x 1 ml TNI200-Puffer eluiert. Proteine, die immer noch an Ni^{2+} gebunden waren, wurden durch Entfernen der Ni^{2+}-Ionen mit 10 ml des EDTA-enthaltenden "Strip"-Puffers entfernt. Die Säule wurde nun entweder bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C gelagert oder mit 5 ml 100 mM $NiSO_4$-Lösung für eine neue Chromatographie vorbereitet. Die eluierten Fraktionen wurden qualitativ auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 20 µl mit jeweils 100 µl Bradford-Reagenz (Coo Protein Assay, Uptima, Frankreich) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung zeigte an, ob die Fraktion Protein enthielt oder nicht. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden gegebenenfalls vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

10.5 Pufferaustausch durch Gelfiltration mit Hilfe von PD-10-Säulen

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex-G25-Material. Dazu wurden PD-10-Säulen von Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Von der Säule wurde die Kappe entfernt und die Ausflussspitze abgeschnitten. Die Säule wurde mit 25 ml des gewünschten neuen Puffers äquilibriert. Anschließend wurden bis zu 2,5 ml Proteinlösung aufgetragen. Dann wurde das Protein mit 3,5 ml des gewünschten Puffers eluiert.

10.6 Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen

Des Öfteren war eine Aufkonzentrierung der Proteinproben notwendig, welche nach Angaben des Herstellers mit Hilfe von Vivaspin-Säulen (MWCO 5.000 oder MWCO 10.000; Vivascience AG, Hannover) durch Ultrafiltration erfolgte. Darüber hinaus wurden Vivaspin-Säulen auch zur schnellen Umpufferung von Proteinen verwendet.

10.7 Größenausschlusschromatographie

Die nativen Größen von $OdhI_{Strep}$ und den Kinasedomänen von PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His}, PknG-KD_{His} und PknL-KD_{His} wurden durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Hierfür wurde aufgereinigtes Protein mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade"-Säule (Amersham Biosciences), welche an ein Äkta Explorer-System (Amersham Biosciences) angeschlossen war, nach Größe aufgetrennt. Die Säule wurde zuvor für $OdhI_{Strep}$ mit KP-Puffer und für die Kinasedomänen mit Kinase-Puffer äquilibriert. Für die Bestimmung wurden 0,5 – 4 mg aufgereinigtes Protein in einem Volumen von ca. 1 ml auf die Säule gegeben und bei 4 °C mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} von der Säule (2-ml Eluatfraktionen) eluiert. Die Eichung erfolgte mit Cytochrom *c* aus Pferdeherz (12,4 kDa), Carboanhydrase aus Rindererythrozyten (29 kDa), Albumin aus Rinderserum (66 kDa) und Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe (150 kDa) (Sigma-Aldrich, USA).

10.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung löslicher Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-PAGE-Methode nach Laemmli (1970) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad) durchgeführt. Es wurden 15 %-ige Trenngele und 4 %-ige Sammelgele benutzt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen sechsfach konzentriertem SDS-Ladepuffer gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Protein Marker Precision Plus Protein Unstained Standard[1] (Bio-Rad) oder, falls ein Western-Blot folgte, der Protein Marker Precision Plus Protein Prestained Standard[1] (Bio-Rad) verwendet, die beide die gleichen Proteingrößen beinhalten. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer max. Spannung von 200 V. Routinemäßig wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurden die Gele dreimal 10 min mit bidest. Wasser gewaschen, mind. 1 h oder ÜN in ca. 20 ml GelCode®Blue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. Wasser (mindestens 1 h) entfernt.

10.9 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der nativen Größen von $OdhI_{Strep}$, $OdhI_{His}$ und den Kinasedomänen PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His}, PknG-KD_{His} und PknL-KD_{His} wurden parallel zur Gelfiltration Bis-Tris-Gradientengele (NativePAGE™ Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Als Standard diente der NativeMark™ Unstained Protein Standard[2]

[1] Der Protein Marker Precision Plus Protein Prestained/Unstained Standard enthält folgende Proteingrößen: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa und 10 kDa

der Firma Invitrogen. Der Gradient der Gele erstreckte sich von 4 – 16 %. Die Protein-Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit NativePAGE™ Sample Buffer (Invitrogen) gemischt. Die Elektrophorese erfolgte 120 min bei 150 V und Coomassie® G-250 war im Laufpuffer enthalten.

10.10 Antiserumgewinnung

Für den Nachweis von OdhI mittels Western-Blot-Methode mußten zuvor Anti-OdhI-Antikörper hergestellt werden. Dazu wurden 1,1 mg $OdhI_{Strep}$-Protein mittels *Strep*Tactin-Sepharose gereinigt (vgl. Kapitel IV.10.3) und in 1 x PBS-Puffer mittels PD-10-Säulen (vgl. Kapitel IV.10.5) umgepuffert. Ein Kanichen wurde mit dieser Proteinlösung nach Standardprotokoll bei der Firma Biogenes immunisiert (http://www.biogenes.de). Das dadurch erhaltene Anti-OdhI-Antiserum (polyklonale Anti-OdhI-Antikörper) wurde standardmäßig in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt und war spezifisch gegen OdhI wie Western-Blot-Experimente zeigten, da eine Immunreaktion mit *C. glutamicum*-Wildtyp, jedoch nicht mit einer Δ*odhI*-Deletionsmutante, detektierbar war (vgl. Abb. 5.3).

10.11 Western-Blot

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Membranen erfolgte durch Elektroblotting in einer Transblot Semi-Dry Transfer Cell (Biorad). Die Proteine wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond C Extra, Amersham Biosciences) mit Towbin-Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) (Towbin *et al.*, 1979) übertragen. Dazu wurden vier Whatman-Papiere, das Gel und die Membran zunächst in Towbin-Blotpuffer inkubiert. Für den Blot-Aufbau wurden zwei Whatman-Papiere, die Membran, das Gel und zwei Whatman-Papiere in der angegebenen Reihenfolge luftblasenfrei auf die Anode gelegt und anschließend die Kathode aufgesetzt („Sandwich"-Prinzip). Der Transfer erfolgte 45 – 60 min bei einer Stromdichte von 1 mA/cm^2. Anschließend wurde die Membran ÜN in 1 x PBST-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Blockierungspuffer) geschüttelt und dreimal mind. 5 min mit 1 x PBST-Puffer gewaschen. Für die spezifische Detektion von OdhI wurde die Membran 1 h in 1 x PBST-Puffer mit 2,5 % (w/v) Magermilchpulver mit dem Anti-OdhI-Antiserum in einer 1:500-Verdünnung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für mind. 5 min mit 1 x PBST-Puffer wurde sie 1 h in 1 x PBST-Puffer mit 2,5 % (w/v) Magermilchpulver mit dem sekundären Kaninchen-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat-Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-AP Conjugate, Biorad) in einer 1:3.000-

[2] Der NativeMark™ Unstained Protein Standard enthält folgende Proteine: 1048 kDa IgM Pentamer, 720 kDa Apoferritin Bande 1, 480 kDa Apoferritin Bande 2, 242 kDa β-Phycoerythrin, 146 kDa Laktat Dehydrogenase, 66 kDa Rinderserumalbumin, 20 kDa Trypsin Inhibitor

Verdünnung inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran erneut dreimal mit 1 x PBST-Puffer gewaschen. Die colorimetrische Detektion erfolgte, nachdem die Membran in 50 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 9,5) umgesetzt wurde, mit je 500 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (20 mg ml^{-1} in bidest. Wasser) in Kombination mit 500 µl Nitroblautetrazoliumchlorid-Lösung (30 mg ml^{-1} in 70 % Dimethylformamid). Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Überführung der Membran in bidest. Wasser gestoppt.

10.12 2-D-Gelelektrophorese

300 µg Gesamtprotein oder ein 100 µl Phosphorylierungsansatz, der 10 µg $OdhI_{Strep}$ enthielt, wurden durch Zugabe von 9 Vol. Aceton und Inkubation bei -20 °C für mindestens 2,5 h bzw. über Nacht gefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 18.000 *g* und 4 °C wurden die präzipitierten Proteine luftgetrocknet, mit 350 µl Solubilisierungspuffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) DTT, 1 % Pharmalyte 3-10 NL; alle Reagentien von Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Für die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung (IEF), wurde die Proteinlösung luftblasenfrei zwischen den Elektroden von Keramikschiffchen verteilt. Die für den entsprechenden pH-Bereich ausgewählten Fertiggele (18 cm Immobiline DryStrips, pH 4,0 – 5,0, GE Healthcare) wurden auf die Proteinlösung gelegt und mit ca. 1 ml ,,Immobiline DryStrip Cover Fluid'' überschichtet. Die IEF wurde in einem IPGphor-Gerät (Amersham Pharmacia Biotech) über einen Zeitraum von ca. 24 h mit folgenden Parametern bei 20 °C durchgeführt: Rehydratisierung 10 h; 1 h 500 V; mit einem linearen Gradienten innerhalb von 4 h auf 1000 V; mit einem linearen Gradienten innerhalb von 3 h auf 8000 V; 5 h 40 min 8000 V. Nach der IEF wurden die Gele entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Die zweite Dimension (SDS-PAGE) wurde in horizontalen Elektrophoresekammern (Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Zur Vorbereitung der zweiten Dimension wurde mind. 1 ml ,,Immobiline DryStrip Cover Fluid'' auf den auf 15 °C thermostatisierten Kühlplatten der Elektrophoreseapparatur gleichmäßig verteilt. Die Fertiggele (ExcelGel XL SDS 12 – 14, GE Healthcare) wurden mit richtiger Polarität auf die Kühlplatte gelegt und vorhandene Luftblasen zwischen Gel und Kühlplatte entfernt. Nach Entfernen der Schutzfolie wurden die Anoden- und Kathodenpufferstreifen (ExcelGel SDS Buffer Strips, Amersham Pharmacia Biotech) luftblasenfrei an den äußersten Begrenzungen der Gele plaziert. Die Gelstreifen der IEF wurden 20 min mit je 10 ml Äquilibrierungslösung A (6,05 g l^{-1} Tris, 360 g l^{-1} Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 10 g l^{-1} DTT, 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v)); DTT im Ultraschallbad lösen) inkubiert. Im Anschluss erfolgte 20 min eine Inkubation mit Äquilibrierungslösung B (6,05 g l^{-1} Tris, 360 g l^{-1} Harnstoff, 30 % (v/v)

Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 40 g l^{-1} Iodacetamid, 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v)); Iodacetamid im Ultraschallbad lösen). Die Gelstreifen wurden kurz mit bidest. Wasser gespült, überschüssige Flüssigkeit abgetupft und mit der Gelseite nach unten etwa 2 mm vor die Kathodenpufferstreifen auf die Fertiggele gelegt. Luftblasen zwischen Fertiggel und Gelstreifen wurden entfernt, auf gleicher Höhe mit dem Gelstreifen wurde ein feuchtes Filterblättchen plaziert und mit 10 µl Protein-Größenstandard (Protein Marker Precision Plus Protein Prestained Standard (Bio-Rad)) versetzt. Die Elektrodenhalter wurden so positioniert, dass sich die Elektroden genau über der Mitte der Pufferstreifen befanden. Nach dem 45-minütigen Vorlauf (pro Gel 20 mA, 100 V, 50 W) wurden Gelstreifen und Filterblättchen entfernt und der Hauptlauf (pro Gel 40 mA, 800 V, 50 W) für 160 min durchgeführt. Die 2-D-Gele wurden anschließend mit kolloidalem Coomassie Brillant Blue G-250 gefärbt. Hierzu wurden die Gele 1 h in 300 ml Fixierlösung (17 % (w/v) Ammoniumsulfat, 2 % (v/v) Phosphorsäure, 33 % (v/v) Methanol) geschüttelt, mit 1 ml Farbstofflösung (5 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G-250, in bidest. Wasser gelöst) versetzt, die Färbeschalen mit Parafilm abgedichtet und 24 bis 72 h bei RT leicht geschüttelt. Im Anschluss wurden die Gele 3 x 20 min in demineralisiertem Wasser, 1 min in 30 % (v/v) Methanol und abschließend 15 min in demineralisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

10.13 Phosphorylierungsexperimente

Um die Autophosphorylierungsaktivität der Proteinkinasedomänen PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His}, PknG-KD_{His}, PknL-KD_{His} und die Transphosphorylierungsaktivität auf $OdhI_{Strep}$ und seine Derivate bzw. $OdhI_{His}$, $FtsZ_{His}$ und Icd_{His} zu untersuchen, fand vorab eine Umpufferung aller Proteine mittels PD-10-Säulen (vgl. Kapitel IV.10.5) in Kinasepuffer (25 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,5) sowie eine Aufkonzentrierung mittels Vivaspin-Säulen (MWCO 5.000 bzw. 10.000 Da) (vgl. Kapitel IV.10.6) statt. Die Phosphorylierungsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 20 µl 1 – 2 µg PknA-KD_{His}, 3 – 5 µg PknB-KD_{His}, 5 µg PknG-KD_{His} bzw. 1 – 2 µg PknL-KD_{His} und/oder jeweils 2 µg $OdhI_{Strep}$ und seine Derivate, $OdhI_{His}$, $FtsZ_{His}$ oder Icd_{His}. Die Phosphorylierungsansätze zur Western-Blot-Analyse mit Anti-OdhI-Antiserum enthielten nur 0,05 µg des Substrates. Die Phosphorylierungsreaktion mit nicht-radioaktivem ATP fand bei 37 °C für 60 min und unter Verwendung von 2 mM ATP (Sigma) statt und wurde durch Zugabe von 6 x SDS-Ladepuffer abgestoppt. Die Probe wurde für 10 min bei 95 °C aufgekocht, auf ein 15 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgte eine Coomassie-Färbung oder ein Western-Blot mit Anti-OdhI-Antiserum. Die Phosphorylierungsexperimente mit radioaktivem ATP fanden nach Zugabe von 1 µCi [γ-^{33}P]-ATP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) für 30 min bei 37 °C statt. Die Reaktion

wurde durch 6 x SDS-Ladepuffer gestoppt und die Proteine ohne vorheriges Aufkochen auf einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die Lauffront der Gele abgetrennt, die so zurechtgeschnittenen Gele auf Whatman-3MM-Papier transferiert, mit Saranfolie bedeckt und 45 – 60 min bei 80 °C unter Vakuum auf einem Geltrockner getrocknet. Diese Gele wurden anschließend mit dem Whatman-3MM-Papier untenliegend in einer „Even-Pressure"-Kassette fixiert und ein PhosphorImage-Screen (Fuji Imaging Plates BAS-MS, 20 x 25 cm) aufgelegt. Die Screens ermöglichen die Detektion der in den Gelen vorhandenen ^{33}P-β-Strahlung. Hierbei werden durch die β-Strahlung Elektronen des Eu^{2+} im Bariumfluorobromid-Kristall ($BaFBr:Eu^{2+}$) der photostimulierbaren Phosphorschicht des PhosphorImage-Screens in das Leitungsband des Kristalls freigesetzt. Diese Elektronen werden in den Fehlstellen des Bromidionen-Kristallgitters in einem metastabilen Zustand „gefangen", wodurch die Information über die räumliche Verteilung der Radioaktivität gespeichert wird. Durch Excitation der Elektronen mittels Laserlicht einer Wellenlänge von 633 nm kann die gespeicherte Information abgelesen werden. Durch die Excitation wird den Elektronen Energie zugeführt, die es ihnen ermöglicht, die Energiesenke ihres „gefangenen" Zustands zu verlassen und auf das Energieniveau des Valenzbandes zurückzukehren. Die hierbei freiwerdende Energie wird in Form von Lumineszenz abgegeben und kann bei einer Wellenlänge von 390 nm detektiert werden. Nach 16 h Inkubation der Kassetten bei Raumtemperatur wurden die Screens mit einem PhosphorImager (Fuji BAS 1800) ausgewertet. Die quantitative Auswertung der ausgelesenen Screens erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Aida V2.11 (Raytest Straubenhardt).

10.14 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-,,Fingerprint"-Analysen mit Hilfe der beiden in dieser Arbeit genutzten Massenspektrometer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) und Ultraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III (Bruker Daltonics) wurden Gelstückchen aus Proteinbanden in Coomassie-gefärbten eindimensionalen oder zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis and Langen, 1997). Hierzu wurden die Gelstückchen nach 2 x 10 min Waschen mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 3 – 10 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng μl^{-1} Trypsin (Promega) rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 3 – 10 µl 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei RT verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 10 µl bidest. Wasser, 15 min Inkubation bei RT, Zugabe von 10 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril bei Arbeiten mit

der Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation oder 10 µl 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril bei Arbeiten mit dem Ultraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III und nochmals 10 min Inkubation bei RT eluiert. Gegebenenfalls wurden die tryptischen Peptide mittels „ZipTip® C_{18} standard bed“ (Millipore) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert. Als Matrix diente gesättigte α-Cyano-4-hydroxy-trans-zimtsäure in 50 % (v/v) Acetonitril und 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des ,,Sequazyme Peptide Mass Standard Kits'', die ein Massenspektrum von 900 – 6000 Da abdecken und sich aus Bradykinin, Angiotensin 1, Fibrinopeptid B, Neurotensin, ACTH (1 – 17), ACTH (18 – 39), ACTH (7 – 38) und Insulin zusammensetzen (Applied Biosystems), bei Arbeiten mit der Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation oder mittels des „Peptide Calibration Standards“, der ein Massenspektrum von 1046 – 3147 Da abdeckt und sich aus Angiotensin 1, Angiotensin 2, Substance P, Bombesin, ACTH (1 – 17), ACTH (8 – 39) und Somatostatin zusammensetzt (Bruker Daltonics), bei Arbeiten mit dem Ultraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III. Die Proben wurden in der Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurde die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datendank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen mit Hilfe des MS-Fit-Programms (Clauser *et al.*, 1999) genutzt. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn mind. vier der experimentell bestimmten Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten oder mehr als 25 % des Proteins mit den identifizierten Peptiden abgedeckt werden konnte, wobei die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 200 ppm betragen durften und die Fehler der einzelnen Peptide einem Muster folgten, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte. Im Ultraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III wurden die Proben im positiven Reflektormodus und einem Beschleunigungspotential von 26,3 kV analysiert. Zur Steuerung des Geräts wurde die Software flexControl 3.0 und zur Datenanalyse das Programm flexAnalysis 3.0 verwendet. Anschließend konnten die erhaltenen Peptidmassen zwischen 900 und 4500 Da mit Hilfe des Programms BioTools 3.1, des MASCOT-Servers (Matrix Science, London, UK) und der MASCOT-Software (Perkins *et al*., 1999) mit der NCBI-*C. glutamicum*-Protein-Datenbank verglichen werden. Beim Peptidmassenvergleich mittels MASCOT-Software sowie mittels des MS-Fit-Programms wurden eine „missed cleavage“ beim Trypsinverdau, eine Carbamidomethylsubstitution am Cystein als feste Modifikation, eine Oxidation von Methionin sowie Phosphorylierungen von Serin- und Threoninresten als variable

Modifikationen und eine Abweichung von 200 ppm zugelassen. Von einer sicheren Identifizierung wurde ausgegangen, wenn ein MOWSE-Score (Molecular Weight Search, Molmassensuche) ≥ 50 erhalten wurde, der die statistische Absicherung des gewonnenen Ergebnisses wiederspiegelt (Pappin *et al*., 1993). Weiterhin konnten mit dem Ultraflex MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer III mittels MS/MS-Methode einzelne tryptische Peptide selektiert und weiter fragmentiert werden, um die Aminosäuresequenz des ausgewählten Peptids (*parent ion*) abzuleiten. Dazu wurde die entsprechende Probe mit hoher Laserenergie verdampft und ionisiert. Nach Beschleunigung der ionisierten tryptischen Peptide wurden diese über eine kurze Strecke aufgetrennt und im Anschluss konnte mit Hilfe eines kurzzeitig aussetzenden Gegenfeldes das *parent ion* selektiert werden. Auf Grund der hohen Laserenergie, die zum Verdampfen der Probe verwendet wurde, zerfallen die tryptischen Peptide während des Fluges (Laser-Induced-Dissociation, LID). Um diese entstandenen Ionen voneinander zu trennen, folgte anschließend eine Beschleunigung dieser in der LIFT-Einheit (Lift-Technik = Post-Akzeleration von fragmentierten Ionen) (Suckau *et al*., 2003). Die Ionisierungsspannung betrug in diesen Fällen 8,0 kV, die Lift-Spannung 19 kV und die Reflektorspannung 29,5 kV. Bei der Zuordnung und Bewertung der erhaltenen Spektren wurde eine MS/MS-Toleranz von 0,5 Da vorausgesetzt. Ein Protein galt dann als identifiziert, wenn die MASCOT-Datenbanksuche einen Kandidaten als signifikant ($p<0,05$) betrachtete.

11. Mikroskopische Methoden

11.1 Phasenkontrast-Mikroskopie

C. glutamicum wurde in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose bis zu einer OD_{600} von ca. 1,5 kultiviert. Für Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahmen an der Universität zu Köln (Dr. Marc Bramkamp, Institut für Biochemie) wurden 1 – 3 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgebracht, der mit einer dünnen 1,5 %-igen Agaroseschicht bedeckt war. Die Fotos wurden mit Hilfe eines Carl Zeiss Mikroskops Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Göttingen), das mit einer Zeiss AxioCam HR3 Kamera (Carl Zeiss, Göttingen) ausgestattet war, in Verbindung mit einem EC-Objektiv „Plan-Neofluar/100x/1,30 Oil“ aufgenommen. Digitale Aufnahmen wurden mit der Software AxioVision 4.6 (Carl Zeiss, Göttingen) erhalten und analysiert.

12. Enzymatisch-photometrische Glucose-Bestimmung

D-Glucose wurde nach einer Methode von Bergmeyer *et al.* (1974) enzymatisch mit Hexokinase (HK aus Hefe; Roche Diagnostics) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH aus *Leuconostoc mesenteroides*; Roche Diagnostics) bestimmt. Dieser Test beruht auf den in den Gleichungen (I) und (II) dargestellten Reaktionen:

$$\text{Glucose + ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucose-6-Phosphat + ADP} \qquad \text{(I)}$$

$$\text{G-6-P + NAD}^+ \xrightarrow{\text{G-6-P-DH}} \text{6-Phospho-δ-gluconolacton + NADH+H}^+ \qquad \text{(II)}$$

Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent und wurde aufgrund der Absorption bei 340 nm (molarer Extinktionskoeffizient: 6,22 mM^{-1} cm^{-1}) bestimmt. Für den Test wurden Mikrotiterplatten für 96 Proben (Wellplates, VWR International, Wien, Österreich) verwendet. Es wurden jeweils 40 µl Probe bzw. Glucose-Standards unterschiedlicher Konzentrationen (0,1 – 2,5 mM) in die Probenvertiefungen pipettiert (jeweils Doppelbestimmungen) und 260 µl der Reaktionslösung (siehe unten) zugesetzt. Danach erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einem Mikrotiterplattenschüttler (Heidolph Polymax 1040). Anschließend wurde die Extinktion bei 340 nm mittels eines Mikrotiterplattenphotometers (ThermoMax microplate reader, MWG) bestimmt. Die Umrechnung der gemessenen Extinktionen in die Glucosekonzentration erfolgte anhand der mit den Glucose-Standards erstellten Kalibriergeraden.

<u>50 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 6,8:</u>

Tris		12,1 g
Maleinsäure		11,6 g
NaOH (konz.)		pH 6,8 einstellen
bidest. Wasser	ad	1000 ml

<u>100 mM Magnesiumchlorid-Lösung:</u>

$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$		1,017 g
Tris-Maleat-Puffer	ad	50 ml

NAD/ATP-Mix (24 Ansätze):		
ATP		367,5 mg
NAD		477,0 mg
$MgCl_2$-Lsg.		25,0 ml
Tris-Maleat-Puffer	ad	600 ml

Enzym-Lösung:	
HK (3.000 U ml^{-1})	55 µl
G-6-P-DH (1.000 U ml^{-1})	55 µl
bidest. Wasser	4290 µl

Reaktionslösung:	
Probe	40 µl
Enzym-Lsg. mit NAD/ATP-Mix	260 µl

13. Bestimmung von Glutamat mittels *reversed-phase* HPLC

Zur Quantifizierung von Glutamat im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt 1-ml Proben entnommen und die Zellen sedimentiert (10 min, 16.100 *g*, 4 °C). Die Aminosäure-Analyse des Überstandes erfolgte unter Verwendung eines Agilent Technologies 1100 LC Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mit einer ODS Hypersil 120 x 4 mm Trennsäule (CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit 5 µm Partikelgröße und einer 40 x 4 mm Vorsäule. Die Aminosäure-Bestimmung erfolgte mittels *reversed-phase* HPLC nach Derivatisierung der Probe mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) nach Lindroth und Mopper (1979). Dies erfolgte durch eine automatisierte Derivatisierung, bei der 1 µl der zu analysierenden Probe mit 20 µl OPA/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt und eine Minute bei RT im Probenraum inkubiert wurde. Die Derivatisierung beruht auf der Reaktion der primären Aminogruppe mit OPA und 2-Mercaptoethanol in alkalischem Medium, wobei ein 1-Mercaptoethanol-2-alkylisoindol entsteht, das fluoresziert (Jones and Gilligan, 1983). Die Substanzen wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität mit einer Flussrate von 0,35 ml min^{-1} innerhalb der ersten Minute und von 0,6 ml min^{-1} innerhalb der folgenden 15 min bei 40 °C mit einem Gradienten (vgl. Abb. 4.1) aus 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2) als polarer Phase und Methanol als unpolarer Phase eluiert. Die Fluoreszenz der Aminosäure-Isoindol-Derivate wurde nach Excitation bei einer Wellenlänge von 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Identifizierung von Glutamat erfolgte anhand seiner Retentionszeit (ca. 6 min; abhängig vom Säulenzustand). Die

Glutamatkonzentration in der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Glutamat-Standard (0,1 – 1,5 mM) berechnet.

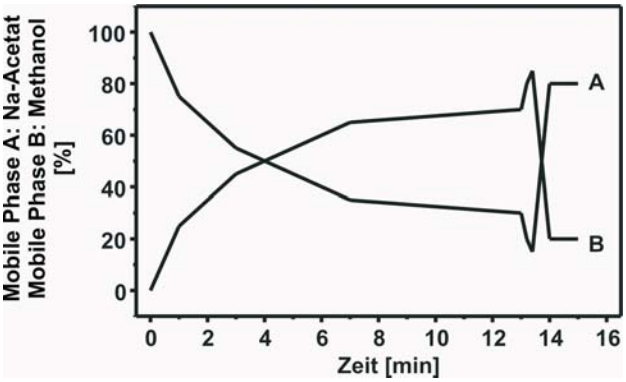


Abbildung 4.1: Zeitliche Gradientenzusammensetzung für die Elution von derivatisierten Aminosäuren bei der HPLC-analytischen Bestimmung.

V Ergebnisse

1 Charakterisierung des OdhI-Phosphorylierungsstatus und der Glutamat-Produktion verschiedener *C. glutamicum*-Stämme

Niebisch *et al*. (2006) konnten zeigen, dass der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (ODH) durch OdhI direkt und durch PknG indirekt posttranslational in *C. glutamicum* reguliert wird. Unphosphoryliertes OdhI bindet an OdhA, die E1o-Untereinheit des ODH-Komplexes, und hemmt dessen Aktivität. Im Hinblick auf die Eigenschaften von phosphoryliertem OdhI-Protein konnte gezeigt werden, dass gereinigtes und durch PknG phosphoryliertes OdhI im Gegensatz zu gereinigtem und unphosphoryliertem OdhI-Protein weniger weit in ein natives oder auch denaturierendes Polyacrylamidgel einwandert. Diese Eigenschaft eines veränderten Migrationsverhaltens im eindimensionalen SDS-Gel sollte zu Beginn dieser Arbeit ausgenutzt werden, um in der löslichen Proteinfraktion von verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen den OdhI-Phosphorylierungsstatus mit Hilfe eines Western-Blot-Assays zu analysieren.

1.1 Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse von OdhI

Zur Herstellung spezifisch bindender Anti-OdhI-Antikörper musste das OdhI-Protein gereinigt werden. Dazu wurde einerseits der *E. coli*-Stamm DH5α/pAN3K-*odhI* (Niebisch *et al*., 2006) und andererseits der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pET28b-*odhI* (vgl. Kapitel IV.5.1 und Abb. A5.1) in 100 ml LB-Medium bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 bei 37 °C kultiviert, dann die Überexpression des Zielgens durch Zugabe von 200 ng ml^{-1} AHT (*E. coli* DH5α/pAN3K-*odhI*) bzw. 1 mM IPTG (*E. coli* BL21(DE3)/pET28b-*odhI*) induziert, die Kulturen noch weitere 4 h bei 30 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Vor und stündlich nach Induktor-Zugabe wurden Proben entnommen, die Zellen durch Erhitzen in SDS-Ladepuffer lysiert und die Gesamtzellextrakte durch SDS-PAGE analysiert. Wie in Abb. 5.1-A (Spur 5) für die Überexpression mit dem Stamm *E. coli* DH5α/pAN3K-*odhI* und in Abb. 5.1-C (Spur 8) für den Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pET28b-*odhI* zu erkennen ist, wurde nach 4 h eine dominante Bande mit einer apparenten Masse von etwa 17 kDa sichtbar. Diese Banden entsprechen wahrscheinlich den Proteinen $OdhI_{Strep}$ (berechnete Masse 16,6 kDa) bzw. $OdhI_{His}$ (berechnete Masse 17,5 kDa).

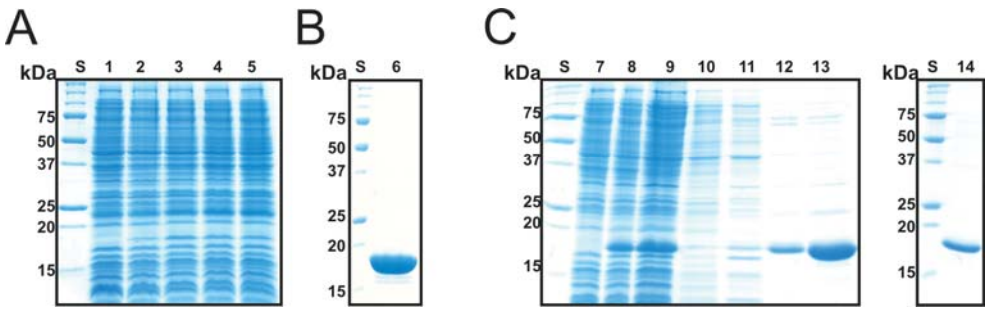


Abbildung 5.1: Analyse der Überproduktion und Reinigung von OdhI. (A) Überproduktion von $OdhI_{Strep}$ mit *E. coli* DH5α/pAN3K-*odhI*. S, Standard; 1, Zellen unmittelbar vor Induktion mit 200 ng ml^{-1} AHT; 2-5, Zellen 1, 2, 3, 4 h nach Induktion mit 200 ng ml^{-1} AHT. **(B)** Reinigung von $OdhI_{Strep}$ aus *E. coli* DH5α/pAN3K-*odhI*. S, Standard; 6, gepoolte Eluatfraktionen der *Strep*Tactin-Sepharose-Säule. **(C)** Überproduktion und Reinigung von $OdhI_{His}$ aus *E. coli* BL21(DE3)/pET28b-*odhI*. S, Standard; 7, Zellen unmittelbar vor Induktion mit 1 mM IPTG; 8, Zellen 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; 9, Ultrazentrifugationsüberstand; 10, Waschfraktion mit TNI5; 11, Waschfraktion mit TNI30; 12, Waschfraktion mit TNI50; 13, Waschfraktion mit TNI100; 14, Eluat der Ni^{2+}-NTA-Agarose-Säule mit TNI200. Es wurden 15 %-ige SDS-Gele verwendet.

Wie in Abb. 5.1-B ersichtlich wird, konnte $OdhI_{Strep}$ mittels *Strep*Tactin-Sepharose ohne sichtbare Verunreinigungen (bei Coomassie-Färbung) isoliert werden. Bei den Banden unterhalb von $OdhI_{Strep}$ handelt es sich vermutlich um Degradationsprodukte des Proteins. Bei der Isolierung von $OdhI_{His}$ mittels Ni^{2+}-NTA-Agarose wurden bereits große Mengen des Proteins mit TNI100-Puffer eluiert (vgl. Abb. 5.1-C; Spur 13), doch waren noch deutliche Verunreinigungen (bei Coomassie-Färbung) sichtbar. $OdhI_{His}$ wurde daraufhin mit TNI200-Puffer eluiert, wodurch die Anzahl an Verunreinigungen reduziert werden konnte (vgl. Abb. 5.1-C; Spur 14).

Um des Weiteren zu überprüfen, ob $OdhI_{Strep}$ und $OdhI_{His}$ in Lösung als Monomer, Dimer oder Oligomer vorliegen, sollte die native Masse mittels nativer Gelelektrophorese bestimmt werden, bei der Proteine nicht denaturiert, sondern lediglich nach ihrer Masse und Ladung aufgetrennt werden. Dazu wurden die beiden Proteine erneut gereinigt, diesmal allerdings mittels PD-10-Säulen in PBS-Puffer ($OdhI_{Strep}$) bzw. Kinase-Puffer ($OdhI_{His}$) umgepuffert, und 3,05 µg $OdhI_{Strep}$ bzw. 1,6 µg $OdhI_{His}$ auf einem nativen 4 – 16 %-igen Bis-Tris-Gradientengel (Invitrogen) aufgetrennt. In Abb. 5.2-A erkennt man, dass beide separierten Proteine auf der Höhe zwischen der 20 und der 66 kDa Bande des Standards laufen, so dass eine Masse von 30 – 40 kDa vermutet werden konnte, was auf eine dimere $OdhI_{Strep}$-Form (33,2 kDa) bzw. dimere $OdhI_{His}$-Form (35 kDa) hinweist.

Alternativ zur nativen Gelelektrophorese wurde $OdhI_{Strep}$ zusätzlich einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Dazu wurde $OdhI_{Strep}$ zunächst wie oben beschrieben gereinigt und für die Größenausschlusschromatographie 1 ml einer $OdhI_{Strep}$-Lösung in Puffer E über eine Superdex 200-Säule („prep grade“; 34 µm Partikelgröße;

16 mm Durchmesser; 60 cm Länge; Bettvolumen 120 ml) mit 1 ml min^{-1} Flussrate und KP-Puffer als Elutionspuffer aufgetrennt. Die Eichung erfolgte mit Cytochrom *c* (12,4 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Albumin (66 kDa) und Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa). Die Gelfiltration wurde vier Mal mit unterschiedlichen Proteinmengen (0,5 mg ml^{-1}; 0,9 mg ml^{-1}; 3 mg ml^{-1} und 4 mg ml^{-1}) durchgeführt und jedes Experiment ergab eine leicht unterschiedliche molekulare Masse für $OdhI_{Strep}$: 30,68 kDa (V_E = 86,95 ml), 28,23 kDa (V_E = 86,83 ml), 30,36 kDa (V_E = 91,03 ml) und 29,58 kDa (V_E = 90,23 ml). Das Chromatogramm bei Verwendung von 4 mg ml^{-1} $OdhI_{Strep}$ in Puffer E (ergab 29,58 kDa) sowie der Mittelwert der vier Versuchsdurchgänge (29,71 ± 0,95 kDa) sind in Abb. 5.2-B dargestellt.

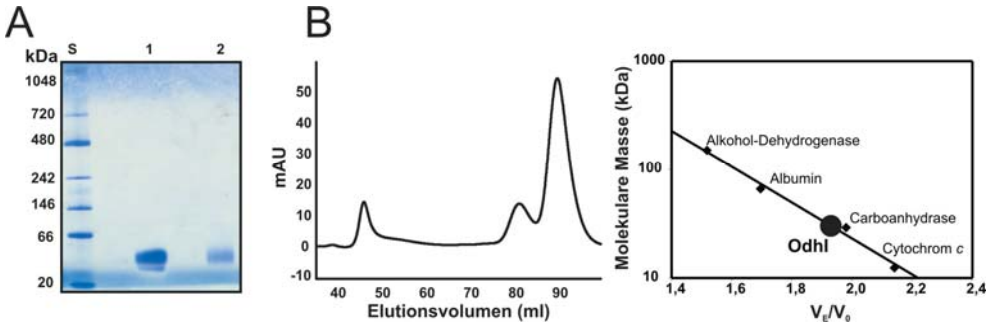


Abbildung 5.2: Native Gelelektrophorese und Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von OdhI. (A) Native Gelelektrophorese mit einem 4 – 16 %-igen Bis-Tris-Gradientengel (NativePAGE™ Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen). S, Standard; 1, 3,05 µg $OdhI_{Strep}$ (in PBS-Puffer); 2, 1,6 µg $OdhI_{His}$ (in Kinase-Puffer). **(B)** $OdhI_{Strep}$ (in Puffer E) und vier Standardproteine wurden über eine HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade"-Säule aufgetrennt (links dargestellt ist nur das Chromatogramm von $OdhI_{Strep}$). Als Elutionspuffer diente KP-Puffer. V_0 entspricht dem Ausschlussvolumen (44,58 ml) der Säule, das mit Dextranblau (2.000 kDa) bestimmt wurde. V_E entspricht dem Elutionsvolumen der verschiedenen Proteine.

Der Mittelwert von ca. 30 kDa liegt relativ nah bei der berechneten Masse für die dimere Form (33,2 kDa) und unterstützt somit das Ergebnis der nativen Gelelektrophorese. Der kleine Peak bei einem Elutionsvolumen von ungefähr 80 ml (entspräche 60 – 65 kDa) in Abb. 5.2-B konnte nach SDS-PAGE-Analyse und anschließender Coomassie-Färbung im Gegensatz zum dominanten Peak nicht $OdhI_{Strep}$ zugeordnet werden, doch ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um geringe Mengen tetrameres $OdhI_{Strep}$ handelt.

Für die Herstellung polyklonaler Anti-OdhI-Antikörper (Anti-OdhI) wurde $OdhI_{Strep}$ verwendet, indem 1,1 mg ml^{-1} gereinigtes $OdhI_{Strep}$-Protein nach Bestätigung mittels MALDI-TOF-MS-Analyse bei der Firma Biogenes (Berlin) zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt wurde. Die Spezifität des erhaltenen Anti-OdhI-Antiserums wurde im Anschluss mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von löslichen Proteinfraktionen aus verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen untersucht und es konnte die Spezifität gegen das

OdhI-Protein bestätigt werden (vgl. Abb. 5.3). Das Anti-OdhI-Antiserum wurde im Folgenden stets in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt, da stärkere Verdünnungen weniger deutliche Banden in den Western-Blot-Experimenten zeigten.

1.2 Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum* Wildtyp sowie den Mutanten Δ*pknG* und Δ*ppp*

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen mit dem hergestellten Anti-OdhI-Antiserum sollte nun im Folgenden der OdhI-Phosphorylierungsstatus im *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm, einer Δ*pknG*- (Niebisch *et al*., 2006) und einer Δ*ppp*-Mutante (Schultz *et al*., 2007) untersucht werden. Als Kontrolle dienten eine Δ*odhI*-Mutante (Niebisch *et al*., 2006) sowie $OdhI_{Strep}$-Protein, das aus *E. coli* gereinigt worden war und daher unphosphoryliert vorliegen sollte.

Die *C. glutamicum*-Kulturen wurden sowohl in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose als auch in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose über Nacht bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert, die Zellen in PBS-Puffer gewaschen und resuspendiert und die lösliche Proteinfraktion durch Zellaufschluss mittels Glasperlen und einer anschließenden Ultrazentrifugation gewonnen. Diese lösliche Proteinfraktion sowie gereinigtes OdhI wurden für die Western-Blot-Analysen eingesetzt. Wie in Abb. 5.3 deutlich wird, können mit dem Anti-OdhI-Antiserum in den Zellextrakten des Wildtyps und der Δ*pknG*-Mutante zwei OdhI-Formen nachgewiesen werden, in der Δ*odhI*-Mutante dagegen ist keine Bande sichtbar. Dieses Ergebnis bestätigt die Spezifität des Antiserums. Aufgrund (i) des Vergleichs mit aus *E. coli* gereinigtem unphosphoryliertem OdhI, (ii) des Ergebnisses der Δ*ppp*-Mutante und (iii) des Einflusses der Δ*pknG*-Deletion handelt es sich bei der OdhI-Bande mit der kleineren apparenten Masse um die unphosphorylierte Form und bei der OdhI-Bande mit der größeren apparenten Masse um die phosphorylierte OdhI-Form.

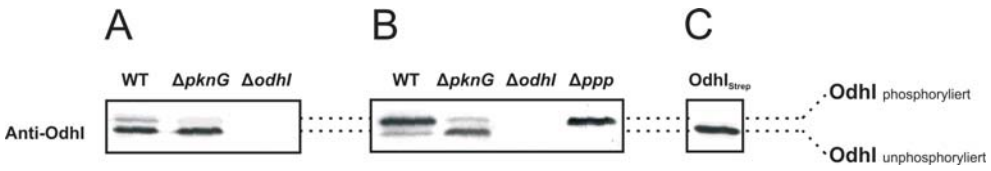


Abbildung 5.3: Western-Blot-Analysen löslicher Proteinfraktionen aus *C. glutamicum* Wildtyp und den Deletionsmutanten Δ*pknG*, Δ*odhI* und Δ*ppp* als auch gereinigtem $OdhI_{Strep}$. Es wurden 20 µg Gesamtprotein aus in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose **(A)** und aus in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultivierten Zellen **(B)** bzw. 0,025 µg gereinigtes $OdhI_{Strep}$-Protein **(C)** auf jeweils 15 %-igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Der Western-Blot erfolgte mit Anti-OdhI-Antiserum in einer 1:500-Verdünnung. Als sekundärer Antikörper diente Kaninchen-IgG-alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:3000); die Detektion erfolgte mit BCIP/NBT (siehe Material und Methoden).

Bei Wachstum in CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose liegt im Wildtyp der überwiegende Teil von OdhI unphosphoryliert vor. In der Δ*pknG*-Mutante ist der Anteil an phosphoryliertem OdhI nochmals reduziert, so dass auch unter diesen Bedingungen PknG wesentlich zur OdhI-Phosphorylierung beiträgt. Bei Wachstum in BHI-Medium mit 4 % (w/v) Glucose liegt im Wildtyp der überwiegende Teil von OdhI in der phosphorylierten Form vor. In der Δ*pknG*-Mutante ist dagegen die unphosphorylierte Form die dominierende. D.h., PknG ist ganz wesentlich für die Phosphorylierung von OdhI unter diesen Wachstumsbedingungen verantwortlich. Die stärkere Phosphorylierung von OdhI im Wildtyp bei Wachstum in BHI-Medium könnte auf die Anwesenheit von Glutamin oder Glutamat zurückzuführen sein (vgl. Kapitel V.1.9). Die Tatsache, dass auch in der Δ*pknG*-Mutante noch phosphoryliertes OdhI vorliegt, bestätigt die bereits früher gemachte Beobachtung, dass es auch eine PknG-unabhängige OdhI-Phosphorylierung durch eine oder mehrere der drei weiteren STPKs in *C. glutamicum* geben muss (Niebisch *et al*., 2006). In der Δ*ppp*-Mutante konnte nur die phosphorylierte Form von OdhI nachgewiesen werden. Das ist ein starkes Indiz für die Annahme, dass die STPP Ppp für die Dephosphorylierung von OdhI in *C. glutamicum* verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den 2-D-Gel-Analysen kann mit dieser Western-Blot-Methode nur zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem OdhI differenziert werden, nicht aber zwischen einfach und zweifach phosphoryliertem OdhI.

1.3 Überprüfung der OdhI-OdhA-Interaktion

Die OdhI-OdhA-Interaktion, die Niebisch *et al*. (2006) in Coreinigungsexperimenten mit dem *C. glutamicum*-Stamm ATCC 13032::pK18*mob-odhA*$_{Strep}$ zeigen konnten, sollte im Folgenden mit dem zu konstruierenden *C. glutamicum*-Stamm ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ erneut bestätigt werden. Der Vorteil der Verwendung einer nicht-überexprimierten, sondern chromosomal-„getaggten“ OdhI$_{Strep}$- bzw. OdhA$_{Strep}$-Variante in Coreinigungsexperimenten ist im Erhalt der physiologischen OdhI- bzw. OdhA-Konzentration in der Zelle begründet. Außerdem sollten diesmal auch solubilisierte Membranproteine der Aufdeckung weiterer möglicher OdhI-Interaktionspartner dienen.

1.3.1 Konstruktion des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ und Verwendung in Coreinigungsexperimenten

Das in *C. glutamicum* nicht replizierbare Plasmid pK18*mob-odhI*-Strep (vgl. Kapitel IV.5.2 und Abb. A5.6) wurde zu diesem Zweck in den *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm transferiert. Das Ergebnis einer Kolonie-PCR des nach Integration des Plasmides erhaltenen Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$, der auf Kanamycin-haltigem Medium

selektiert wurde, sowie des Wildtyp-Stammes als Kontrolle mit der Primerkombination OdhI-for/pk18mob-rev ist in Abb. 5.4-A dargestellt. Es konnte das erwartete 749-bp-PCR-Fragment für die Mutante nachgewiesen werden. Die lösliche Proteinfraktion dieser Mutante, die zuvor bis zu einer OD_{600} von 5 in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert wurde, diente der affinitätschromatographischen Aufreinigung von chromosomal-exprimiertem $OdhI_{Strep}$ mittels *Strep*Tactin-Sepharose. Da eine mögliche Interaktion auch von solubilisierten Membranproteinen mit $OdhI_{Strep}$ analysiert werden sollte, wurden im Anschluss in beiden Versuchsdurchgängen ungefähr 15 mg ml^{-1} solubilisierte Membranproteine nachträglich auf die *Strep*Tactin-Sepharose-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die gesamte Eluatfraktion mit eiskaltem Aceton gefällt und das präzipitierte Proteinpellet nach Resuspension in 100 µl Puffer W^+ *via* SDS-PAGE untersucht.

Wie in Abb. 5.4-B ersichtlich wird, konnte in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten OdhA mit dem chromosomal *Strep*-„getaggten“ OdhI-Protein cogereinigt werden. Das mittels MALDI-TOF-MS-Analyse zusätzlich identifizierte hypothetische Protein Cg2444 (vgl. Tabelle A3) konnte nur in einem der beiden Experimente bei Coomassie-Färbung der 15 %-igen SDS-Gele nachgewiesen werden. Das Protein AccBC (Cg0802; vgl. Tabelle A3) wird bei unzureichender Absättigung der Proteinprobe mit tetramerem Avidin bei der Affinitätschromatographie mit *Strep*Tactin-Sepharose cogereinigt. Obwohl bei Kultivierung in Glucose-haltigem Medium keine weiteren Proteine in einer zu OdhA-vergleichbaren Menge mit $OdhI_{Strep}$ cogereinigt werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass unter anderen Kultivierungsbedingungen weitere Proteine mit OdhI interagieren.

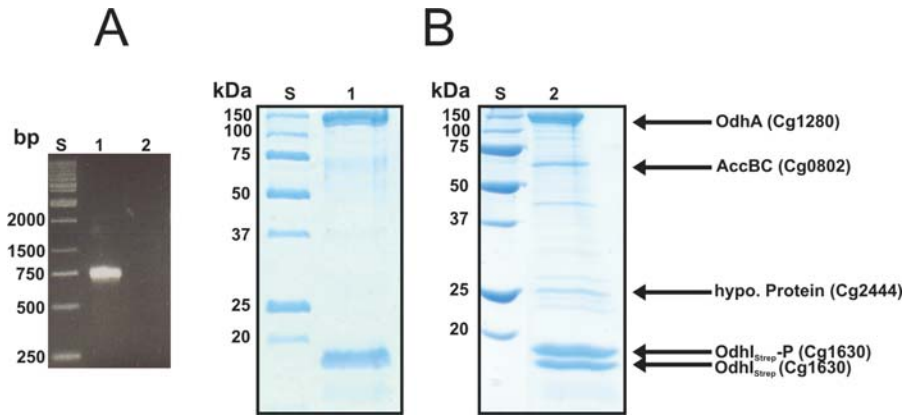


Abbildung 5.4: Kolonie-PCR des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ und Coreinigungsexperimente mit *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$. (A) Kolonie-PCR von *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ (Spur 1) und *C. glutamicum* ATCC 13032 (Spur 2) mit der Primerkombination OdhI-for/pK18mob-rev; S, Standard. **(B)** SDS-PAGE-Analyse der Eluatfraktionen aus den Coreinigungsexperimenten mit dem Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ aus zwei unabhängigen Versuchen (Spuren 1 und 2). Die Proteine wurden auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. S, Standard.

1.4 Einfluss einer *pknG*-Deletion auf die Glutamat-Produktion

Der reduzierte Phosphorylierungsgrad von OdhI in einer Δ*pknG*-Mutante (vgl. Abb. 5.3) könnte eine Erhöhung der Glutamat-Bildung mit diesem Deletionsstamm auf Grund einer stärkeren Inhibition der ODH-Aktivität zur Folge haben (Niebisch *et al*., 2006). Es existieren verschiedenste Kultivierungsbedingungen, unter denen *C. glutamicum* Glutamat ins Medium sekretiert, doch der genaue dafür verantwortliche molekulare Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Es wurde vermutet, dass OdhI und PknG dabei eine wichtige Rolle spielen könnten.

Im Folgenden wurden die beiden Stämme *C. glutamicum* Wildtyp und Δ*pknG* in mindestens drei unabhängigen Versuchen unter vier verschiedenen Bedingungen kultiviert, die entweder durch Reduzierung der Biotin-Konzentration im Kultivierungsmedium von 200 µg l^{-1} auf nur noch 2,5 oder 1 µg l^{-1} (vgl. Abb. 5.5-B) bzw. durch Zugabe von 2 g l^{-1} Tween-40 (vgl. Abb. 5.5-C), 750 U l^{-1} Penicillin G (vgl. Abb. 5.5-D) oder 500 mg l^{-1} Ethambutol (vgl. Abb. 5.5-E) zur Ausscheidung von Glutamat ins Medium führen. Dabei wurde das Wachstum, der Glucose-Verbrauch sowie die Glutamat-Bildung beider Stämme unter den genannten Kultivierungsbedingungen miteinander verglichen. Die Kultivierung in Standard-CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose, unter denen beide Stämme kein Glutamat ins Kulturmedium ausscheiden, diente als Kontrolle (vgl. Abb. 5.5-A). Die End-OD_{600} nach 48 h, die Glutamat-Konzentration im Kulturüberstand sowie der Ertrag als auch die spezifische Produktivität dieser beiden Stämme sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Unter Biotin-limitierenden Bedingungen mit 1 µg l^{-1} Biotin wurde nicht nur ein deutlich besseres Wachstum der Δ*pknG*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, sondern auch eine um 430 % gesteigerte Glutamat-Konzentration im Kulturüberstand. Unter Kultivierungsbedingungen mit 2,5 µg l^{-1} Biotin (in Abb. 5.5 nicht dargestellt) konnte dagegen für den Wildtyp ein besseres Wachstum beobachtet werden und eine um 300 % höhere Glutamat-Produktion im Vergleich zur Δ*pknG*-Mutante. Bei Zugabe von Tween-40 zeigte der Δ*pknG*-Stamm ein vergleichbares Wachstum und eine vergleichbare Glutamat-Bildung wie der Wildtyp (vgl. Abb. 5.5-C). Die Δ*pknG*-Mutante zeigte eine höhere Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Penicillin G mit der Folge eines stark reduzierten Wachstums und einer geringeren Glutamat-Bildung. Dennoch konnte mit dieser Mutante eine höhere spezifische Produktivität im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (3,08 g Glutamat/g Biomasse im Vergleich zu 1,97 g Glutamat/g Biomasse). Unter der letzten getesteten Kultivierungsbedingung, bei der durch die Zugabe von Ethambutol die Glutamat-Produktion induziert wurde, konnte mit dem Δ*pknG*-Deletionsstamm eine um 84 % gesteigerte Glutamat-Produktion im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden bei vergleichbarem Wachstum.

Somit kann eine Δ*pknG*-Mutante unter Biotin-Mangelbedingungen und nach Ethambutol-Behandlung zu einer signifikanten Steigerung der Glutamat-Produktion mittels *metabolic engineering* eingesetzt werden.

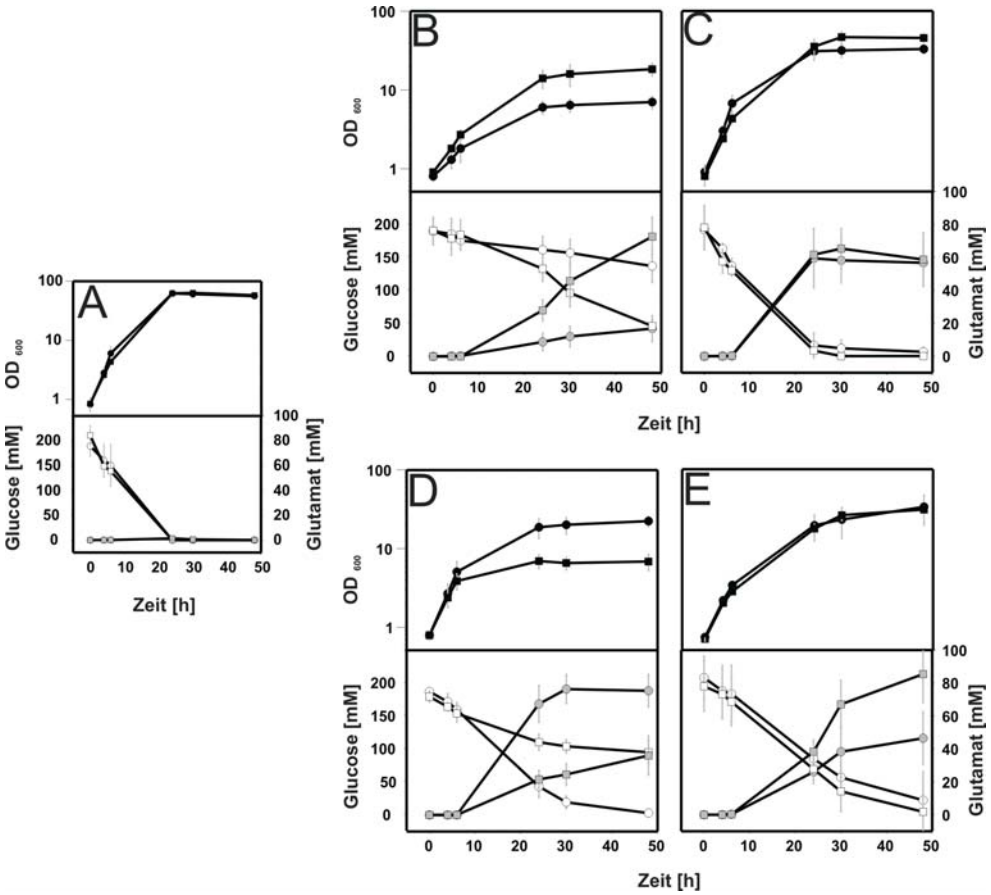


Abbildung 5.5: Vergleichende Analyse des Wachstums (schwarze Symbole), des Glucose-Verbrauchs (weiße Symbole) und der Glutamat-Bildung (graue Symbole) der Stämme *C. glutamicum* Wildtyp (Kreis) und *C. glutamicum* Δ*pknG* (Quadrat) unter fünf verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Kultivierung beider Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose **(A)** und unter Glutamat-induzierenden Bedingungen, die durch Biotin-Limitation (1 µg l^{-1}) **(B)** bzw. durch die Zugabe von Tween-40 (2 g l^{-1}) **(C)**, Penicillin G (750 U l^{-1}) **(D)** oder Ethambutol (500 mg l^{-1}) **(E)** erreicht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

1.5 Einfluss der Deletion von *odhI* oder *odhI* und *pknG* auf die Glutamat-Produktion

In einer nächsten Versuchsserie wurde die Glutamat-Produktion mit der Δ*odhI*-Mutante analysiert sowie einer Δ*pknG*Δ*odhI*-Doppelmutante (Niebisch *et al*., 2006). In beiden Fällen wurde eine Reduzierung der Glutamat-Bildung auf Grund einer fehlenden ODH-Inhibition vermutet.

Ohne Glutamat-induzierende Bedingungen konnte auch mit diesen beiden Deletionsstämmen kein Glutamat im Kulturüberstand nach Wachstum in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.6-A). Die Ergebnisse für den *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm entsprechen denen aus Abb. 5.5 und werden in Abb. 5.6 zum Vergleich nochmals dargestellt. Es wird in Abb. 5.6 deutlich, dass die Δ*odhI*-Mutante sowohl unter Biotin-limitierenden Bedingungen als auch nach Zugabe von Tween-40, Penicillin G oder Ethambutol nur 1 % bis maximal 13 % der Glutamat-Konzentration bildet, die in Kulturüberständen des Wildtyps zu finden ist. Ein ähnliches Bild ergab sich mit der Δ*pknG*Δ*odhI*-Doppelmutante, die auch nur maximal 32 % des Wildtyp-Niveaus bzgl. der Glutamat-Produktion erreichte. Das zeigt, dass die Anwesenheit des OdhI-Proteins essentiell für eine effiziente Glutamat-Bildung ist (vgl. auch Tab. 5.1).

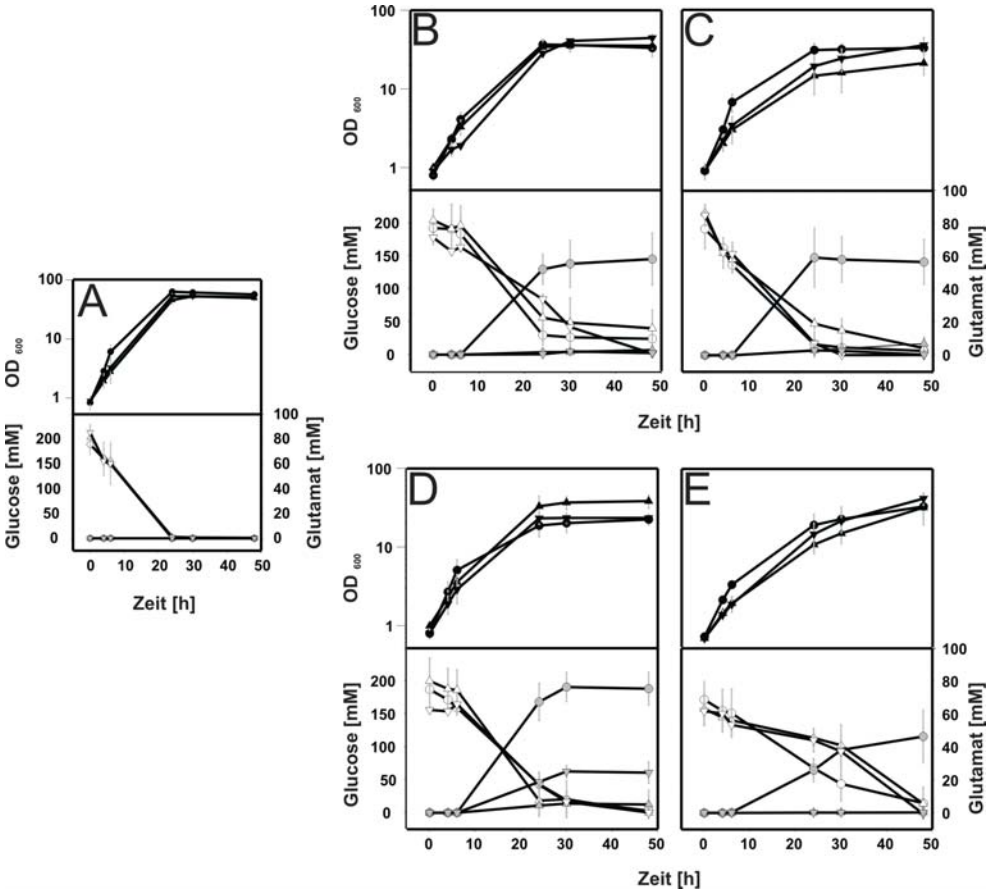


Abbildung 5.6: Vergleichende Analyse des Wachstums (schwarze Symbole), des Glucose-Verbrauchs (weiße Symbole) und der Glutamat-Bildung (graue Symbole) der Stämme *C. glutamicum* Wildtyp (Kreis), *C. glutamicum* Δ*odhI* (Dreieck nach oben) und *C. glutamicum* Δ*pknG*Δ*odhI* (Dreieck nach unten) unter fünf verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Kultivierung beider Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose **(A)** und unter Glutamat-induzierenden Bedingungen, die durch Biotin-Limitation (2,5 µg l^{-1}) **(B)** und durch die Zugabe von Tween-40 (2 g l^{-1}) **(C)**, Penicillin G (750 U l^{-1}) **(D)** bzw. Ethambutol (500 mg l^{-1}) **(E)** erreicht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

1.6 Komplementation einer *odhI*-Deletion und Einfluss auf die Glutamat-Produktion

Um sicherzustellen, dass der nahezu vollständige Verlust der Fähigkeit zur Glutamat-Sekretion der Δ*odhI*-Mutante einzig und allein auf die Deletion des *odhI*-Gens zurückzuführen ist (vgl. Abb. 5.6), sollte die *odhI*-Deletion mit Hilfe des Plasmids pJC1-*odhI* (Niebisch *et al.*, 2006) komplementiert werden und die Glutamat-Bildung dieses Stammes untersucht werden. Dieses Plasmid kodiert für ein $OdhI_{Strep}$-Protein unter der Kontrolle seines

nativen Promotors. Aufgrund der Kopienzahl des pJC1-Plasmids (10 – 30) wird auch die Anzahl der OdhI-Moleküle in der Zelle entsprechend erhöht sein. Komplementativ wurde das Plasmid pJC1-*odhI* in den Δ*odhI*-Stamm transferiert. In drei unabhängigen Versuchen zeigte der Stamm *C. glutamicum*/pJC1-*odhI* eine zum Wildtyp vergleichbare Glutamat-Produktion nach Behandlung der Zellen mit Penicillin G und Tween-40 sowie unter Biotin-limitierenden Bedingungen bei Verwendung von 2,5 µg l^{-1} Biotin (vgl. Abb. 5.7 und Tab. 5.1). Einzig nach Zugabe von Ethambutol zeigte die komplementierte Δ*odhI*-Mutante eine geringere Glutamat-Bildung als der Wildtyp, was aber vermutlich auf das reduzierte Wachstum dieses Stammes zurückzuführen ist (vgl. Abb. 5.7-E und Tab. 5.1).

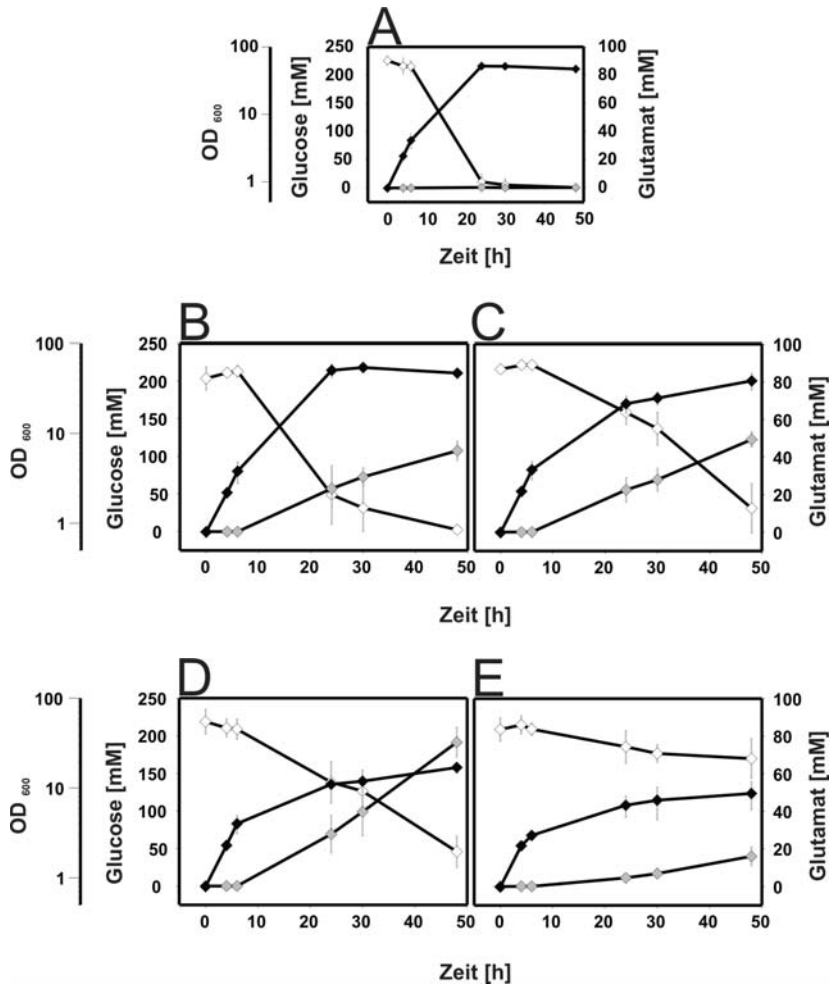


Abbildung 5.7: Analyse des Wachstums (schwarze Symbole), des Glucose-Verbrauchs (weiße Symbole) und der Glutamat-Bildung (graue Symbole) des Stammes *C. glutamicum* Δ*odhI*/pJC1-*odhI* unter fünf verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose **(A)** und unter Glutamat-induzierenden Bedingungen, die durch Biotin-Limitation (2,5 µg l^{-1}) **(B)** bzw. durch die Zugabe von Tween-40 (2 g l^{-1}) **(C)**, Penicillin G (750 U l^{-1}) **(D)** oder Ethambutol (500 mg l^{-1}) **(E)** erreicht wurden. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

1.7 Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer *pknG*- und *odhI*-Deletion auf die Glutamat-Produktion

Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen (vgl. Kapitel V.1.4 – 1.6) mit den fünf *C. glutamicum*-Stämmen Wildtyp, Δ*pknG*, Δ*odhI*, Δ*pknG*Δ*odhI* und Δ*odhI*/pJC1-*odhI* unter den vier verschiedenen Glutamat-induzierenden Bedingungen sowie in Abwesenheit von Glutamat-Induktion sind in Tab. 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung des Wachstums (OD_{600}), der Glutamat-Bildung (mM), des Ertrages (g Glutamat/g Glucose) sowie der spezifischen Produktivität (g Glutamat/g Zelltrockenmasse) der *C. glutamicum* Stämme Wildtyp, Δ*pknG*, Δ*odhI*, Δ*pknG*Δ*odhI* und Δ*odhI*/pJC1-*odhI* bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose unter nicht-induzierenden Bedingungen bzw. unter vier verschiedenen Glutamat-induzierenden Bedingungen, die durch Biotin-Limitation (2,5 oder 1 µg l^{-1}) oder Zugabe von Tween-40 (2 g l^{-1}), Penicillin G (750 U l^{-1}) oder Ethambutol (500 mg l^{-1}) erreicht wurden. Die Werte resultieren aus mindestens drei unabhängigen Kultivierungen und stellen Mittelwerte dar. Die Streuung ist als Standardabweichung angegeben. Die Zelltrockenmasse (TZ) wurde aus der OD_{600} berechnet (0,25 g (TZ) l^{-1} pro OD_{600} = 1).

		Wildtyp	Δ*pknG*	Δ*odhI*	Δ*pknG*Δ*odhI*	Δ*odhI*/ pJC1-*odhI*
OD_{600}	Nicht induziert	56,0 ± 3,8	57,9 ± 5,2	48,7 ± 3,1	50,4 ± 3,1	47,0 ± 6,0
	- Biotin (2.5 µg l^{-1})	33,2 ± 7,5	51,2 ± 8,2	35,4 ± 3,0	44,4 ± 5,1	46,9 ± 4,5
	- Biotin (1 µg l^{-1})	7,0 ± 1,3	18,3 ± 3,3	/	/	/
	+ Tween-40 (2 g l^{-1})	32,8 ± 4,1	45,4 ± 5,8	21,0 ± 6,2	35,6 ± 8,9	39,0 ± 8,0
	+ Penicillin G (750 U l^{-1})	22,5 ± 3,5	6,9 ± 1,6	38,5 ± 7,3	23,5 ± 1,6	16,9 ± 2,2
	+ Ethambutol (500 mg l^{-1})	33,2 ± 13,8	30,7 ± 3,0	32,4 ± 10,1	41,9 ± 7,4	8,8 ± 3,0
Glutamat	Nicht induziert	0	0	0	0	0
(mM)	- Biotin (2.5 µg l^{-1})	58,1 ± 15,9	19,3 ± 6,5	2,8 ± 0,6	1,0 ± 1,1	43,0 ± 5,0
	- Biotin (1 µg l^{-1})	16,9 ± 7,9	72,7 ± 11,9	/	/	/
	+ Tween-40 (2 g l^{-1})	56,7 ± 13,6	58,7 ± 16,3	7,1 ± 3,5	0,4 ± 0,4	49,3 ± 4,0
	+ Penicillin G (750 U l^{-1})	75,4 ± 9,9	36,1 ± 11,9	5,0 ± 8,6	24,4 ± 6,4	76,5 ± 7,8
	+ Ethambutol (500 mg l^{-1})	46,5 ± 16,1	85,4 ± 17,4	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,4	16,1 ± 4,8
Ertrag	Nicht induziert	0	0	0	0	0
(g Glutamat/g Glucose)	- Biotin (2.5 µg l^{-1})	0,24	0,07	0,01	0	0,16
	- Biotin (1 µg l^{-1})	0,16	0,34	/	/	/
	+ Tween-40 (2 g l^{-1})	0,21	0,22	0,03	0	0,21
	+ Penicillin G (750 U l^{-1})	0,28	0,23	0,02	0,09	0,35
	+ Ethambutol (500 mg l^{-1})	0,19	0,32	0	0	0,25
Spezifische Produktivität	Nicht induziert	0	0	0	0	0
(g Glutamat/g TZ)	- Biotin (2.5 µg l^{-1})	1,03	0,22	0,05	0,01	0,54
	- Biotin (1 µg l^{-1})	1,42	2,34	/	/	/
	+ Tween-40 (2 g l^{-1})	1,02	0,76	0,20	0,01	0,74
	+ Penicillin G (750 U l^{-1})	1,97	3,08	0,08	0,61	2,66
	+ Ethambutol (500 mg l^{-1})	0,82	1,64	0,01	0	1,08

\- Mangel im Kultivierungsmedium (Biotin)
\+ Zugabe zum Kultivierungsmedium (Tween-40, Penicillin G, Ethambutol)
/ nicht bestimmt

1.8 Untersuchungen des OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum* Wildtyp unter Glutamat-induzierenden Bedingungen

Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die verschiedenen Glutamat-induzierenden Bedingungen einen Einfluss auf den OdhI-Phosphorylierungsstatus im Verlaufe der Kultivierung haben. Dazu wurde erneut die Western-Blot-Methode unter Verwendung des Anti-OdhI-Antiserums zur Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus herangezogen.

Der *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm wurde sowohl unter nicht-induzierenden als auch unter Glutamat-induzierenden Bedingungen, die durch Biotin-Limitation (2,5 µg l^{-1} Biotin) bzw. durch die Zugabe von Tween-40 (2 g l^{-1}), Penicillin G (750 U l^{-1}) oder Ethambutol (500 mg l^{-1}) zum Kulturmedium erreicht wurden, in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert. Die zu den in Abb. 5.8-A angegebenen Zeitpunkten (nach 4, 6, 8, 24, 30 und 48 h) entnommenen 5-ml Proben wurden den in Abb. 5.5 dargestellten Kulturen entnommen. Parallel dazu wurde *C. glutamicum* Wildtyp auch in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose unter nicht-induzierenden und Glutamat-induzierenden Bedingungen kultiviert. In diesem Medium liegt mehr OdhI-Protein in der phosphorylierten Form vor (vgl. Abb 5.3), so dass ein Übergang von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem OdhI besser zu detektieren sein sollte. Die Kulturüberstände dieser in BHI-Komplexmedium kultivierten Zellen gestatteten aber nicht die Bestimmung der Glutamat-Konzentration *via* HPLC und enzymatische Tests zur Glutamat-Bestimmung wurden nicht herangezogen, doch ist eine Glutamat-Produktion auch in diesem Medium sehr wahrscheinlich. Von den zu den verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurden jeweils 20 µg der löslichen Proteinfraktionen für die Western-Blot-Analysen eingesetzt.

Die Western-Blot-Analysen wurden mit zwei unabhängigen Kultivierungen des *C. glutamicum* Wildtyp-Stammes unter den genannten Bedingungen durchgeführt (vgl. Abb. 5.8). Es konnte mit dieser Methode festgestellt werden, dass nur unter Biotin-limitierenden Bedingungen in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose eine deutlich reduzierte Menge an phosphoryliertem OdhI im Vergleich zu nicht-induzierenden Bedingungen im gesamten Verlauf der Kultivierung detektierbar ist. Die Zugabe von Penicillin G und Ethambutol hatte hingegen keinen klar erkennbaren Einfluss auf den OdhI-Phosphorylierungsstatus. Die Zugabe von Tween-40 hatte ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von OdhI, auch wenn in Abb. 5.8-A in einem der beiden Versuche (a) nach 24, 30 und 48 h eine geringere Menge an phosphoryliertem OdhI detektierbar war, was im zweiten Versuch (b) jedoch eindeutig nicht zu erkennen war. Des Weiteren fiel auf, dass vor allem in der stationären Wachstumsphase nach 24 h die Menge an phosphoryliertem OdhI unter fast allen Bedingungen zuzunehmen scheint. Eine Erklärung könnte der erhöhte Bedarf an aktiver ODH im Tricarbonsäurezyklus in dieser Phase der

Kultivierung sein, was durch verstärkt phosphoryliertes OdhI-Protein gewährleistet werden könnte.

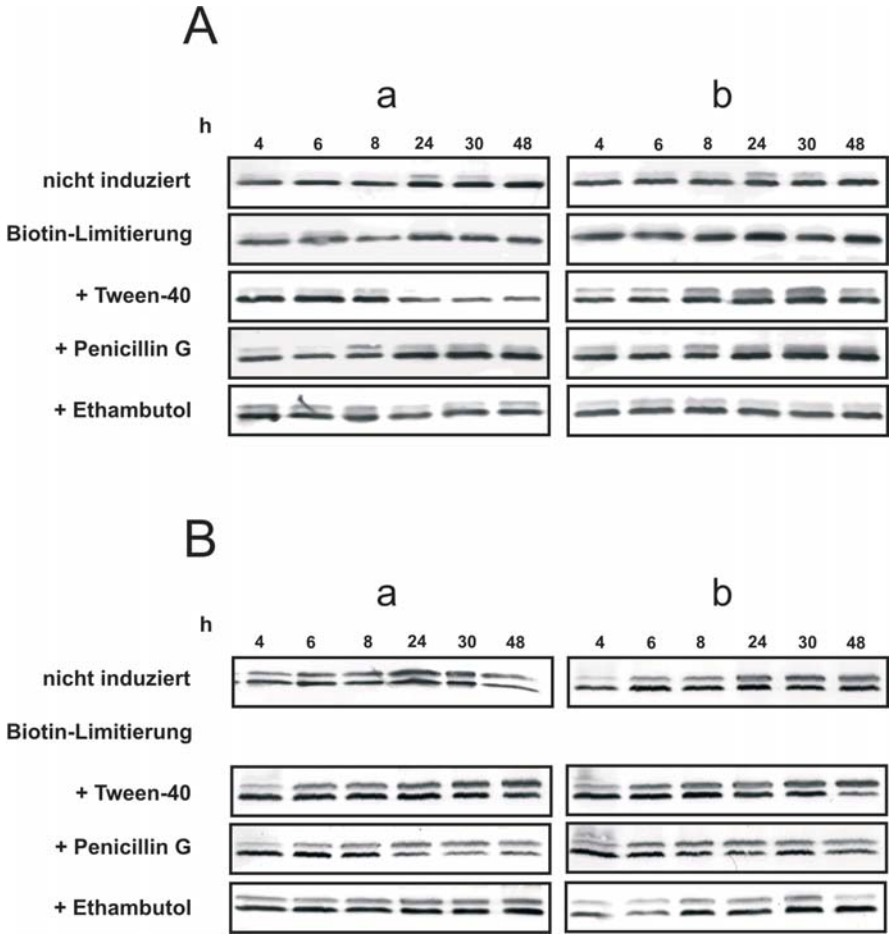


Abbildung 5.8: Western-Blot-Analysen löslicher Proteinfraktionen aus *C. glutamicum* Wildtyp mit Anti-OdhI-Antikörpern zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung (nach 4, 6, 8, 24, 30, 48 h) unter nicht-induzierenden bzw. Glutamat-induzierenden Kultivierungsbedingungen (Biotin-Limitierung (2,5 µg l^{-1}) und nach Zugabe von Tween-40 (2 g l^{-1}), Penicillin G (750 U l^{-1}) oder Ethambutol (500 mg l^{-1})). *C. glutamicum* Wildtyp wurde in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose **(A)** oder in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose **(B)** in zwei unabhängigen Versuchen (a, b) kultiviert. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein auf einem 15 %-igen SDS-Gel separiert.

1.9 Versuche zur Identifizierung von OdhI-Phosphorylierungsstimuli

Eine Δ*pknG*-Deletionsmutante zeigt einen Wachstumsdefekt auf Medium mit Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (Niebisch *et al.*, 2006). Dieser Effekt wurde in einer Δ*pknG*Δ*odhI*-Doppel- wie auch einer Δ*odhI*-Einfachmutante nicht beobachtet, so dass der

Wachstumsdefekt der Δ*pknG*-Mutante vermutlich auf eine erhöhte Präsenz an unphosphoryliertem OdhI-Protein in dieser Mutante und eine damit einhergehende starke Inhibition der ODH-Aktivität zurückzuführen ist. In Abwesenheit von OdhI ist diese Hemmung und damit auch der Wachstumsdefekt aufgehoben. Somit scheint eine aktive ODH für Wachstum auf Glutamin-Medium essentiell zu sein, so dass vermutet werden konnte, dass OdhI in Zellen, die in Glutamin-Medium kultiviert werden, auch stärker phosphoryliert vorliegt als in Zellen, die z.B. mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. Diese Vermutung sowie weitere mögliche Stimuli, die zur verstärkten Phosphorylierung von OdhI führen, sollten mittels der Western-Blot-Methode untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde der *C. glutamicum* Wildtyp unter den in Kapitel IV.7.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Der OdhI-Phosphorylierungsstatus wurde in Zellen untersucht, die für max. 60 min mit 50 mM Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle kultiviert wurden. Des Weiteren wurden Kultivierungsbedingungen geschaffen, die zur Stickstoff-, Kohlenstoff-, Phosphat- oder Eisenlimitation sowie zur Inhibition der Atmungskette bzw. der Cytochrom aa_3-Oxidase durch 5 mM Kaliumcyanid führten. Als Kontrolle wurde *C. glutamicum* Wildtyp in Standard-CGXII-Medium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert. In Abb. 5.9 wird deutlich, dass OdhI nur in Zellen, die in Glutamin-Medium als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle inkubiert wurden, im Vergleich zu in Glucose kultivierten Zellen vermehrt phosphoryliert vorliegt. Da es sich um einen einmaligen Versuch handelt, müssten noch mind. zwei weitere Versuchsdurchgänge folgen.

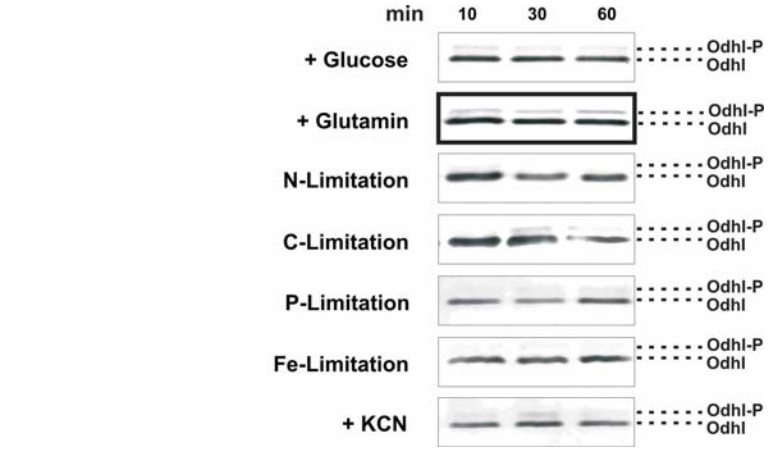


Abbildung 5.9: Western-Blot-Analysen löslicher Proteinfraktionen aus *C. glutamicum* Wildtyp mit Anti-OdhI-Antikörpern zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 10, 30, 60 min) unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Kultivierungsbedingungen sind in Kapitel IV.7.2 detailliert beschrieben. Es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt.

2 Einfluss von PknA, PknB und PknL auf den *in-vivo*-OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum*

2.1 Konstruktion und Charakterisierung verschiedener Ser-/Thr-Proteinkinase-Deletionsmutanten

Die Western-Blot-Analyse zur Untersuchung des OdhI-Phosphorylierungsstatus in einer Δ*pknG*-Deletionsmutante ergab (vgl. Abb. 5.3), so wie es auch schon von Niebisch *et al*. (2006) vermutet wurde, dass OdhI nicht nur durch PknG, sondern höchstwahrscheinlich auch durch mindestens eine der drei weiteren in *C. glutamicum* vorkommenden Ser-/Thr-Proteinkinasen (STPKs) phosphoryliert wird. Neben PknG (Cg3046) sind noch drei membranständige STPKs annotiert, namentlich PknA (Cg0059), PknB (Cg0057) und PknL (Cg2388) (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003). Um mit der Western-Blot-Methode herauszufinden, welche STPKs OdhI zusätzlich phosphorylieren können, sollten einerseits die bereits vorliegenden Einfachdeletionsmutanten Δ*pknA* (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten), Δ*pknB* (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten), Δ*pknL* (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten), Δ*pknA*Δ*pknL* (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten) und Δ*pknB*Δ*pknL* (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten) analysiert werden sowie andererseits weitere STPK-Doppel- und Dreifach-Deletionsmutanten konstruiert und untersucht werden, denen eine Deletion des *pknG*-Gens gemeinsam ist.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmidkonstrukt pK19*mobsacB*-Δ*pknG* (Niebisch *et al*., 2006) in die vorliegenden STPK-Deletionsmutanten Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknL* und Δ*pknB*Δ*pknL* transferiert. Das weitere Vorgehen ist im Material-und-Methoden-Teil beschrieben. Bei erfolgreicher *pknG*-Deletion bleiben lediglich sechs 5´-terminale (ATG AAG GAT AAT GAA GAT) und zehn 3´-terminale Codons ohne das Stop-Codon (GCG AAT GCC GTG CGG CCA CTG AGT TGG TTC) des *pknG*-Gens erhalten, die durch eine artifizielle 21-bp-Sequenz (TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG) miteinander verbunden sind. In Tabelle 5.2 sind die in dieser Arbeit konstruierten STPK-Deletionsmutanten aufgelistet.

Tabelle 5.2: Auflistung der in dieser Arbeit konstruierten STPK-Deletionsmutanten.

Konstruktion von	Anzahl getesteter Saccharose -resistenter und Kanamycin -sensitiver Klone	Anzahl dieser getesteten Klone, die die *pknG*-Deletion enthielten
Δ*pknA*Δ*pknG*	10	10
Δ*pknB*Δ*pknG*	5	2
Δ*pknL*Δ*pknG*	5	5
Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG*	33	3
Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*	10	9

Die Überprüfung der eingeführten *pknG*-Deletion sowie der *pknA*-, *pknB*- und *pknL*-Gene in diesen neu konstruierten STPK-Deletionsmutanten erfolgte durch zwei verschiedene Kolonie-PCR-Ansätze. Bei der einen Kolonie-PCR-Variante (Spur A2, B2, G2 bzw. L2 in Tab. 5.3) binden die eingesetzten Primer außerhalb des zu deletierenden Bereiches, so dass im Falle einer erfolgreichen Deletion bei der Deletionsmutante ein kürzeres PCR-Fragment im Vergleich zum Wildtyp entsteht, wohingegen bei der zweiten Kolonie-PCR-Variante (Spur A1, B1, G1, L1 in Tab. 5.3) einer der Primer im zu deletierenden Genbereich bindet, so dass im Falle einer erfolgreichen Deletion mit dieser Variante kein PCR-Produkt mit DNA aus der Deletionsmutante erhalten werden kann. Die eingesetzten Primer und die daraus resultierenden PCR-Fragment-Größen sind in Tab. 5.3 zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primerkombinationen zur Verifizierung der *pknA*-, *pknB*-, *pknG*- und *pknL*-Deletion und der zu erwartenen PCR-Fragment-Größen in *C. glutamicum* Wildtyp bzw. einer entsprechenden Deletionsmutante. Das Resultat der entsprechenden PCR-Reaktionen ist in Abb. 5.10 dargestellt.

Spur	Gen-Verifizierung	Primerkombination		WT	Mutante
A1	*pknA*	Δ*pknA*-for	Δ*pknA*-rev2	881 bp	X
B1	*pknB*	Δ*pknB*-for	Δ*pknB*-rev2	1260 bp	X
G1	*pknG*	Δ*pknG*-for	Δ*pknG*-rev2	1400 bp	X
L1	*pknL*	Δ*pknL*-for	Δ*pknL*-rev2	1320 bp	X
A2	*pknA*	Δ*pknA*-for	Δ*pknA*-4	2161 bp	1029 bp
B2	*pknB*	Δ*pknB*-for	Δ*pknB*-1	3006 bp	1027 bp
G2	*pknG*	Δ*pknG*-for	Δ*pknG*-rev	3764 bp	1364 bp
L2	*pknL*	Δ*pknL*-for	Δ*pknL*-rev	3640 bp	1502 bp

In Abb. 5.10 sind die Kolonie-PCRs für die neu konstruierten Mutanten Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknB*Δ*pknG*, Δ*pknL*Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* dargestellt. In allen Fällen wurden die erwarteten PCR-Produkte erhalten und damit die Korrekheit der Mutanten bestätigt. Die Tatsache, dass alle dargestellten Einfach-, Zweifach- und Dreifach-Mutanten erhalten wurden, zeigt, dass keine der vier STPKs von *C. glutamicum* essentiell ist.

Die einzige Kombination, die nicht erhalten wurde, ist die gleichzeitige Deletion von *pknA* und *pknB*, die mit Hilfe des Plasmids pK19*mobsacB*-Δ*pknAB* (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten) konstruiert werden sollte. Bei Überprüfung von mehr als 50 Saccharose-resistenten und Kanamycin-sensitiven Klonen mit der Primerkombination Δ*pknA*-for/Δ*pknB*-for wurde immer nur die Wildtyp-Situation nachgewiesen.

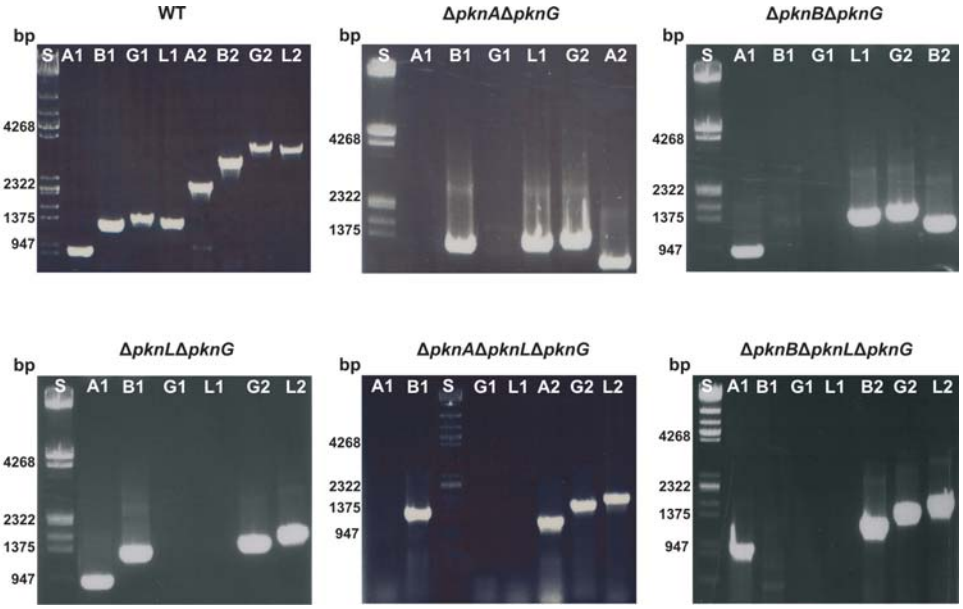


Abbildung 5.10: Analyse der neu konstruierten *C. glutamicum* STPK-Deletionsmutanten im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm mittels Kolonie-PCR. Die in den Spuren A1, B1, G1, L1, A2, B2, G2 und L2 verwendeten Primerkombinationen sind in Tabelle 5.3 aufgelistet inklusive der zu erwartenen PCR-Fragmentgrößen. S, Standard.

Als nächstes sollte das Wachstumsverhalten der Stämme untersucht werden. In Abb. 5.11 ist das Wachstum der neu konstruierten sowie der bereits vorliegenden STPK-Deletionsmutanten Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknG*, Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknL* und Δ*pknB*Δ*pknL* in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose dargestellt. Zusätzlich zu den STPK-Deletionsmutanten wurde das Wachstum der Phospho-Ser-/Thr-Proteinphosphatase-Deletionsmutante (STPP) *C. glutamicum* Δ*ppp* untersucht. Das Ergebnis dieser Versuche war, dass die Wachstumsrate μ generell umso mehr sank, je mehr STPKs gleichzeitig deletiert vorlagen. Die geringste Wachstumsrate zeigt jedoch die Δ*ppp*-Mutante (vgl. Tabelle 5.4).

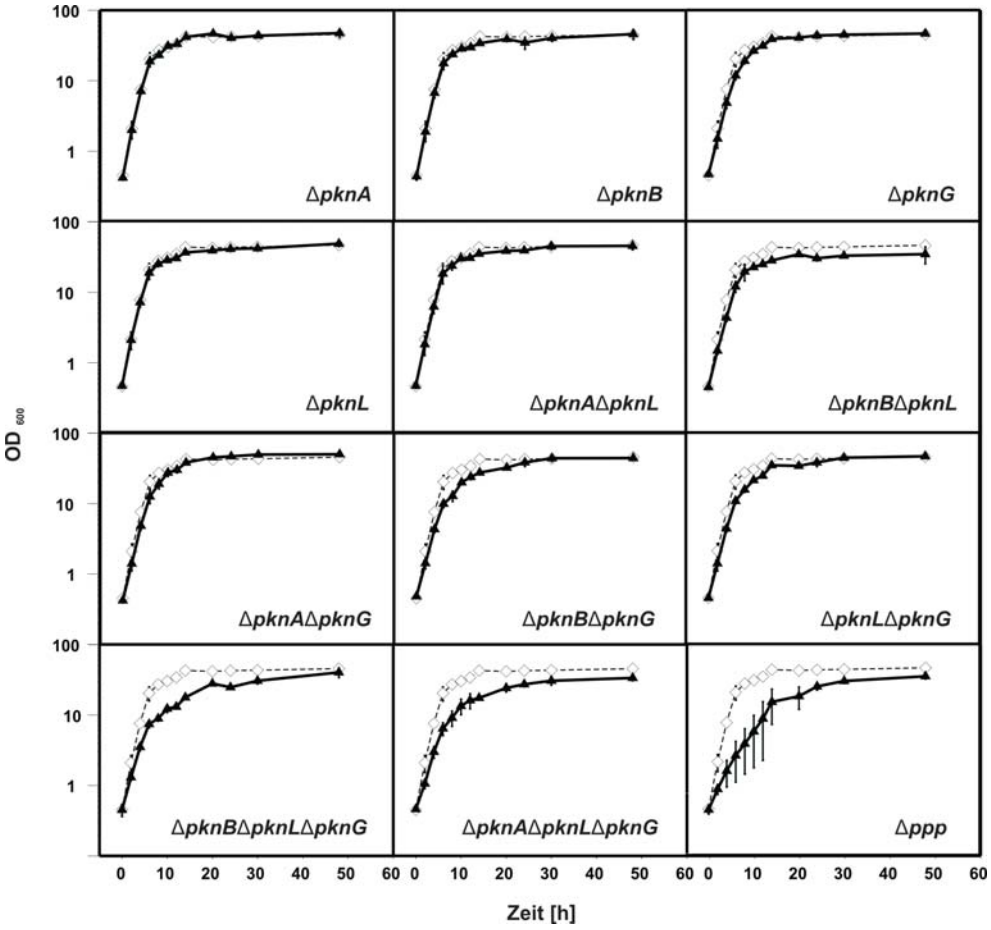


Abbildung 5.11: Wachstum (OD_{600}) von *C. glutamicum* Wildtyp (◇) im Vergleich zu verschiedenen STPK-Deletionsmutanten sowie der Δ*ppp*-Deletionsmutante (▲) in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose. Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

Tabelle 5.4: Wachstumsraten μ verschiedener *C. glutamicum* STPK-Deletionsmutanten sowie der Δ*ppp*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp bei Kultivierung in BHI-Medium mit 4 % (w/v) Glucose bei 30 °C und 120 Upm.

C. glutamicum-Stamm	μ [h^{-1}]
Wildtyp	0,63
Δ*pknA*	0,63
Δ*pknB*	0,62
Δ*pknL*	0,62
Δ*pknA*Δ*pknL*	0,61
Δ*pknA*Δ*pknG*	0,57
Δ*pknB*Δ*pknL*	0,55
Δ*pknG*	0,54
Δ*pknL*Δ*pknG*	0,53
Δ*pknB*Δ*pknG*	0,51
Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*	0,47
Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG*	0,45
Δ*ppp*	0,24

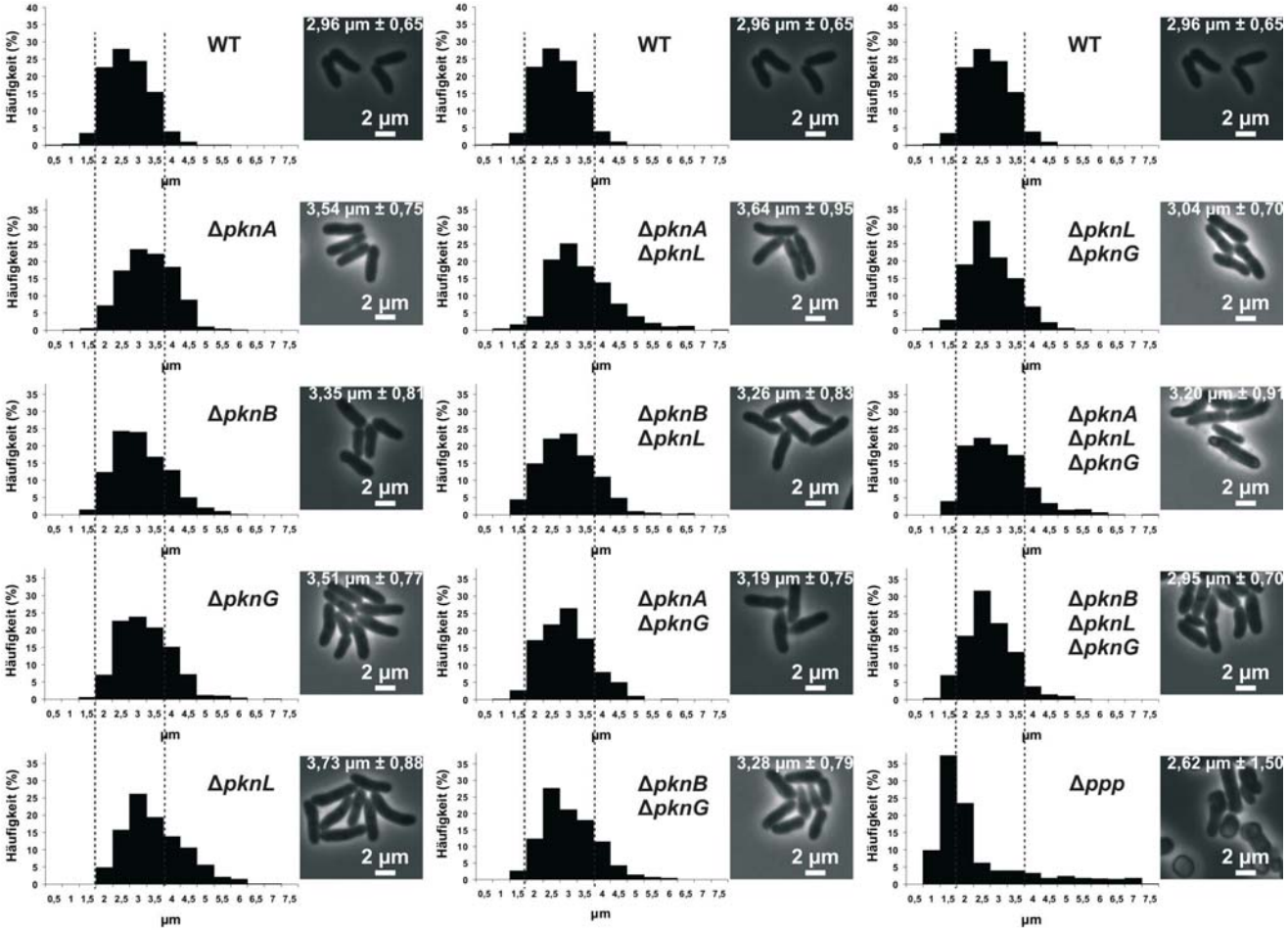
Ergänzend zum Wachstum in BHI-Flüssigmedium mit 4 % (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle wurde das Wachstum der STPK-Mutanten sowie einer Δ*odhI*- und einer Δ*odhA*-Mutante (Hoffelder, unveröffentlichte Daten) auf modifizierten CGXII-Agarplatten mit Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle untersucht. Als Kontrolle diente das Wachstum auf CGXII-Glucose-Agarplatten, auf denen die Δ*odhA*- sowie die Δ*ppp*-Mutante auch bereits ein verlangsamtes Wachstum zeigten (Daten nicht gezeigt). Wie bereits von Niebisch *et al*. (2006) beschrieben, zeigt eine Δ*pknG*-Mutante im Gegensatz zu einer Δ*odhI*-Deletionsmutante einen Wachstumsdefekt auf Glutamin-Medium, da eine aktive und nicht inhibierte ODH sehr wichtig für die Glutamin-Verwertung ist. Wie in Abb. 5.12 deutlich wird, zeigten damit im Einklang alle STPK-Deletionsmutanten, in denen das *pknG*-Gen deletiert vorliegt, diesen starken Wachstumsdefekt auf Glutamin-Agarplatten. Die Δ*ppp*-Mutante sowie die Δ*odhA*-Mutante wiesen ebenfalls einen Wachstumsdefekt auf Glutamin-Medium auf, doch ist bei diesen beiden Mutanten unklar, ob ein genereller Glutamin-Verwertungsdefekt vorliegt oder ob dieser Phänotyp auf das ohnehin schlechte Wachstum dieser Mutanten zurückzuführen ist.



Abbildung 5.12: Wachstum verschiedener *C. glutamicum*-Stämme auf modifizierten CGXII-Agarplatten mit 100 mM Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Außer dem Wachstum in BHI-Medium mit Glucose und auf Glutamin-Agarplatten wurde auch die Zellmorphologie und die Zelllänge der verschiedenen STPK-Mutanten und der Δ*ppp*-Mutante analysiert. Dies geschah in Kooperation mit Dr. Marc Bramkamp und Astrid Schwaiger vom Institut für Biochemie der Universität zu Köln. Wie in Abb. 5.13 dargestellt, zeigten alle STPK-Deletionsmutanten mit Ausnahme des Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*-Stammes elongierte Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu zeigte die Δ*ppp*-Mutante eine stark pleomorphe Zellmorphologie, nämlich von stark coccoiden bis hin zu stark elongierten Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass die posttranslationale Regulation durch Ser-/Thr-Phosphorylierung bzw. Phospho-Ser-/Thr-Dephosphorylierung auch für solche Proteine eine entscheidene Rolle in *C. glutamicum* spielt, die in die Zellteilung bzw. Zellmorphologie involviert sind. In *M. tuberculosis* konnte in diesem Zusammenhang bereits eine Ser-/Thr-Phosphorylierung der Zellteilungsproteine FtsZ und Wag31 aufgezeigt werden (Kang *et al*., 2005; Thakur and Chakraborti, 2006). Da PknA und PknB in *M. tuberculosis* essentiell sind (Sassetti *et al*., 2003; Fernandez *et al*., 2006; Kang *et al*., 2005), konnten nur Stämme analysiert werden, die mittels Antisense-RNA-Technik reduzierte Mengen an PknA bzw. PknB besitzen. Diese Stämme zeigten ein reduziertes Wachstum sowie ebenfalls elongierte Zellen (Kang *et al*., 2005).

Abbildung 5.13: Zellmorphologie und Zelllänge der verschiedenen *C. glutamicum* STPK-Deletionsmutanten und der Δ*ppp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind Ausschnitte von Phasenkontrast-mikroskopischen Aufnahmen, die durchschnittlichen Zelllängen inklusive der Standardabweichung sowie die Verteilung der Häufigkeiten (%) der Zelllängen in 0,5 µm Schritten nach Auswertung von jeweils 500 Einzelzellen. Die Zellen wurden in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose bis zu einer OD_{600} von ca. 1,5 kultiviert und 1 – 3 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgebracht, der mit einer dünnen 1,5 %-igen Agaroseschicht bedeckt war. Die Fotos wurden mit Hilfe eines Carl Zeiss Mikroskops Axio Imager M1 (Carl Zeiss, Göttingen), das mit einer Zeiss AxioCam HR3 Kamera (Carl Zeiss, Göttingen) ausgestattet ist in Verbindung mit einem EC-Objektiv „Plan-Neofluar/100x/1,30 Oil“ aufgenommen. Digitale Aufnahmen wurden mit der Software AxioVision 4.6 (Carl Zeiss, Göttingen) erhalten und analysiert.
(nächste Seite)


WT
2,96 µm ± 0,65
2 µm
ΔpknA
3,54 µm ± 0,75
ΔpknB
3,35 µm ± 0,81
ΔpknG
3,51 µm ± 0,77
ΔpknL
3,73 µm ± 0,88
ΔpknA ΔpknL
3,64 µm ± 0,95
ΔpknB ΔpknL
3,26 µm ± 0,83
ΔpknA ΔpknG
3,19 µm ± 0,75
ΔpknB ΔpknG
3,28 µm ± 0,79
ΔpknL ΔpknG
3,04 µm ± 0,70
ΔpknA ΔpknL ΔpknG
3,20 µm ± 0,97
ΔpknB ΔpknL ΔpknG
2,95 µm ± 0,70
Δppp
2,62 µm ± 1,50
Häufigkeit (%)
µm

2.2 Untersuchungen zum OdhI-Phosphorylierungsstatus in diversen Ser-/Thr-Proteinkinase-Deletionsmutanten

Die verschiedenen STPK-Deletionsmutanten sollten der Aufklärung der PknG-unabhängigen OdhI-Phosphorylierung dienen. Die Bestimmung des OdhI-Phosphorylierungsstatus sollte erneut mit Hilfe der Western-Blot-Methode unter Verwendung des Anti-OdhI-Antiserums erfolgen.

Alle vorliegenden STPK-Deletionsmutanten sowie die Δ*ppp*-Mutante wurden über Nacht in 50 ml BHI-Medium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert, die Zellen aus je 10 ml Kultur einmal mit PBS-Puffer gewaschen und in 1 ml PBS-Puffer inklusive Complete EDTA-free Protease-Inhibitormix (Roche Diagnostics) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Glasperlen und 20 µg Gesamtprotein wurden im Western-Blot mit dem Anti-OdhI-Antiserum nach Separierung der Proteine auf einem 15 %-igen SDS-Gel analysiert. In Abb. 5.14 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen dargestellt. Im Vergleich zur Abb. 5.3 wurde bei diesem einmaligen Versuchsdurchgang allerdings eine geringere Menge an phosphoryliertem OdhI in der löslichen Proteinfraktion des Wildtyps detektiert, was vermutlich auf einen etwas früheren Zellerntezeitpunkt in diesem Experiment zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass im Verlaufe der Kultivierung die Menge an phosphoryliertem OdhI im Wildtyp zunimmt (vgl. Abb. 5.8). Bei der densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Banden mit Hilfe des Programms AIDA V2.41 (Fuji) wurden die untere und die obere Western-Blot-Bande in Relation zueinander gesetzt, um eine quantitative Aussage über die Menge an phosphoryliertem und unphosphoryliertem OdhI-Protein in den verschiedenen löslichen Proteinfraktionen zu erhalten. Das Resultat dieser Auswertung war, dass unter den gewählten Bedingungen OdhI neben PknG primär durch PknA phosphoryliert wird, was sich an Hand der geringeren Intensität der oberen Western-Blot-Bande in der Δ*pknA*-Einfachmutante (34 %) im Vergleich zum Wildtyp (41 %) schlussfolgern lässt. Diese Feststellung wurde durch die in der Δ*pknA*Δ*pknG*-Doppelmutante weitere Abnahme an phosphoryliertem OdhI (18 %) bekräftigt. Die in geringem Maße auch in den beiden Doppelmutanten Δ*pknB*Δ*pknG* (26 %) und Δ*pknL*Δ*pknG* (30 %) reduzierte Menge an phosphoryliertem OdhI im Vergleich zur Δ*pknG*-Einfachmutante (32 %) könnte auch für eine PknB- und PknL-abhängige *in-vivo*-OdhI-Phosphorylierung sprechen, allerdings war in den beiden Einfachmutanten Δ*pknB* (42 %) und Δ*pknL* (47 %) keine Reduzierung an phosphoryliertem OdhI im Vergleich zum Wildtyp-Stamm detektierbar. Die in den beiden Dreifachdeletionsmutanten Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* detektierte Menge an phosphoryliertem OdhI (10 % und 17 %) lag unter der Menge, die in den Einfach- oder Doppeldeletionsmutanten detektiert wurde. Der wenn auch nur sehr geringe Rest an phosphoryliertem OdhI in der Dreifachmutante Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* unterstützt die

Vermutung, dass OdhI *in vivo* auch von PknB phosphoryliert werden kann. Als Schlussfolgerung findet neben der PknG-abhängigen OdhI-Phosphorylierung aber hauptsächlich eine PknA-abhängige OdhI-Phosphorylierung unter den gewählten Kultivierungsbedingungen statt. Generell sollte dieser Versuch noch mindestens zweimal wiederholt werden, um die Werte statistisch abzusichern.

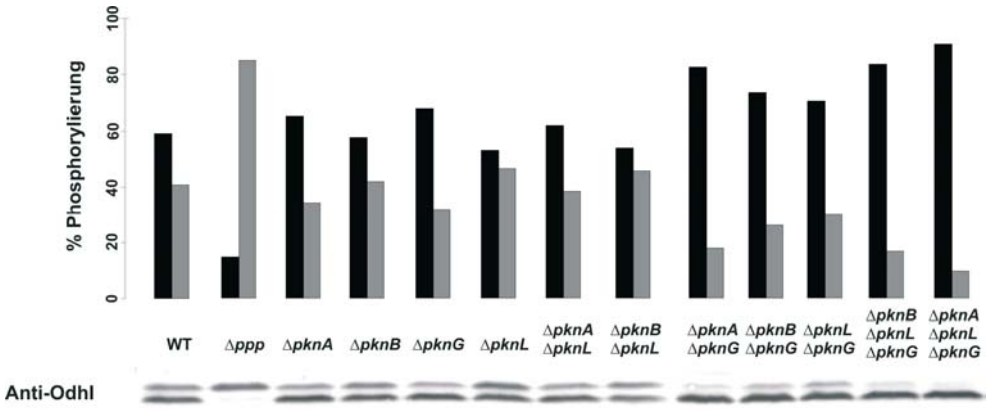


Abbildung 5.14: Western-Blot-Analysen löslicher Proteinfraktionen aus *C. glutamicum* Wildtyp sowie verschiedenen Deletionsmutanten und densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. Die Zellen wurden in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose ÜN kultiviert und es wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein in den Western-Blot-Analysen eingesetzt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms AIDA V2.41 (Fuji), indem die obere und die untere Bande in Relation zueinander gesetzt wurden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Menge an unphosphoryliertem und die grauen Balken die Menge an phosphoryliertem OdhI in Prozent.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen sollten durch 2-D-Gelelektrophoresestudien untermauert werden. Diese Methode hat gegenüber der Western-Blot-Methode wie bereits erwähnt den Vorteil, zwischen einfach-, zweifach- und evtl. mehrfach-phosphoryliertem OdhI-Protein unterscheiden zu können. Die Kultivierung der Stämme *C. glutamicum* Wildtyp, Δ*ppp*, Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknB*Δ*pknG*, Δ*pknL*Δ*pknG*, Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG*, die hierbei untersucht wurden, erfolgte erneut über Nacht in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose, bevor 300 µg Gesamtprotein in den 2-D-Gelelektrophoresestudien eingesetzt wurden. Niebisch *et al*. (2006) konnten bereits unphosphoryliertes sowie einfach- und zweifach-phosphoryliertes OdhI-Protein im 2-D-Gel lokalisieren. Auf Grund der Verschiebung des isoelektrischen Punktes durch eine Phosphorylierung handelt es sich somit in Abb. 5.15 bei Spot „0“ vermutlich um unphosphoryliertes, bei Spot „1“ um einfach-phosphoryliertes und bei Spot „2“ um zweifach-phosphoryliertes OdhI-Protein.

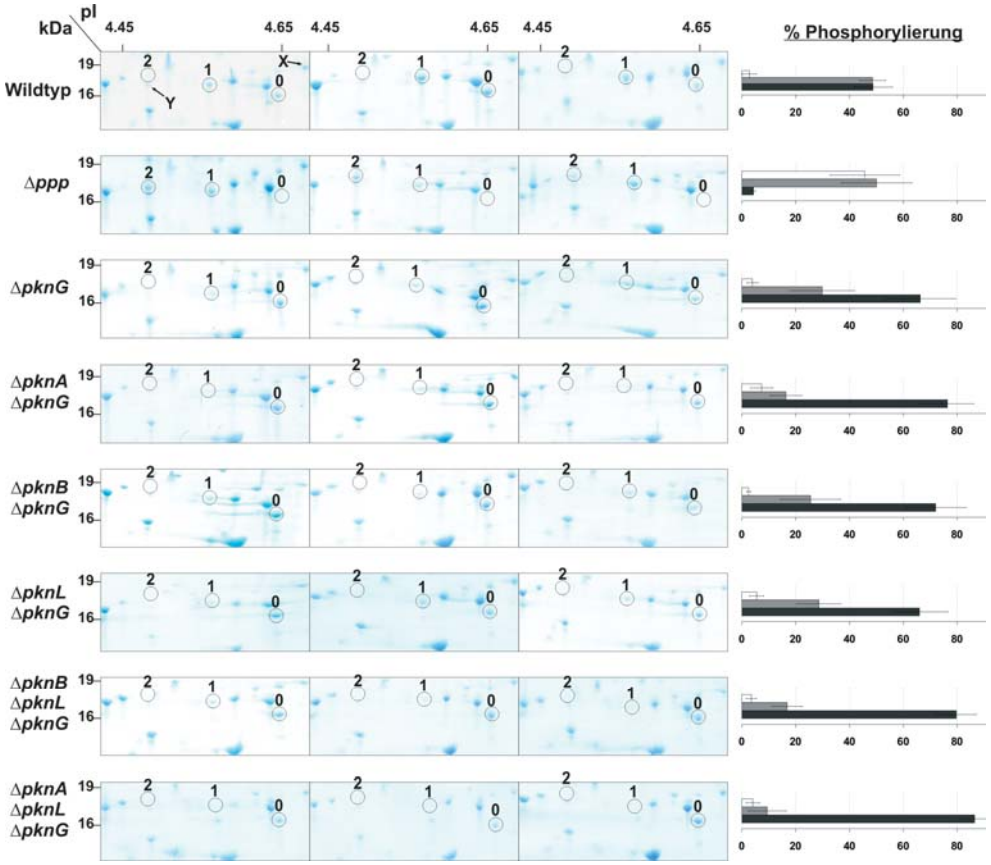


Abbildung 5.15: Ausschnitte vergleichender 2-D-Gele verschiedener *C. glutamicum*-Stämme zur Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus und densitometrische Auswertung der OdhI-Spotintensitäten. Die Kulturen wurden über Nacht in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert und jeweils 300 µg Gesamtprotein für die isoelektrische Fokussierung (IEF) auf 18 cm Immobiline DryStrips mit einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0 (GE Healthcare) aufgetragen. Für die nachfolgende SDS-PAGE wurden Fertiggele (ExcelGel XL SDS 12 – 14, GE Healthcare) verwendet. Es sind für jeden Stamm 2-D-Gele in dreifacher Ausfertigung dargestellt. Die für jeden Stamm gemittelten Intensitäten der Proteinspots „0“ (OdhI unphosphoryliert; schwarzer Balken), „1“ (OdhI einfach-phosphoryliert; grauer Balken) und „2“ (OdhI zweifach-phosphoryliert; weißer Balken) wurden zuerst in Relation zum Proteinspot „X“ (Adenylatkinase; Cg0648) und dann in Relation zueinander gesetzt, um eine densitometrische Auswertung in Prozent mit Hilfe des Programms AIDA V2.41 (Fuji) zu erhalten. Der Proteinspot „Y“ wurde als S-Adenosylmethionin:2-demethylmenaquinon-Methyltransferase (Cg1055) identifiziert. Die vollständigen 2-D-Gele sind im Anhang A7 dargestellt.

Die mit „0“ und „1“ im Wildtyp sowie mit „1“ und „2“ in der Δ*ppp*-Mutante gekennzeichneten Proteinspots, die zwischen ca. 16 und 19 kDa sowie zwischen einem pI von ca. 4,45 und 4,65 angesiedelt sind, wurden mittels MALDI-TOF-MS-Analyse und in Übereinstimmung mit der Arbeit von Niebisch *et al*. (2006) als OdhI identifiziert. Durch optischen Vergleich sowie weitere massenspektrometrische Bestimmungen konnten so in den 2-D-Gelen der anderen Deletionsmutanten die jeweiligen OdhI-Proteinspots zugeordnet werden (vgl. Abb. 5.15). Nachfolgende MALDI-TOF-MS/MS-Analysen zur Bestimmung der OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) erbrachten allerdings keine eindeutigen Ergebisse auf Grund der zu geringen Menge an OdhI-Peptidfragmenten. Die in Abb. 5.15 dargestellten 2-D-Gele wurden ebenfalls mit Hilfe des Programms AIDA V2.41 (Fuji) densitometrisch ausgewertet. Dabei wurden die drei als OdhI identifizierten Proteinspots zuerst in Relation zur Adenylatkinase Adk (Cg0648; 19,4 kDa; „X“ in Abb. 5.15) gesetzt, da die Adk-Spotintensität in den getesteten Stämmen konstant war. Anschließend wurden die drei OdhI-Proteinspots in Relation zueinander gesetzt. In drei unabhängigen Versuchen konnte die zuvor in den Western-Blot-Analysen gemachte Beobachtung gestützt werden, dass neben der PknG-abhängigen OdhI-Phosphorylierung primär PknA für die *in-vivo*-OdhI-Phosphorylierung verantwortlich ist. Bei diesen Analysen wurde aber erneut ersichtlich, dass OdhI vermutlich auch unter diesen Bedingungen von PknB und PknL in sehr geringem Maße *in vivo* phosphoryliert wird, wie man anhand eines Vergleichs der in den verschiedenen STPK-Mutanten verbliebenen Mengen an einfach-phosphoryliertem OdhI vermuten kann. Nach Auswertung mit Hilfe der Analysesoftware AIDA V2.41 (Fuji) wurden folgende Mengen an unphosphoryliertem bzw. einfach-phosphoryliertem OdhI-Protein bestimmt: *C. glutamicum* Wildtyp (48,7 % bzw. 48,6 %), Δ*ppp* (4,3 % bzw. 50 %), Δ*pknG* (66,3 % bzw. 29,8 %), Δ*pknA*Δ*pknG* (76,4 % bzw. 16,3 %), Δ*pknB*Δ*pknG* (72,0 % bzw. 25,5 %), Δ*pknL*Δ*pknG* (66,0 % bzw. 28,6 %), Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* (79,7 % bzw. 16,8 %) und Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* (86,5 % bzw. 9,4 %) (vgl. Abb. 5.15). Die S-Adenosylmethionin:2-demethylmenaquinon-Methyltransferase MenG (Cg1055; 17,3 kDa), in Abb. 5.15 als „Y“ markiert, liegt in enger Nachbarschaft zum zweifach-phosphorylierten OdhI-Spot und wird erwähnt, um eine Verwechselung dieser beiden Proteine auszuschließen.

2.3 Einfluss einer *pknA*-, *pknB*- und *pknL*-Deletion auf die Ethambutol-induzierte Glutamat-Produktion

In Anlehnung an die Versuche zur Glutamat-Produktion mit der Δ*pknG*-Mutante wurde die Ethambutol-induzierte Glutamat-Bildung weiterer STPK-Mutanten analysiert.

In Abb. 5.16 sind das Wachstum sowie die Glutamat-Konzentrationen in den jeweiligen Kulturüberständen nach 24 h bzw. 48 h der Stämme Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknG*, Δ*pknL*, Δ*pknA*Δ*pknG*, Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* dargestellt. Bei dieser Versuchsserie wurde eine geringere Glutamat-Konzentration nach 48 h im Wildtyp (31,4 mM Glutamat) sowie in der Δ*pknG*-Mutante (61,2 mM Glutamat) im Vergleich zu den vorherigen Experimenten (WT: 46,5 mM Glutamat; Δ*pknG*: 85,4 mM Glutamat; vgl. Kapitel V.1.4 und Tabelle 5.1) gemessen. Die Ursache für diesen Unterschied ist unbekannt. Dennoch war auch in diesen erneuten Messungen eine signifikant höhere Glutamat-Produktion der Δ*pknG*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp feststellbar. Mit der Δ*pknA*-Mutante wurde eine ähnlich hohe Glutamat-Produktion (64,4 mM Glutamat) erzielt wie mit dem Δ*pknG*-Deletionsstamm (61,2 mM Glutamat). Vergleichbare Glutamat-Konzentrationen wurden ebenso mit der STPK-Doppelmutante Δ*pknA*Δ*pknG* (69,6 mM Glutamat) sowie mit den beiden STPK-Dreifachmutanten Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* (54,8 mM Glutamat) und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* (60,0 mM Glutamat) erzielt. Auf Grund der nicht signifikant gesteigerten Glutamat-Produktion mit den hier getesteten Doppel- und Dreifachmutanten kann ein additiver Effekt bzgl. der Glutamat-Bildung ausgeschlossen werden, da trotz der Präsenz von nahezu unphosphoryliertem OdhI in diesen Zellen nicht mehr Glutamat sekretiert wird als im Vergleich zu den Δ*pknA* bzw. Δ*pknG*-Einfachdeletionsmutanten. Im Gegensatz dazu wurde unerwarteterweise mit den Δ*pknB* und Δ*pknL*-Einfachdeletionsmutanten eine Glutamat-Konzentration von nur 7,1 mM bzw. 10,4 mM nach 24 h im Kulturmedium detektiert. Diese beiden Deletionsmutanten verwerten das ausgeschiedene Glutamat wieder vollständig, da nach 48 h kein Glutamat mehr im Kulturüberstand nachweisbar war (vgl. Abb. 5.16). PknB und PknL scheinen also zumindest für die Ethambutol-induzierte Glutamat-Bildung ebenfalls sehr wichtig zu sein.

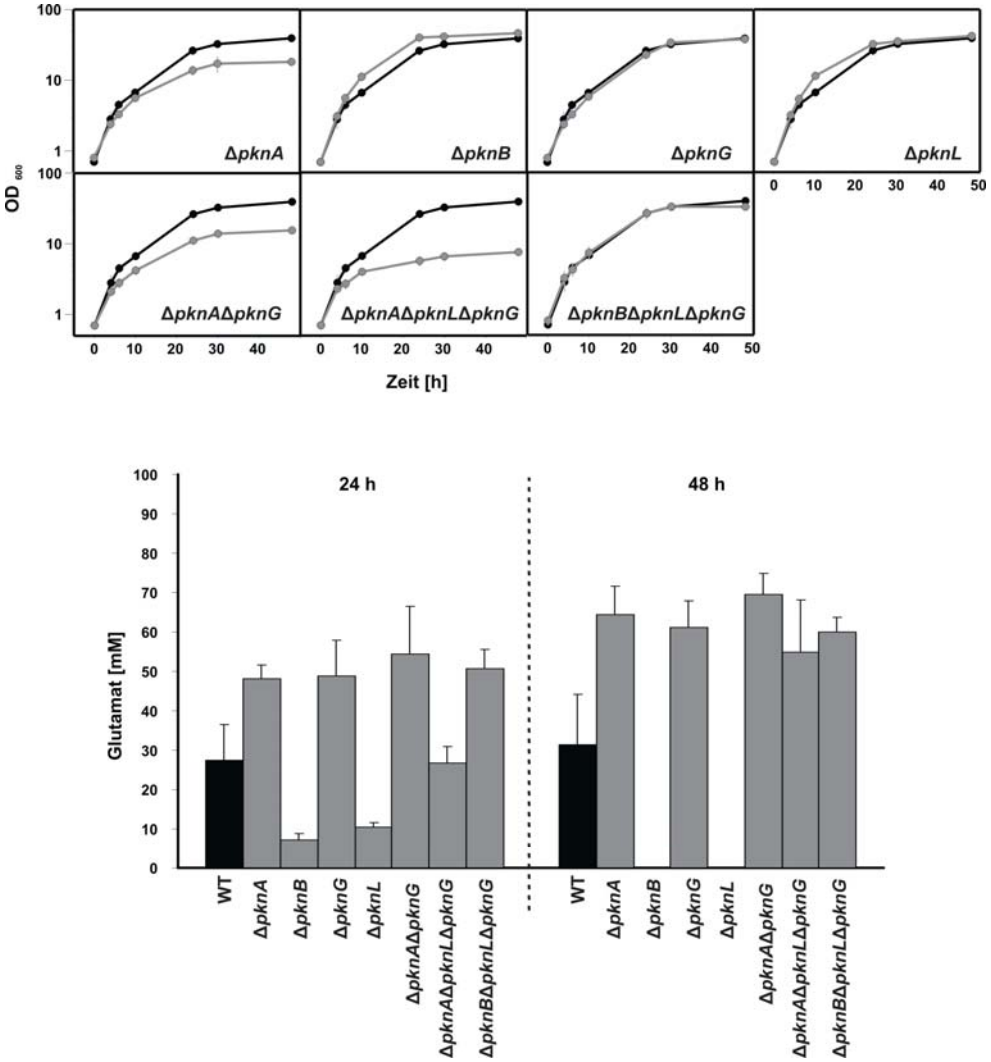


Abbildung 5.16: Vergleichende Analyse des Wachstums (OD_{600}) und der Glutamat-Bildung nach 24 h und 48 h der Stämme *C. glutamicum* Wildtyp (●) im Vergleich zu verschiedenen STPK-Deletionsmutanten (◎) in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose nach Ethambutol-Behandlung (500 mg l^{-1}). Alle Werte sind Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Kultivierungen und die Streuung ist als Standardabweichung angegeben.

3 *In-vitro*-OdhI-Phosphorylierung durch PknA, PknB, PknG und PknL

Die *in-vivo*-OdhI-Phosphorylierungsstudien (vgl. Kapitel V.2.2) sollten durch *in-vitro*-Experimente ergänzt sowie die PknG-unabhängige(n) OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) identifiziert werden. Zu diesem Zweck sollten PknA, PknB und PknL für *in-vitro*-Phosphorylierungen mit OdhI als Substrat aufgereinigt werden. Da es sich bei diesen drei STPKs um membranständige Proteine handelt, sollte versucht werden, nur die cytoplasmatisch lokalisierten aminoterminalen Bereiche inklusive der entsprechenden Kinasedomäne aufzureinigen. Da eine *in-vitro*-Phosphorylierung von OdhI durch das Volllängenprotein PknG bereits von Niebisch *et al*. (2006) gezeigt werden konnte, wurde hier alternativ ebenfalls nur die Kinasedomäne von PknG als Positivkontrolle eingesetzt.

3.1 Bioinformatische Analyse zur Bestimmung der Lokalisation der Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL

Zur exakten Bestimmung der Lokalisation der Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL wurde das Programm Pfam (http://pfam.janelia.org) und für die Lokalisation der Transmembranhelices von PknA, PknB und PknL wurden die Programme TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) und TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/ TMHMM) herangezogen. In Abb. 5.17 sind die daraus resultierenden Positionen der jeweiligen Kinasedomänen sowie der Transmembranhelices schematisch dargestellt. Ebenfalls dargestellt sind in dieser Abbildung sogenannte PASTA-Domänen (*penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain*), die eine Rolle bei der Bindung von Peptidoglykankomponenten und extrazellulären Signalen spielen sollen (Yeats *et al*., 2002). Die Kinasedomäne von PknA erstreckt sich laut dieser bioinformatischen Analysen von Aminosäure 20 – 281, die von PknB von 9 – 275, die von PknG von 175 – 342 und die von PknL von Aminosäure 14 – 272.

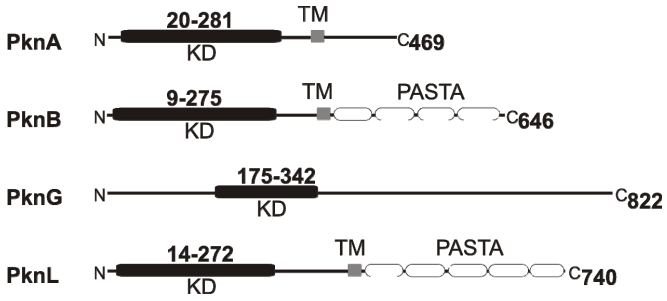


Abbildung 5.17: Dömanenorganisation von PknA, PknB, PknG und PknL aus *C. glutamicum*. N = Aminoterminus; C = Carboxyterminus; KD = Kinasedomäne; TM = Transmembranhelix; PASTA-Domäne = *penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain*. Die Transmembranhelices erstrecken sich von Aminosäure 329 – 351 (PknA), von 336 – 355 (PknB) bzw. von 391 – 413 (PknL). Die PASTA-Domänen erstrecken sich in PknB von Aminosäure 369 – 431, 436 – 500, 505 – 565 und 569 – 638 und in PknL von Aminosäure 418 – 480, 483 – 547, 552 – 615, 617 – 682 und 684 – 739. Die in der Abbildung angegebenen Zahlen geben die Aminosäurepositionen der jeweiligen Kinasedomänen sowie die Länge des Proteins wieder.

3.2 Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse der Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL

Für die *in-vitro*-Phosphorylierungsversuche wurden die Bereiche von Aminosäure 1 – 287 der STPKs PknA, PknB und PknL zur Überproduktion ausgewählt, im Falle von PknG der Bereich von Aminosäure 1 – 342. Die daraufhin konstruierten Plasmide pET16b-*pknA*-KD, pET16b-*pknB*-KD, pET16b-*pknG*-KD und pET16b-*pknL*-KD (vgl. Kapitel IV.5.3 und Abb. A5.2-A5.5) kodieren für diese aminoterminalen Bereiche von PknA, PknB, PknL und PknG inklusive eines aminoterminalen Decahistidin-„Tags“ zur Reinigung mittels Ni^{2+}-Chelat-Affinitätschromatographie. Die Plasmide pET16b-*pknB*-KD, pET16b-*pknG*-KD und pET16b-*pknL*-KD wurden in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) und das Plasmid pET16b-*pknA*-KD in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)/pLysS transferiert. Die Stämme wurden in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 bei 37 °C kultiviert, die Expression der Zielgene durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, die Kulturen weitere 4 h bei 30 °C inkubiert und anschließend geerntet. Unmittelbar vor und jeweils stündlich nach IPTG-Zugabe wurden 1-ml Proben entnommen, die Zellen durch Erhitzen auf 95 °C in SDS-Ladepuffer lysiert und die erhaltenen Zellextrakte durch SDS-PAGE-Analyse auf eine eventuell sichtbare Proteinüberproduktion hin untersucht. Wie in den Spuren 5 in Abb. 5.18-A bis 5.18-D zu erkennen ist, war 4 h nach IPTG-Zugabe eine dominante Bande mit einer apparenten Masse von etwa 40 kDa bei der PknA-KD_{His}-Überproduktion, von etwa 37 kDa bei der PknB-KD_{His}-Überproduktion, von etwa 50 kDa bei der PknG-KD_{His}-Überproduktion und von etwa 35 kDa bei der PknL-KD_{His}-

Überproduktion sichtbar, wobei diese Banden höchstwahrscheinlich den vier Ser-/Thr-Proteinkinasedomänen entsprechen.

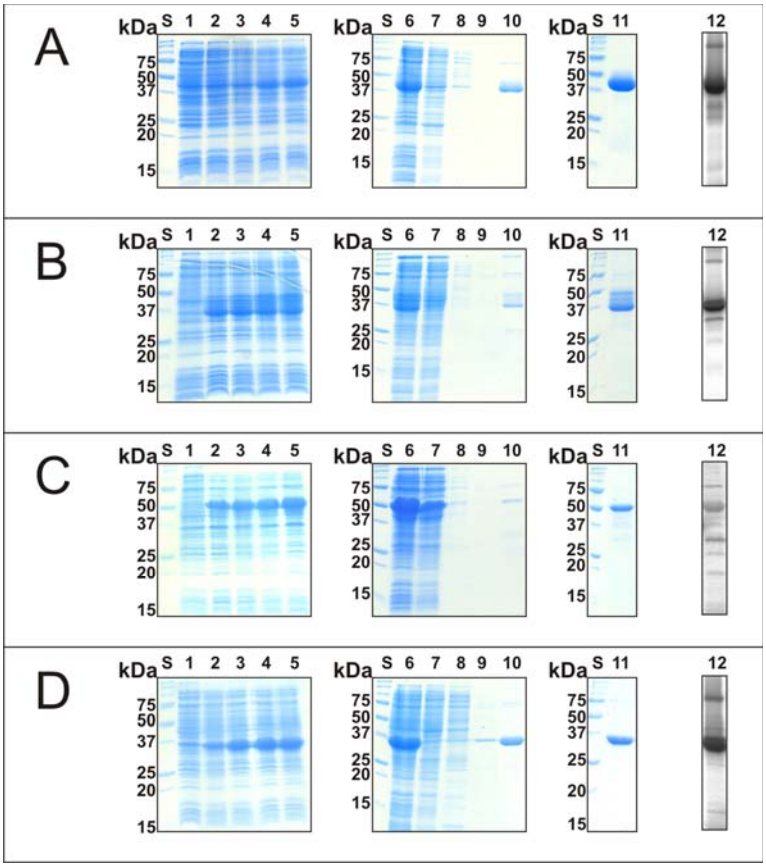


Abbildung 5.18: Analyse der (A) PknA-KD$_{His}$-, (B) PknB-KD$_{His}$-, (C) PknG-KD$_{His}$- und (D) PknL-KD$_{His}$-Überproduktion, Reinigung sowie der Autophosphorylierungsaktivität. S, Standard; Zellen von (A) *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET16b-*pknA*-KD bzw. (B) *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*pknB*-KD bzw. (C) *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*pknG*-KD bzw. (D) *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*pknL*-KD unmittelbar vor (Spuren 1) bzw. 1, 2, 3, 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG (Spuren 2-5); Spur 6, Ultrazentrifugationsüberstände; Spur 7, Waschfraktionen mit TNI5; Spur 8, Waschfraktionen mit TNI30; Spur 9, Waschfraktionen mit TNI50; Spur 10, Waschfraktionen mit TNI100; Spur 11, Eluat der Ni^{2+}-NTA-Säule mit TNI200; Spur 12, Autophosphorylierung von 2 µg PknA-KD$_{His}$ bzw. 4 µg PknB-KD$_{His}$ bzw. 5 µg PknG-KD$_{His}$ bzw. 1 µg PknL-KD$_{His}$ nach 30-minütiger Inkubation in Kinase-Puffer mit 1 µCi [γ-^{33}P]-ATP bei 37 °C. Alle Proben (1-12) wurden mit 6 x SDS-Ladepuffer versetzt, auf 15 %-ige SDS-Gele aufgetragen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Gele mit den Proben 1-11 wurden mit Coomassie gefärbt und die getrockneten Gele der Proben 12 mit einem PhosphorImager analysiert.

Eine Abweichung der apparenten von der berechneten Masse (PknA-KD$_{His}$: 34,0 kDa; PknB-KD$_{His}$: 33,4 kDa; PknG-KD$_{His}$: 40,1 kDa; PknL-KD$_{His}$: 33,6 kDa) wurde auch schon für andere STPKs aus *M. tuberculosis* wie z.B. PknA (Chaba *et al*., 2002), PknB (Boitel *et al*., 2003), PknD (Peirs *et al*., 1997), PknE (Molle *et al*., 2003a) und PknH (Molle *et al*., 2003b)

beschrieben und könnte mit autophosphorylierten Isoformen zu erklären sein. Die Isolierung der jeweiligen Proteine erfolgte mittels Ni^{2+}-NTA-Agarose. Wie in den Spuren 11 in Abb. 5.18-A bis 5.18-D zu erkennen ist, konnten die PknA-KD_{His}- und PknL-KD_{His}-Proteine ohne erkennbare Verunreinigungen (bei Coomasie-Färbung) und in großen Mengen isoliert werden, wohingegen im Fall von PknB-KD_{His}- und PknG-KD_{His} noch zusätzliche Banden im Gel vorhanden waren. Im Fall von PknB-KD_{His} könnte es sich um die oben genannten autophosphorylierten Isoformen handeln, die trotz SDS und Hitze nicht denaturiert wurden. Die oberste dominante Bande konnte mittels MALDI-TOF-MS-Analyse auch PknB zugewiesen werden. Boitel *et al*. (2003) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass nicht vollständig phosphoryliertes PknB mehrere diffuse Banden im SDS-Gel verursacht. Bei den Banden unterhalb von PknG-KD_{His} könnte es sich um Degradationsprodukte handeln. Außerdem wurde das PknG-KD_{His}-Protein nicht vollständig an die Ni^{2+}-NTA-Säule gebunden, da bereits beim Waschschritt mit TNI5-Puffer eine gewisse Menge an Protein von der Säule gewaschen wurde.

Eine Autophosphorylierungsaktivität der gereinigten Kinasedomänen konnte *in vitro* mittels radioaktivem [γ-^{33}P]-ATP gezeigt werden (Abb. 5.18-A bis 5.18-D; Spur 12). Da neben der dominanten Autophosphorylierungsbande auf Höhe der jeweiligen Kinasedomäne in allen vier Fällen auch noch weitere Banden unter- und oberhalb auftraten, war zu vermuten, dass entweder Verunreinigungen oder Degradationsprodukte bzw. dimere bis oligomere Formen der jeweiligen Kinasedomänen, die trotz der denaturierenden Bedingungen nicht dissoziiert worden waren, vorlagen. Eine Phosphorylierung des artifiziellen Modellsubstrats MBP (*myelin basic protein*) zur Überprüfung einer Transphosphorylierungsaktivität ergab mit allen Kinasedomänen ein positives Resultat (Daten nicht gezeigt).

Größenausschlusschromatographien und native Gelelektrophoresestudien ergaben, dass PknA-KD_{His} in Formen von Dimeren bis Tetrameren (vgl. Abb. 5.19-A), PknL-KD_{His} in Formen von Dimeren bis Oligomeren (vgl. Abb. 5.20-B), PknG-KD_{His} hauptsächlich als Oligomer (vgl. Abb. 5.20-A) und PknB-KD_{His} ebenfalls überwiegend als oligomeres Aggregat (vgl. Abb. 5.19-B) vorliegt. Die für die native Gelelektrophorese eingesetzten Kinasedomänen wurden nach der affinitätschromatographischen Reinigung in Kinase-Puffer umgepuffert. Als Laufpuffer diente Kinase-Puffer und die im Chromatogramm angegebenen molekularen Massen wurden mit Hilfe der in Kapitel V.1.1 ermittelten Eichgeraden berechnet. Eine Dimerisierung der Kinasedomänen von PknB (Ortiz-Lombardía *et al*., 2003; Young *et al*., 2003; Wehenkel *et al*., 2006), PknD (Greenstein *et al*., 2007a) oder PknE (Gay *et al*., 2006) führt in *M. tuberculosis* zu einer Aktivierung der Autophosphorylierungsaktivität der Kinase, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Dimerisierung auch in *C. glutamicum* vermutlich zu einer „aktiven“ Konformation führt.

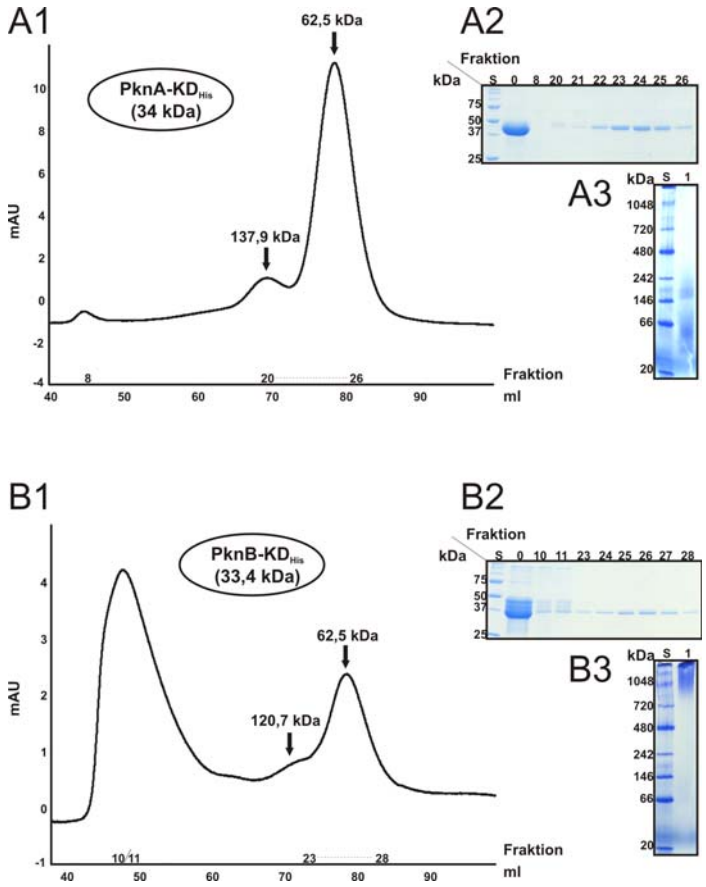


Abbildung 5.19: Größenausschlusschromatographie und native Gelelektrophorese zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von PknA-KD$_{His}$ und PknB-KD$_{His}$. (A1) Größenausschlusschromatographie von ungefähr 2 mg PknA-KD$_{His}$ (in TNI200) mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade"-Säule. **(A2)** SDS-PAGE zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge zu Beginn (Fraktion 0) und verschiedener weiterer Fraktionen aus der Grössenausschlusschromatographie. **(A3)** Native Gelelektrophorese mit einem 4 – 16 %-igen Bis-Tris-Gradientengel (NativePAGE™ Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen). S, Standard; 1, 10 µg PknA-KD$_{His}$. **(B1)** Größenausschlusschromatographie von ungefähr 3 mg PknB-KD$_{His}$ (in TNI200) mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade"-Säule. **(B2)** SDS-PAGE zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge zu Beginn (Fraktion 0) und verschiedener weiterer Fraktionen aus der Grössenausschlusschromatographie. **(B3)** Native Gelelektrophorese mit einem 4 –16 %-igen Bis-Tris-Gradientengel (NativePAGE™ Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen). S, Standard; 1, 20 µg PknB-KD$_{His}$.

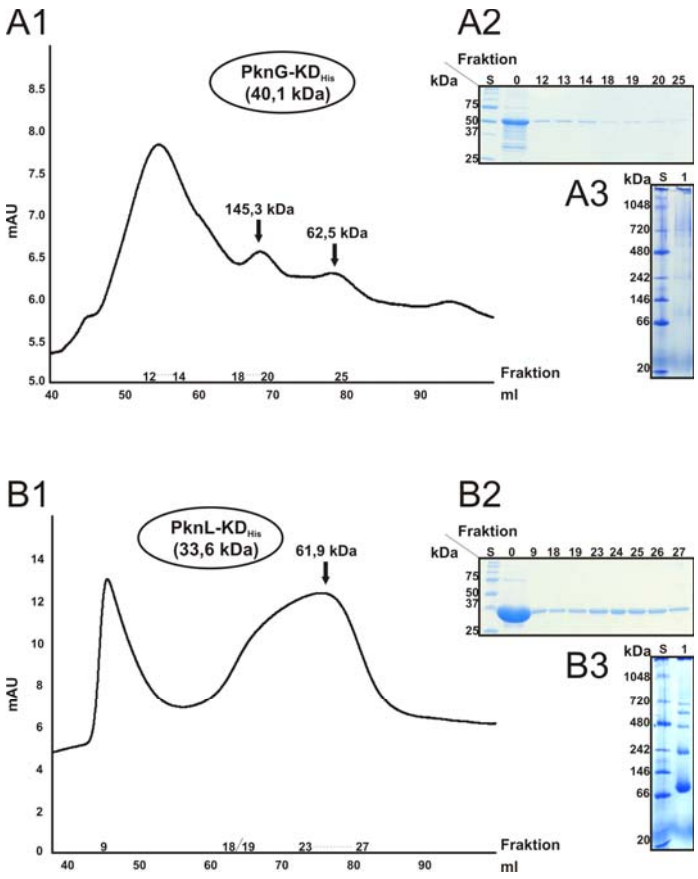


Abbildung 5.20: Größenausschlusschromatographie und native Gelelektrophorese zur Bestimmung der nativen molekularen Masse von PknG-KD$_{His}$ und PknL-KD$_{His}$. (A1) Größenausschlusschromatographie von ungefähr 1,5 mg PknG-KD$_{His}$ (in TNI200) mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade"-Säule. **(A2)** SDS-PAGE zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge zu Beginn (Fraktion 0) und verschiedener weiterer Fraktionen aus der Grössenausschlusschromatographie. **(A3)** Native Gelelektrophorese mit einem 4 – 16 %-igen Bis-Tris-Gradientengel (NativePAGE^{TM} Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen). S, Standard; 1, 20 µg PknG-KD$_{His}$. **(B1)** Größenausschlusschromatographie von ungefähr 5 mg PknL-KD$_{His}$ (in TNI200) mittels einer HiLoad 16/60 Superdex 200 „prep grade"-Säule. **(B2)** SDS-PAGE zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge zu Beginn (Fraktion 0) und verschiedener weiterer Fraktionen aus der Grössenausschlusschromatographie. **(B3)** Native Gelelektrophorese mit einem 4 –16 %-igen Bis-Tris-Gradientengel (NativePAGE^{TM} Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen). S, Standard; 1, 10 µg PknL-KD$_{His}$.

3.3 Versuche zur Bestimmung der OdhI-Phosphorylierungsstelle

3.3.1 *In-vitro*-Phosphorylierungsassays mit den gereinigten Kinasedomänen und OdhI sowie massenspektrometrische Analysen

Das Substrat $OdhI_{Strep}$ wurde für die *in-vitro*-Phosphorylierungen mit den gereinigten Kinasedomänen aus dem *E. coli*-Stamm BB1553/pAN3K-*odhI*$_{Strep}$ gereinigt, da das HSP70-Protein DnaK oft mit $OdhI_{Strep}$ im heterologen Wirt *E. coli* kogereinigt wurde (Daten nicht gezeigt). In Abb. 5.21 sind die Ergebnisse der Phosphorylierungsassays dargestellt. Bei Inkubation mit 2 mM nicht-radioaktivem ATP (60 min, 37 °C) wurden die Proben anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und der OdhI-Phosphorylierungszustand sowohl mittels Coomassie-Färbung als auch durch Western-Blot mit Anti-OdhI-Antiserum analysiert. Bei Inkubation mit 1 µCi [γ-^{33}P]-ATP wurden die Proben nach der Inkubation (30 min, 37 °C) durch SDS-PAGE aufgetrennt und ein Autoradiogramm erstellt. Als Kontrollreaktionen dienten Reaktionsansätze, denen entweder die Kinasedomäne oder aber das Substrat OdhI fehlte. Im Falle von PknA-KD_{His} und PknL-KD_{His} konnte mit allen drei Methoden eine Phosphorylierung von OdhI nachgewiesen werden. Mit PknA-KD_{His} konnte unter den gewählten Bedingungen etwa 50 % des eingesetzten OdhI-Proteins phosphoryliert werden, mit PknL-KD_{His} fast 100 %. Im Falle von PknB-KD_{His} konnte nur im Autoradiogramm eine OdhI-Phosphorylierung nachgewiesen werden, aber nicht oder nur sehr schwach in den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen oder im Western-Blot. Im Fall von PknG-KD_{His} war in den Coomassie-gefärbten Gelen und im Western-Blot nur eine schwache OdhI-Phosphorylierung nachweisbar, im Autoradiogramm war das Resultat eindeutig positiv. Diese Versuche wurden mehrmals wiederholt, wobei qualitativ immer ein ähnliches Ergebnis wie oben beschrieben erhalten wurde.

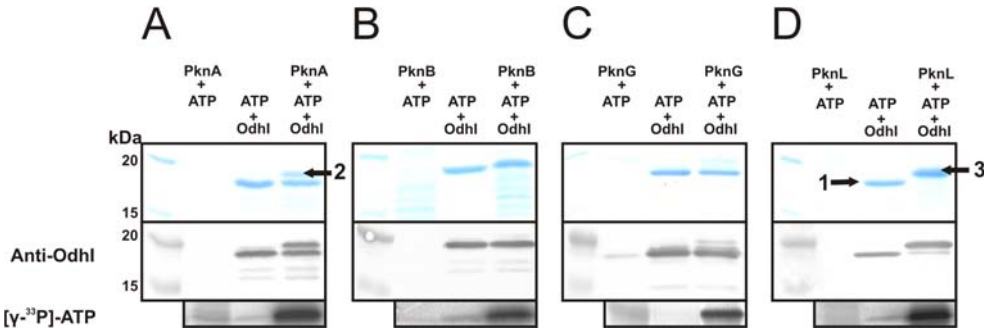


Abbildung 5.21: Analyse der Phosphorylierung von gereinigtem und *Strep*-„getaggtem" OdhI durch PknA-KD$_{His}$ (A), PknB-KD$_{His}$ (B), PknG-KD$_{His}$ (C) und PknL-KD$_{His}$ (D) mit Hilfe jeweils drei verschiedener Ansätze. In jeweils 20 µl Gesamtvolumen wurden 2 µg PknA-KD$_{His}$, 4 µg PknB-KD$_{His}$, 5 µg PknG-KD$_{His}$ oder 1 µg PknL-KD$_{His}$ und/oder 2 µg OdhI$_{Strep}$ gemischt, mit Ausnahme der Western-Blot-Analysen, bei denen nur 0,05 µg OdhI$_{Strep}$ verwendet wurde. ATP wurde in einer Endkonzentration von 2 mM bzw. [γ-^{33}P]-ATP in einer Endkonzentration von 1 µCi hinzugefügt. Die Ansätze wurden 60 min bei 37 °C inkubiert mit Ausnahme der Ansätze, die [γ-^{33}P]-ATP enthielten, welche für nur 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Die Proteine wurden auf einem 15 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte entweder eine Coomassie-Färbung, ein Western-Blot oder bei Verwendung von [γ-^{33}P]-ATP eine 1-stündige Trocknung der Gele bei 80 °C, um anschließend mittels eines PhosphorImagers BAS-1800 (Fujifilm) analysiert zu werden. Dargestellt sind nur die Bereiche der SDS-Gele von ca. 15 – 20 kDa. Die Pfeile (1, 2, 3) markieren die für die MALDI-TOF-MS-Analysen ausgeschnittenen Proteinbanden aus den mit Coomassie angefärbten SDS-Gelen.

Neben dem OdhI-Protein mit einem C-terminalen *Strep*Tag-II wurden auch *in-vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit dem N-terminal Histidin-„getaggten" OdhI-Protein durchgeführt. Diese Experimente ergaben vergleichbare Resultate und werden deswegen hier nicht dargestellt. Als Fazit lässt sich festhalten, dass mit allen getesteten Kinasedomänen eine Phosphorylierung von OdhI erzielt wurde, jedoch mit unterschiedlicher Effizienz: PknL-KD$_{His}$ > PknA-KD$_{His}$ > PknG-KD$_{His}$ > PknB-KD$_{His}$. Die drei in Abb. 5.21 mit einem Pfeil markierten Proteinbanden, bei denen es sich um unphosphoryliertes OdhI (1) und um durch PknA-KD$_{His}$- (2) bzw. PknL-KD$_{His}$-phosphoryliertes OdhI$_{Strep}$-Protein (3) handelte, wurden aus dem 15 %-igen SDS-Gel ausgeschnitten und mittels Trypsin verdaut. Eine anschließend durchgeführte MALDI-TOF-MS-Analyse sollte der Identifizierung von OdhI-Phosphopeptiden sowie der Lokalisation der Phosphorylierungsstelle dienen. In Abb. 5.22 sind vergleichende Massenspektren aus der MALDI-TOF-MS-Analyse von tryptisch-verdautem unphosphoryliertem und von durch PknA-KD$_{His}$- bzw. PknL-KD$_{His}$-phosphoryliertem OdhI$_{Strep}$-Protein im Bereich von 1940 – 2110 m/z dargestellt.

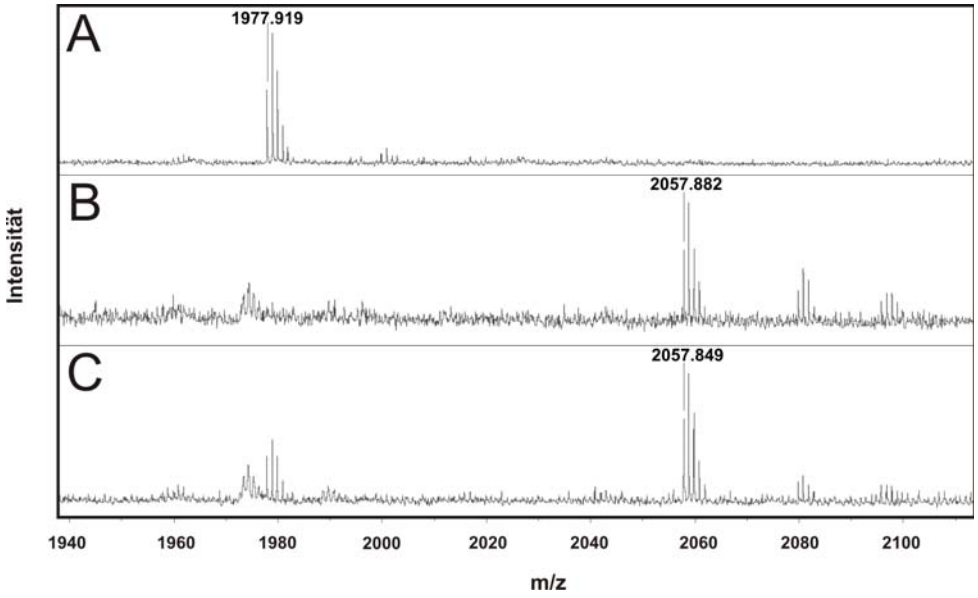


Abbildung 5.22: Ausschnitte eines MALDI-TOF-Massenspektrums zwischen 1940 und 2110 m/z von tryptisch-verdautem unphosphoryliertem $OdhI_{Strep}$ (A) sowie von tryptisch-verdautem $OdhI_{Strep}$ nach Inkubation mit ATP und PknA-KD_{His} (B) bzw. PknL-KD_{His} (C).

Es wurden alle sechs Serin- und Threonin-enthaltenden Peptide des OdhI-Proteins in der MALDI-TOF-MS-Analyse erfasst. Der Peak bei 1977,9 entspricht einem unphosphorylierten OdhI-Peptidfragment von Aminosäure 2 – 19 (SDNNGTPEPQVETTSVFR) und der nach Inkubation mit PknA-KD_{His} und PknL-KD_{His} zusätzlich auftretende Peak bei 2057,9 einem einfach phosphoryliertem OdhI-Peptidfragment von Aminosäure 2 – 19 (vgl. Tabelle A1). An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass bei der Reinigung von $OdhI_{Strep}$ aus *E. coli* das N-terminale Methionin abgespalten wird. Phosphorylierte Peptide zeichnen sich bei der MALDI-TOF-MS-Analyse durch eine Massenverschiebung von 80 Da im Vergleich zum nicht-phosphorylierten Parental-Peptidfragment aus. Die weitere Peptidfragmentierung mittels MALDI-TOF-MS/MS-Analyse ließ allerdings keine eindeutige Aussage über die OdhI-Phosphorylierungsstelle trotz ausreichender Menge des Phosphopeptids zu. Es ist denkbar, dass PknA-KD_{His} und PknL-KD_{His} mehr als nur eine Aminosäure in diesem OdhI-Peptidfragment von Aminosäure 2 – 19 phosphorylieren können, so dass evtl. ein Gemisch von verschiedenen einfach phosphorylierten Peptidfragmenten vorlag und dadurch die Determination der OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) in der MALDI-TOF-MS/MS-Analyse erschwert war. Da die $OdhI_{Strep}$-Phosphorylierung durch PknB-KD_{His} und PknG-KD_{His} nicht effizient war und keine eindeutig phosphorylierten OdhI-Banden nach Coomassie-Färbung

sichtbar waren (vgl. Abb. 5.21), konnte in diesen beiden Fällen auch keine massenspektrometrische Analyse erfolgen.

Als nächstes wurde einmalig der Versuch unternommen, durch PknA-KD_{His}-phosphoryliertes $OdhI_{Strep}$-Protein auf einem 2-D-Gel aufzutrennen und zu isolieren, um dadurch evtl. die Möglichkeit zu haben, daraus gewonnene tryptische Peptidfragmente bzw. Phosphopeptidfragmente zur besseren Bestimmung der OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) in massenspektrometrischen Analysen zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ein *in-vitro*-Phosphorylierungsansatz, der PknA-KD_{His} und $OdhI_{Strep}$ enthielt, einer 2-D-Gelelektrophorese (pH-Bereich 4,0 – 5,0) unterzogen. In Abb. 5.23-C ist der Ausschnitt des 2-D-Gels im Bereich von ca. 12 – 19 kDa sowie einem pI von ca. 4,2 – 4,7 dargestellt. Als direkter Vergleich sind 2-D-Gele im gleichen Massen- bzw. pI-Bereich dargestellt, die mit Zellextrakten des *C. glutamicum* Wildtyps (vgl. Abb. 5.23-A) sowie der Δ*ppp*-Mutante (vgl. Abb. 5.23-B) erhalten wurden. Diese 2-D-Gele stammen aus vorherigen 2-D-Gelelektrophoresestudien (vgl. Kapitel V.2.2). Die als „2“ und „3“ in Abb. 5.23-C markierten Proteinspots konnten zwar aufgrund ihrer Quantität im Gegensatz zu den Spots „0“ und „1“ nicht als OdhI in massenspektrometrischen Analysen identifiziert werden, doch ist zu vermuten, dass es sich bei Proteinspot „2“ um zweifach-phosphoryliertes OdhI handelt, und es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dem mit „3“ markierten Proteinspot um dreifach-phosphoryliertes $OdhI_{Strep}$-Protein handeln könnte, zumal die Position dieses Proteinspots im 2-D-Gel eine weitere Phosphorylierung auf Grund des verschobenen pI-Wertes suggeriert. Dieser als „3“ markierte Proteinspot war in den vorherigen 2-D-Gelelektrophoresestudien mit Zellextrakten des Wildtyps sowie der Δ*ppp*-Mutante unter den gewählten Kultivierungsbedingungen optisch (bei Coomassie-Färbung) nicht nachweisbar (vgl. Abb. 5.23-A und Abb. 5.23-B). Da es sich bei diesem Ansatz um ein Einzelexperiment handelte, müssten diese 2-D-Gelelektrophoresestudien wiederholt und ggf. auch mit den anderen Kinasedomänen durchgeführt werden. Das Resultat unterstützt die Vermutung, dass PknA-KD_{His} $OdhI_{Strep}$ vermutlich an mehr als nur einem Aminosäurerest phosphorylieren kann.

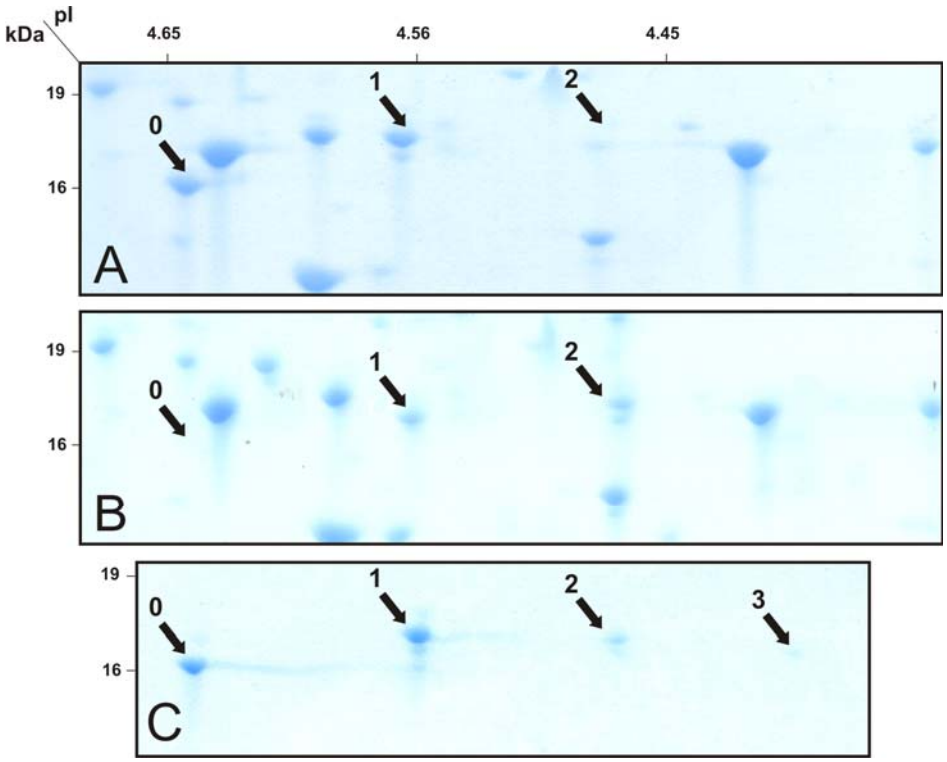


Abbildung 5.23: Vergleichende Ausschnitte von 2-D-Gelen bei Verwendung von (A) Zellextrakt aus *C. glutamicum* Wildtyp, (B) Zellextrakt aus *C. glutamicum* Δ*ppp* und (C) 10 µg gereinigtem OdhI$_{Strep}$-Protein nach *in-vitro*-Phosphorylierung durch PknA-KD$_{His}$. Die Ausschnitte des *C. glutamicum* Wildtyps sowie der Δ*ppp*-Mutante entstammen aus Abb. 5.15 und sind hier zum Vergleich dargestellt. **(C)** 10 µg OdhI$_{Strep}$ wurde mit 10 µg PknA-KD$_{His}$ und 2 mM ATP in einem Reaktionsvolumen von 100 µl für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend sofort mit 9 Vol. Aceton bei -20 °C gefällt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 18 cm Immobiline DryStrips mit einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0 (GE Healthcare) und für die nachfolgende SDS-PAGE ExcelGel XL SDS 12 – 14-Fertiggele (GE Healthcare) verwendet. Die Proteinspots „0“, „1“ und „2“ stellen vermutlich unphosphoryliertes, einfach-phosphoryliertes und zweifach-phosphoryliertes OdhI-Protein dar (vgl. Abb. 5.15). Der Proteinspot „3“ konnte mittels MALDI-TOF-MS-Analyse nicht identifiziert werden.

3.3.2 *In-vitro*-Phosphorylierungsassays mit mutierten OdhI-Derivaten

Da die massenspektrometrischen Analysen zur Bestimmung der OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) bei Verwendung von unmutiertem OdhI$_{Strep}$-Protein in den *in-vitro*-Phosphorylierungsassays mit PknA-KD$_{His}$, PknB-KD$_{His}$ und PknL-KD$_{His}$ keine eindeutige Aussage zuließen (vgl. Kapitel V.3.3.1), sollten mutierte OdhI$_{Strep}$-Derivate in weiteren *in-vitro*-Phosphorylierungsassays eingesetzt werden. Das Ziel sollte es sein, ein OdhI$_{Strep}$-Derivat zu erhalten, welches genau an den Serin- oder/und Threoninresten einen Aminosäureaustausch gegen Alanin trägt, die von PknA-KD$_{His}$, PknB-KD$_{His}$ bzw. PknL-KD$_{His}$ phosphoryliert werden. Somit könnte man einen indirekten Rückschluß auf die

entsprechende OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) ziehen. In diesem Zusammenhang lagen die Plasmide pAN3K-*odhI*-T14A (Niebisch *et al*., 2006), pAN3K-*odhI*-T15A (Niebisch *et al*., 2006) und pAN3K-*odhI*-T14A/T15A (Niebisch und Bott, unveröffentlichte Daten) bereits vor, die der Aufklärung der PknG-abhängigen OdhI-Phosphorylierung dienten. Niebisch *et al*. (2006) konnten so zeigen, dass OdhI von PknG an Thr-14 phosphoryliert wird, da keine *in-vitro*-Phosphorylierung des OdhI-T14A-Derivats mehr zu beobachten war. Da das Peptidfragment, das die Aminosäuren 2 – 19 (SDNNGTPEPQVETTSVFR) umfasst, das bis zu diesem Zeitpunkt einzige in massenspektrometrischen Analysen detektierbare OdhI-Phosphopeptidfragment darstellte, wurden ausgehend vom Plasmid pAN3K-*odhI*-T14A/T15A weitere Plasmide konstruiert. Da in *M. tuberculosis* die Phosphorylierung von GarA, dem zu OdhI homologen Protein, durch PknB am Threoninrest-22 beschrieben ist (Villarino *et al*., 2005), wurde es als möglich erachtet, dass der Threoninrest-15, der dem Threoninrest-22 im GarA-Protein entspricht, eine weitere OdhI-Phosphorylierungsstelle darstellen könnte. Die im Folgenden konstruierten Plasmide kodieren für OdhI-Derivate, die neben den Mutationen T14A und T15A die Aminosäureaustausche S2A, T7A oder/und S16A enthalten. Die in Tabelle 5.5 aufgelisteten Plasmide wurden in *E. coli* BB1553 transferiert und zur Überproduktion und Reinigung der verschieden mutierten OdhI-Derivate eingesetzt. Die isolierten Proteine wurden anschließend für die *in-vitro*-Phosphorylierung mit PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His}, PknG-KD_{His} und PknL-KD_{His} eingesetzt.

Tabelle 5.5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide, die für verschieden mutierte OdhI-Derivate kodieren.

Vorliegende bzw. konstruierte Plasmide
pAN3K-*odhI*-T14A
pAN3K-*odhI*-T15A
pAN3K-*odhI*-T14A/T15A
pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A
pAN3K-*odhI*-T7A/T14A/T15A
pAN3K-*odhI*-T14A/T15A/S16A
pAN3K-*odhI*-S2A/T7A/T14A/T15A
pAN3K-*odhI*-S2A/T14A/T15A/S16A
pAN3K-*odhI*-T7A/T14A/T15A/S16A
pAN3K-*odhI*-S2A/T7A/T14A/T15A/S16A

Die Phosphorylierungsassays unter Verwendung von [γ-^{33}P]-ATP ergaben, dass selbst mit der $OdhI_{Strep}$-S2A/T7A/T14A/T15A/S16A-Variante mit PknA-KD_{His} und PknL-KD_{His} ein starkes und mit PknB-KD_{His} ein etwas schwächeres OdhI-Phosphorylierungssignal im Autoradiogramm detektierbar war. Überraschenderweise konnte auch mit PknG-KD_{His} eine Phosphorylierung dieses OdhI-Derivats gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Obwohl in den

vorherigen massenspektrometrischen Analysen kein weiteres OdhI-Phosphopeptid detektiert werden konnte, muss es aufgrund dieser Resultate noch eine weitere *in-vitro*-OdhI-Phosphorylierungsstelle geben, die nicht im Bereich von Position 2 – 19 lokalisiert ist. Allerdings scheint die Phosphorylierung an diesem Rest nicht sehr effizient zu sein.

3.3.3 Massenspektrometrische Analysen mittels ESI-MS/MS

Zusätzlich zu den MALDI-TOF-MS-Analysen erfolgten zum Ende dieser Doktorarbeit extern am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf (BMFZ; Frau Dr. Metzger) ESI-TOF-MS- und ESI-TOF-MS/MS-Analysen von *in vitro* phosphoryliertem $OdhI_{Strep}$ nach Inkubation mit PknA-KD_{His} bzw. PknL-KD_{His} mittels eines ESI-QqTOF-Gerätes (QSTAR XL, Applied Biosystems). Im Gegensatz zur MALDI-MS ($[M+H]^+$) entstehen bei der ESI-MS mehrfach geladene Peptid-Ionen ($[M+H]^+$; ($[M+2H]^{++}$; $[M+3H]^{+++}$ etc.), so dass einzelne Peptidfragmente deshalb mehrere Signale mit unterschiedlichen Ladungen hervorrufen können. In Abb. 5.24-A ist ein Ausschnitt von tryptisch-verdautem unphosphoryliertem $OdhI_{Strep}$ dargestellt sowie das den Aminosäuren 2 – 19 zugeordnete zweifach positiv geladene Peptidfragment (989,42 m/z). Nach Inkubation mit PknA-KD_{His} bzw. PknL-KD_{His} konnte die Phosphorylierung des Peptidfragmentes von Aminosäure 2 – 19, dass auch in den MALDI-TOF-MS-Analysen detektiert wurde, bestätigt werden, da ein zusätzlicher Peak bei 1029,52 m/z detektiert wurde (vgl. Abb. 5.24-B), der einem entsprechend einfach phosphoryliertem Peptidfragment zugeordnet werden konnte (Δ40 Da, da das Phosphopeptidfragmention zweifach geladen ist). Eine weitere Analyse mittels ESI-TOF-MS/MS ergab, dass sowohl bei Inkubation mit PknA-KD_{His} als auch bei Inkubation mit PknL-KD_{His} der Threoninrest-15 phosphoryliert wird, da ein einfach-geladenes Ion der y-Serie bei 689,3 m/z detektiert wurde, welches der Aminosäuresequenz pTSVFR zugeordnet werden kann (vgl. Abb. 5.24-C). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch der Threoninrest-14 phosphoryliert wird, da das y_6-Fragmention von 790,3 m/z genauso der Aminosäuresequenz pTTSVFR wie der Sequenz TpTSVFR zugeordnet werden könnte. Es könnte also auch ein Gemisch aus an Thr-14 und Thr-15-phosphoryliertem OdhI vorliegen. Zusätzlich wurde bei diesen ESI-TOF-MS-Analysen ein OdhI-Phosphopeptidfragment identifiziert, welches den Aminosäuren 25 – 52 (EMESSTGTAPASTGAENLPAGSALLVVK) zugeordnet wurde (928,84 m/z; Methionin zusätzlich oxidiert; vgl. Abb. 5.24-B), das jedoch im Gegensatz zum Phosphopeptidfragment von Aminosäure 2 – 19 eine deutlich geringere Intensität zeigte. Das korrespondierende unphosphorylierte Peptidfragment wird bei 896,76 m/z detektiert (Δ26,7 Da, da das Phosphopeptidfragmention dreifach geladen ist; vgl. Abb. 5.24-A). Die ESI-TOF-MS/MS-Analyse dieses OdhI-Phosphopeptids ergab, dass der Serinrest-46 in diesem Peptid phosphoryliert vorliegt, da im y_{10}-Fragment eine

Phosphorylierung eines sowohl einfach- (1034,5 m/z) als auch eines zweifach-geladenen Ions (517,8 m/z) nachweisbar war, welches den Aminosäuren PAGpSALLVVK entspricht (vgl. Abb. 5.24-D). Somit konnte eine Erklärung für die Phosphorylierung von durch PknA-KD_{His} und PknL-KD_{His} geliefert werden.

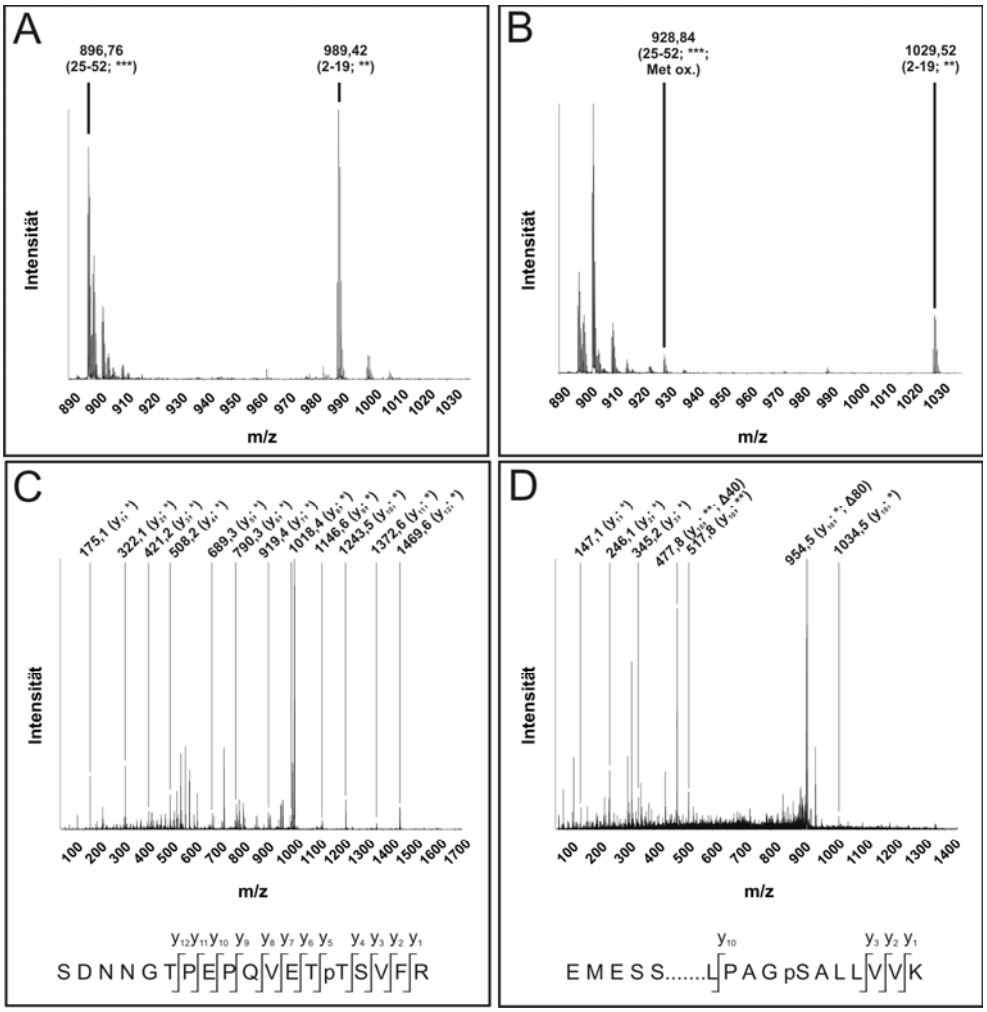


Abbildung 5.24: Ausschnitt eines ESI-TOF-MS-Spektrums von tryptisch-verdautem unphosphoryliertem $OdhI_{Strep}$ (A) und von tryptisch-verdautem $OdhI_{Strep}$ nach Inkubation mit PknA-KD_{His} (ein vergleichbares Resultat wurde mit PknL-KD_{His} erhalten) (B) sowie ein Ausschnitt eines ESI-TOF-MS/MS-Spektrums des OdhI-Phosphopeptidfragmentes von Aminosäure 2 – 19 (1029,52 m/z) (C) und des OdhI-Phosphopeptidfragmentes von Aminosäure 25 – 52 (923,84 m/z; Met. nicht ox.) (D).
*** = $[M+H]^+$; ** = $[M+2H]^{++}$; *** = $[M+3H]^{+++}$.**

4. Identifizierung von FtsZ und Icd als weitere *in-vitro*-Substrate für Ser-/Thr-Proteinkinasen in *C. glutamicum*

Während der 2-D-Gelelektrophoresestudien zur Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus in *C. glutamicum* (vgl. Kapitel V.2.2) wurden beim Vergleich der 2-D-Gele des *C. glutamicum* Wildtyp-Stammes und der Δ*ppp*-Mutante drei zusätzliche Proteinspots im Zellextrakt des Δ*ppp*-Stammes in allen drei unabhängig durchgeführten Versuchen detektiert, und zwar im Bereich zwischen 50 und 75 kDa und zwischen einem pI von 4,45 und 4,59. Diese Spots waren im 2-D-Gel des Wildtyps nicht vorhanden. In Abb. 5.25 sind diese Spots als „1“, „2“ und „3“ bezeichnet.

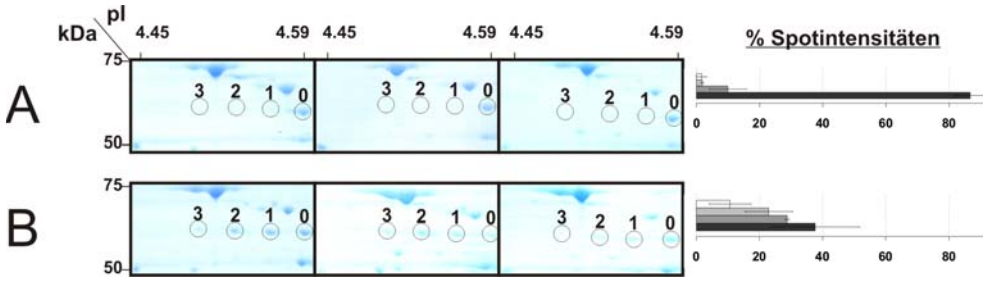


Abbildung 5.25: Ausschnitte vergleichender 2-D-Gele mit Zellextrakten des *C. glutamicum* Wildtyp-Stammes (A) und der Δ*ppp*-Mutante (B) sowie densitometrische Auswertung der Intensitäten der mit „0“, „1“, „2“ und „3“ bezeichneten Proteinspots. Die beiden Stämme wurden in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert und 300 µg Gesamtprotein in den 2-D-Gelelektrophoresen eingesetzt (vgl. Kapitel V.2.2). Für die 1. Dimension wurden Immobiline DryStrips im pH-Bereich von 4,0 – 5,0 (GE Healthcare) verwendet und hier dargestellt sind Ausschnitte im pH-Bereich von ca. 4,45 – 4,59 bzw. einem Massenbereich von ca. 50 – 75 kDa von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die mit dem Programm AIDA V2.41 (Fuji) densitometrisch ausgewerteten Intensitäten der Proteinspots „0“ (schwarz), „1“ (dunkelgrau), „2“ (hellgrau) und „3“ (weiß) sind als Balkendiagramm (Mittelwert inklusive Standardabweichung) dargestellt. Alle vier Proteinspots wurden in der Δ*ppp*-Mutante mittels massenspektrometrischer Analyse als FtsZ (Cg2366) identifiziert.

Die hierbei eingesetzten Zellextrakte wurden aus über Nacht in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultivierten Zellen gewonnen (vgl. Kapitel V.2.2). Die in Abb. 5.25 markierten Proteinspots „1“, „2“ und „3“ im Δ*ppp*-Stamm und der mit „0“ bezeichnete Proteinspot, der sowohl im Wildtyp-Stamm als auch in der Δ*ppp*-Mutante sichtbar war, wurden in massenspektrometrischen Analysen als Cg2366 (442 Aminosäuren; 47,2 kDa) identifiziert. Das essentielle (Honrubia *et al*., 2001) und im *dcw*-Cluster (Letek *et al*., 2008) lokalisierte Genprodukt von *cg2366* (Kobayashi *et al*., 1997; Honrubia *et al*., 1998) ist FtsZ (*F*ilamentous *t*emperature *s*ensitive *Z*), ein zu Tubulin homologes Protein, welches in die

Zellteilung involviert ist und dabei in der Zellmitte eine Z-Ring-ähnliche Struktur durch Polymerisation bildet, an die weitere Proteine der Zellteilungsmaschinerie wie FtsW binden können (Valbuena *et al*., 2007). Außerdem besitzt FtsZ GTPase-Aktivität, die für die Polymerisation entscheidend ist. In *M. tuberculosis* wird FtsZ von PknA phosphoryliert, wodurch die GTPase-Aktivität von FtsZ negativ beeinflusst wird, so dass keine Polymerisation mehr stattfinden kann (Thakur and Chakraborti, 2006). Somit lag es nahe, dass es sich bei diesen im Δ*ppp*-Stamm zusätzlich detektierten Proteinspots um phosphorylierte FtsZ-Isoformen handelt. Massenspektrometrische Analysen von diesen tryptisch verdauten Proteinspots lieferte nur für den in Abb. 5.25 bezeichneten Spot „2“ in der Δ*ppp*-Mutante die Identifizierung eines FtsZ-Phosphopeptids. Es konnte ein neben dem Parental-Peak bei 1616,0 m/z ein zusätzlicher Peak bei 1696,0 m/z (Δ80 Da) detektiert werden, welcher den Aminosäuren 381 – 395 zugeordnet wurde (Daten nicht gezeigt). Eine genaue Bestimmung der Phosphorylierungsstelle mittels MALDI-TOF-MS/MS-Analyse war auf Grund einer zu geringen Menge an FtsZ-Phosphopeptidfragment nicht möglich.

In Analogie zur *in-vitro*-OdhI-Phosphorylierung (vgl. Kapitel V.3.3.1) sollte die Frage beantwortet werden, welche der vier STPKs für die FtsZ-Phosphorylierung verantwortlich sind und welche Aminosäurereste im FtsZ-Protein phosphoryliert werden. Da drei zusätzliche FtsZ-Proteinspots in der Δ*ppp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp detektierbar waren, wurden zumindest drei FtsZ-Phosphorylierungsstellen vermutet. Das für die *in-vitro*-Phosphorylierungsstudien benötigte FtsZ-Protein wurde freundlicherweise in gereinigter Form als aminoterminal mit einem Decahistidin-„Tag“ versehene Variante von Astrid Schwaiger und Dr. Marc Bramkamp (Universität zu Köln) nach Reinigung aus *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET16b-*ftsZ* (463 Aminosäuren) bereitgestellt. FtsZ zeigt im SDS-Gel eine apparente Masse von ca. 55 – 60 kDa (vgl. Abb. 5.26-A) und liegt damit über der berechneten Masse von 49,7 kDa. Als nächstes wurde gereinigtes $FtsZ_{His}$-Protein zusammen mit PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His}, PknG-KD_{His} und PknL-KD_{His} sowie 1 µCi [γ-^{33}P]-ATP inkubiert. Wie bei den *in-vitro*-OdhI-Phosphorylierungsstudien fand die Inkubation in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 30 min bei 37 °C statt. In Abb. 5.26-B ist zu erkennen, dass $FtsZ_{His}$ durch PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His} wie auch PknL-KD_{His} *in vitro* phosphoryliert wurde, wohingegen mit PknG-KD_{His} in vier Ansätzen keine sichtbare FtsZ-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte.

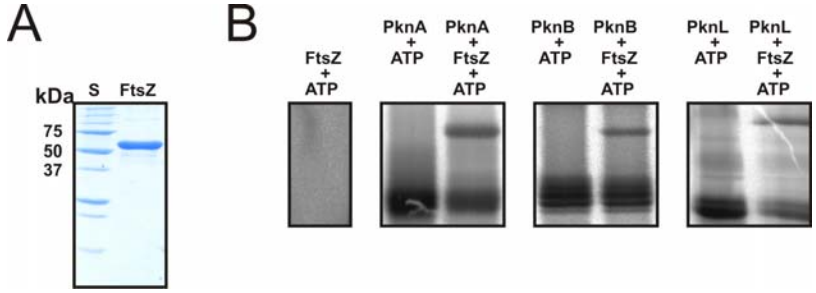


Abbildung 5.26: SDS-PAGE-Analyse von gereinigtem und Histidin-„getaggtem" FtsZ und Analyse der Phosphorylierung von $FtsZ_{His}$ durch PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His} und PknL-KD_{His}. (A) SDS-PAGE-Analyse von $FtsZ_{His}$ (2 µg) mit anschließender Coomassie-Färbung. **(B)** *In-vitro*-Phosphorylierung von 2 µg $FtsZ_{His}$ nach Inkubation mit 2 µg PknA-KD_{His}, 4 µg PknB-KD_{His} bzw. 1 µg PknL-KD_{His} und 1 µCi [γ-^{33}P]-ATP in einem Gesamtvolumen von 20 µl und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C. Die Proteine wurden auf einem 15 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, 1 h bei 80 °C getrocknet und dargestellt sind Ausschnitte in einem Massenbereich von ca. 30 – 75 kDa nach Visualisierung mit einem PhosphorImager.

Parallel zu den radioaktiven *in-vitro*-Phosphorylierungsansätzen wurden Phosphorylierungsexperimente mit den gleichen Mengen Protein und 2 mM nicht-radioaktivem ATP durchgeführt, wobei die Proben 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend einer SDS-PAGE-Analyse mit Coomassie-Färbung unterzogen wurden. Ausgeschnittene FtsZ-Proteinbanden aus diesen Coomassie-gefärbten SDS-Gelen erlaubten eine massenspektrometrische Analyse von tryptisch-verdautem unphosphoryliertem und phosphoryliertem $FtsZ_{His}$-Protein, welches im Vergleich zu phosphoryliertem $OdhI_{Strep}$ kein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel erkennen ließ. Es konnten die in Abb. 5.27-A aufgelisteten FtsZ-Phosphopeptidfragmente bei Inkubation von $FtsZ_{His}$ mit PknA-KD_{His} bzw. PknL-KD_{His} eindeutig *via* MALDI-TOF-MS- und MALDI-TOF-MS/MS-Analyse identifiziert werden (vgl. auch Tabelle A2), doch erlaubte die Menge an vorhandenen Phosphopeptidfragmenten in den Proben erneut keine Determination der Phosphorylierungsstelle(n). Es wurden auch nicht alle Serin- und Threoninreste im FtsZ-Protein erfasst. Das Phosphopeptidfragment von Aminosäure 381 – 395 wurde auch bereits im Spot „2" des 2-D-Gels der Δ*ppp*-Mutante identifiziert. Extern am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Universität zu Düsseldorf (BMFZ; Frau Dr. Metzger) mittels ESI-TOF-MS und ESI-TOF-MS/MS analysierte $FtsZ_{His}$-Proben, die mit PknA-KD_{His} bzw. PknL-KD_{His} phosphoryliert worden waren, ergaben die in Abb. 5.27-B aufgelisteten Phosphopeptide bzw. Phosphorylierungsstellen, so dass bisher eindeutig der Threoninrest-63 als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden konnte. Zusammengefasst konnten die Aminosäuren Thr-108, Thr-125, Thr-130, Ser-328, Thr-342, Thr-343, Thr-346, Ser-353, Ser-381, Thr-387 und Thr-388 als weitere mögliche FtsZ-Phosphorylierungsstellen identifiziert werden.

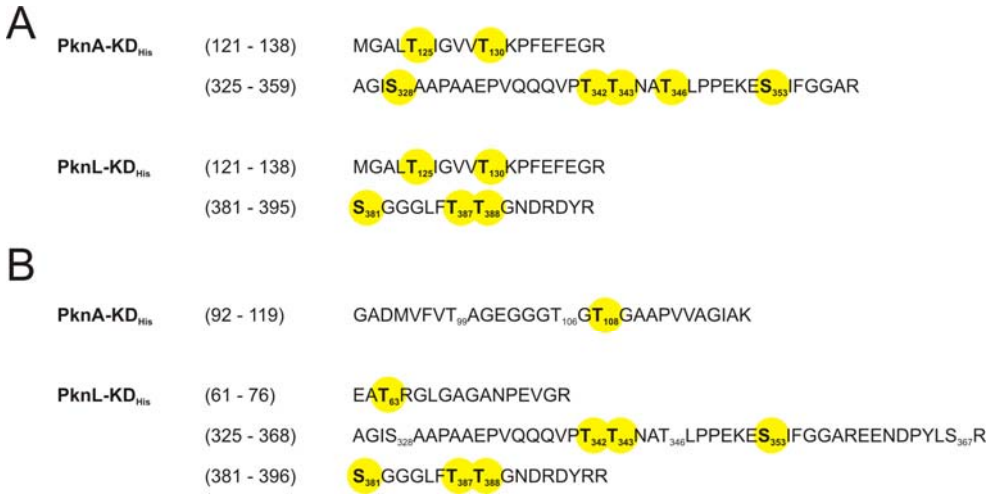


Abbildung 5.27: Mittels MALDI-TOF-MS- bzw. MALDI-TOF-MS/MS-Analyse (A) und mittels ESI-TOF-MS- bzw. ESI-TOF-MS/MS-Analyse (B) identifizierte FtsZ$_{His}$-Phosphopeptidfragmente bzw. mögliche FtsZ-Phosphorylierungsstellen nach *in vitro* Inkubation mit PknA-KD$_{His}$ und PknL-KD$_{His}$.

Im Rahmen der Suche nach weiteren STPK-Substrate wurde die Isocitrat-Dehydrogenase (Icd; Cg0766; 738 Aminosäuren) (Eikmanns *et al*., 1995) in *in-vitro*-Phosphorylierungsstudien getestet. Obwohl der theoretische isoelektrische Punkt der Isocitrat-Dehydrogenase bei 4,72 und die berechnete molekulare Masse bei 80 kDa liegt, konnte in den 2-D-Gelelektrophoresestudien, die diesen Bereich abdeckten, kein entsprechender Proteinspot bei Vergleich des Wildtyps und der Δ*ppp*-Mutante ausgemacht werden. Bendt *et al*. (2003) konnten in früheren Untersuchungen phosphoryliertes Icd-Protein in 2-D-Gelelektrophoresestudien unter Verwendung einer *in-vivo*-Radioaktiv-Markierung mit [^{33}P]-Phosphorsäure sowie mittels spezifischer Antikörper gegen Phosphoserin und Phosphothreonin nachweisen, so dass eine Phosphorylierung von Icd durch STPKs möglich erschien. Gereinigtes und mit einem Decahistidin-„Tag“ versehenes Icd-Protein (759 Aminosäuren, 82,6 kDa) wurde freundlicherweise von Meike Baumgart (IBT-1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt, welches aus dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*icd* aufgereinigt worden war (vgl. Abb. 5.28-A). Die *in-vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit PknA-KD$_{His}$, PknB-KD$_{His}$, PknG-KD$_{His}$ und PknL-KD$_{His}$ und Icd$_{His}$ als Substrat wurden in Analogie zu den bisherigen Phosphorylierungsexperimenten sowohl mit radioaktivem [γ-^{33}P]-ATP als auch mit nicht-radioaktivem ATP (2 mM) durchgeführt. In Abb. 5.28-B wird ersichtlich, dass Icd$_{His}$ *in vitro* durch PknA-KD$_{His}$, PknB-KD$_{His}$ und PknG-KD$_{His}$ bei Verwendung von [γ-^{33}P]-ATP als Phosphordonor phosphoryliert werden kann. In den parallel durchgeführten Assays mit nicht-radioaktivem ATP konnte

allerdings in MALDI-TOF-MS-Analysen kein einziges Icd-Phosphopeptidfragment detektiert werden. Da nicht alle tryptischen Peptidfragmente von Icd_{His} bei der MS-Analyse detektiert wurden (vgl. Tabelle A3), ist zu vermuten, dass die Phosphorylierungsstelle(n) in diesen nicht detektierten Peptiden zu finden ist/sind.

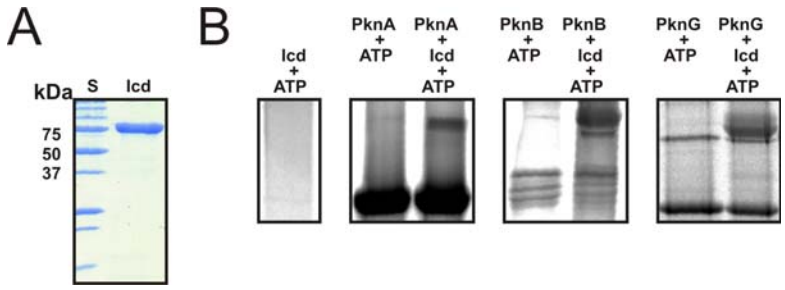


Abbildung 5.28: SDS-PAGE-Analyse von gereinigtem und Histidin-„getaggtem" Icd und Analyse der Phosphorylierung von Icd_{His} durch $PknA\text{-}KD_{His}$, $PknB\text{-}KD_{His}$ und $PknG\text{-}KD_{His}$. (A) SDS-PAGE-Analyse von Icd_{His}-Protein (2 µg) mit anschließender Coomassie-Färbung. **(B)** *In-vitro*-Phosphorylierung von 2 µg Icd_{His} nach Inkubation mit 2 µg $PknA\text{-}KD_{His}$, 5 µg $PknB\text{-}KD_{His}$ bzw. 5 µg $PknG\text{-}KD_{His}$ und 1 µCi [γ-^{33}P]-ATP in einem Gesamtvolumen von 20 µl und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C. Die Proteine wurden auf einem 15 %-igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, 1 h bei 80 °C getrocknetet. Dargestellt sind Ausschnitte in einem Massenbereich von ca. 30 – 100 kDa nach Visualisierung mit einem PhosphorImager.

Neben OdhI konnte somit einerseits FtsZ als neues *in-vitro*-Substrat für STPKs, aber auch indirekt als *in-vivo*-Substrat für STPKs identifiziert werden, da *in vivo* eine Dephosphosphorylierung durch Ppp stattfindet. Andererseits konnte Icd als weiteres *in-vitro*-Substrat für STPKs identifiziert werden.

VI Diskussion

1 Welche Rolle spielen OdhI und PknG in *C. glutamicum*?

In dieser Arbeit wurde die posttranslationale Regulation des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (ODH) durch OdhI und PknG in *C. glutamicum* detaillierter untersucht. Dieser Regulationsmechanismus der ODH ist bisher für *C. glutamicum* einzigartig und noch für keine andere prokaryontische oder eukaryontische Spezies beschrieben.

Das 15-kDa ODH-Inhibitorprotein OdhI ist in *C. glutamicum* nicht essentiell und besitzt eine FHA-Domäne (Niebisch *et al*., 2006), welche vermutlich an der Interaktion mit PknG und den anderen Ser-/Thr-Proteinkinasen (STPKs) sowie der Phospho-Ser-/Thr-Proteinphosphatase (STPP) Ppp beteiligt ist. Ein Protein mit einer FHA-Domäne kann an Phosphothreonin-Epitope (Pallen *et al*., 2002) wie z.B. von autophosphorylierten STPKs binden, so wie es auch schon für die Interaktion von PknF und den beiden FHA-Domänen des ABC-Transporters Rv1747 (Molle *et al*., 2004; Curry *et al*., 2005) oder PknH und der FHA-Domäne von EmbR (Molle *et al*., 2003b) aus *M. tuberculosis* beschrieben ist. Es ist aber auch vorstellbar, dass eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen einem phosphorylierten OdhI-Aminosäurerest und der eigenen FHA-Domäne stattfindet, so dass durch solch eine intramolekulare Konformationsänderung ein Wechsel zwischen „aktivem“ (unphosphorylierter Zustand) und „inaktivem“ OdhI-Protein (phosphorylierter Zustand) stattfinden könnte. Im Hinblick auf die Struktur verhält sich OdhI in einer nativen Gelelektrophorese und bei einer Größenausschlusschromatographie gemäß eines Dimers (vgl. Abb. 5.2). OdhI ist in der Ordnung der Actinomycetales hoch konserviert, da eine mind. 60 %-ige Sequenzidentität in den in Abb. 6.1 aufgelisteten Actinomyceten besteht (vollständiges Alignment nicht gezeigt).

PknG auf der anderen Seite dieses Regulationsmodells, verantwortlich für die OdhI-Thr-14-Phosphorylierung, ist eine lösliche STPK in *C. glutamicum*, da sie als einzige der vier STPKs keine Transmembranhelix besitzt (Niebisch *et al*., 2006). PknG ist in *C. glutamicum* ebenfalls nicht essentiell (Niebisch *et al*., 2006) und zeigt im Vergleich zu *M. tuberculosis* (Av-Gay and Everett, 2000) oder anderen Actinomyceten (Narayan *et al*., 2007) einen ähnlichen strukturellen Aufbau mit einer aminoterminal lokalisierten Kinasedomäne (vgl. Abb. 5.17). PknG, in *M. tuberculosis* ebenfalls nicht essentiell (Cowley *et al*., 2004), weist eine mind. 31 %-ige Sequenzidentität in den in Abb. 6.1 aufgeführten Actinomyceten auf (Alignment nicht gezeigt). Folglich kann ein ähnliches Regulationsmodell für diese Organismen als sehr wahrscheinlich angenommen und *C. glutamicum* auf Grund seiner apathogenen Eigenschaften als hervorragender Modellorganismus genutzt werden.

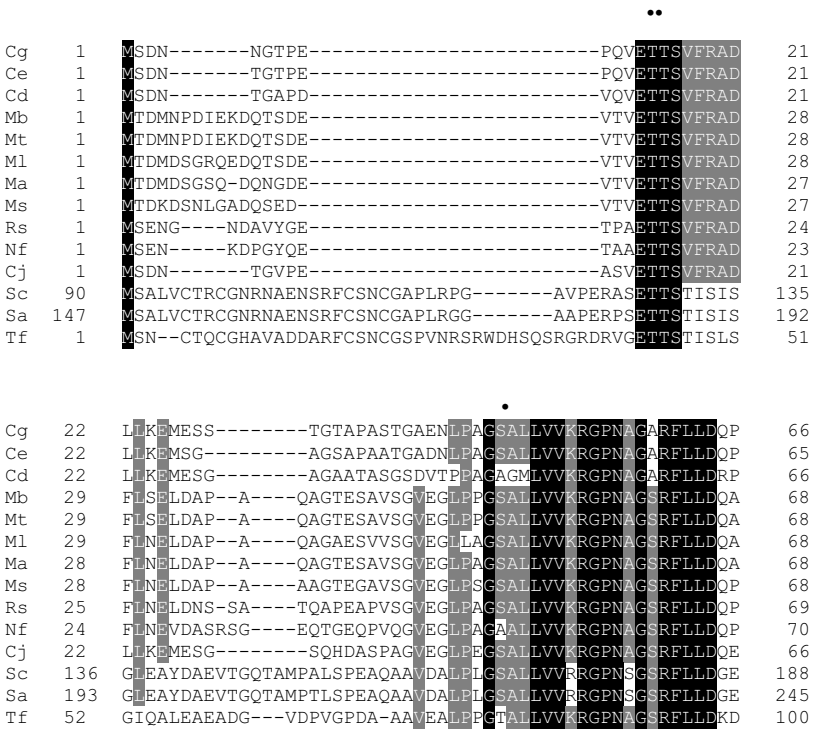


Abbildung 6.1: Sequenz-Alignment des N-terminalen Teils des OdhI-Proteins verschiedener Actinomyceten mittels ClustalW V1.83 (Thompson *et al*., 1994). Cg = *Corynebacterium glutamicum*; Ce = *Corynebacterium efficiens*; Cd = *Corynebacterium diphtheriae*; Mb = *Mycobacterium bovis subsp. bovis*; Mt = *Mycobacterium tuberculosis*; Ml = *Mycobacterium leprae*; Ma = *Mycobacterium avium paratuberculosis*; Ms = *Mycobacterium smegmatis*; Rs = *Rhodococcus sp.*; Nf = *Nocardia farcinica*; Cj = *Corynebacterium jeikeium*; Sc = *Streptomyces coelicolor*; Sa = *Streptomyces avermitilis*; Tf = *Thermobifida fusca*. Die Zahlen geben die Positionen der amino- und carboxyterminalen Aminosäuren an. Schwarz hinterlegt sind Aminosäuren, die in allen Sequenzen vorkommen. Grau hinterlegt sind Aminosäuren, die in wenigstens elf Sequenzen vorkommen.
• = in *C. glutamicum* identifizierte Phosphorylierungsstellen (Thr-14, Thr-15, Ser-46).

In *M. tuberculosis* ist vermutlich kein funktioneller ODH-Komplex im Tricarbonsäurezyklus vorhanden (Tian *et al*., 2005a, b), da in dieser Species eine 2-Oxoglutarat-Decarboxylase-Aktivität anstelle einer 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität des zu OdhA homologen Proteins SucA (Rv1248c) beschrieben ist. Erst kürzlich konnte in den Arbeiten von O'Hare *et al*. (2008) eine Interaktion zwischen GarA, dem zu OdhI homologen Protein, und SucA sowie eine daraus resultierende SucA-Inhibition in *M. tuberculosis* aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Niebisch *et al*. (2006) und den in dieser Arbeit durchgeführten Coreinigungsexperimenten mit dem Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032::pK18*mob-odhI*$_{Strep}$ (vgl. Abb. 5.4) konnte in *M. tuberculosis* darüber hinaus eine Interaktion zwischen GarA und der NAD-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (Rv2476c) nachgewiesen werden, die jedoch eine nur sehr geringe Sequenzidentität zur

corynebakteriellen NADP-abhängigen Gdh (Cg2280) aufweist (O'Hare *et al*., 2008). Obwohl in diesen Coreinigungsexperimenten außer OdhA keine weiteren cytoplasmatischen oder membranständigen Proteine cogereinigt bzw. identifiziert werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass dennoch weitere Proteine an OdhI unter anderen Kultivierungsbedingungen binden können.

Niebisch *et al*. (2006) konnten einen Wachstumsdefekt der *C. glutamicum*-Stämme Δ*pknG* wie auch Δ*odhI*/pJC1-*odhI*-T14A im Gegensatz zu Δ*odhI*, Δ*pknG*Δ*odhI* und Δ*odhI*/pJC1-*odhI*-T15A auf Medium mit Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle feststellen. Eine fehlende Phosphorylierung von OdhI-Thr-14 durch PknG genügt anscheinend, die Glutaminverwertung fast vollständig zu hemmen. Die daraus geschlossene Hypothese, das OdhI in Glutamin-Medium verstärkt phosphoryliert vorliegt, konnte in den Western-Blot-Experimenten zur Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus bestätigt werden (vgl. Abb. 5.9). Der Wachstumsdefekt einer Δ*odhA*-Deletionsmutante auf dieser Kohlenstoff- und Stickstoffquelle muss mit Vorsicht betrachtet werden (vgl. Abb. 5.12), da diese Mutante auch auf Glucose-haltigem Medium bereits einen ausgeprägten Wachstumsdefekt offenbart (Daten nicht gezeigt).

In diesem Zusammenhang ergaben Untersuchungen zum OdhI-Phosphorylierungsstatus des Weiteren, dass OdhI in Zellen, die in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose kultiviert worden waren, stärker phosphoryliert vorliegt als in Zellen, die in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose gewachsen waren (vgl. Abb. 5.3). Dies kann vermutlich auf vorhandenes Glutamin im BHI-Komplexmedium, welches u.a. Protein aus Kälberhirn und Rinderherz enthält, zurückgeführt werden.

Die gemessenen ODH-Aktivitäten in Zellrohextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps sowie der Δ*pknG* und der Δ*odhI*-Deletionsmutante bei Kultivierung in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose als auch in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in der exponentiellen wie auch der stationären Wachstumsphase (Daten nicht gezeigt) ließen vermuten, dass unter diesen Kultivierungsbedingungen die ODH-Aktivität nur bedingt durch OdhI und PknG moduliert wird, da in diesen Enzymassays keine signifikanten ODH-Aktivitätsunterschiede gemessen wurden, außer im Δ*pknG*-Stamm bei Kultivierung in CGXII-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in der stationären Wachstumsphase. Vermutet wurde eine höhere ODH-Aktivität im Δ*odhI*-Stamm bzw. eine niedrigere ODH-Aktivität im Δ*pknG*-Stamm. Die Tatsache, dass OdhI in Zellen, die in CGXII-Medium kultiviert wurden, geringer phosphoryliert vorliegt, könnte eine Erklärung für die ODH-Aktivitätsreduktion in der Δ*pknG*-Mutante in diesem Minimalmedium liefern. Es konnte jedoch keine direkte Korrelation zwischen der ODH-Aktivität und der Menge an unphosphoryliertem bzw. phosphoryliertem OdhI unter den gewählten Kultivierungsbedingungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle in den verschiedenen Zellextrakten festgestellt werden. Da aber in diesen ODH-

Aktivitätsbestimmungen bei Verwendung höherer Zellrohextraktmengen eine steigende spezifische ODH-Aktivität gemessen wurde, müssen diese Messungen mit Vorsicht betrachtet werden.

2 Welche Rolle spielen PknA, PknB, PknL und Ppp bei der OdhI-Phosphorylierung in *C. glutamicum*?

Neben *pknG* sind in *C. glutamicum* noch die Gene *pknA*, *pknB* und *pknL* annotiert (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003), die im Gegensatz zu PknG jedoch für membranintegrale und bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht näher charakterisierte STPKs in *C. glutamicum* kodieren. Es gab Indizien, nach denen OdhI zumindest von einer weiteren STPK phosphoryliert werden kann (Niebisch *et al*., 2006). Dies konnte durch Untersuchungen zum OdhI-Phosphorylierungsstatus mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden, da im Δ*pknG*-Deletionsstamm noch phosphoryliertes OdhI-Protein detektierbar war (vgl. Abb. 5.3). Diese Western-Blot-Methode hat gegenüber der 2-D-Gelelektrophorese einen erheblichen Zeit- und Kostenvorteil, auch wenn nur mit der letztgenannten Methode eine Unterscheidung zwischen einfach-, zweifach- und evtl. mehrfach-phosphoryliertem OdhI auf Grund des veränderten pI-Wertes erfolgen kann.

Die Tatsache, dass alle vier STPK-kodierenden Gene in *C. glutamicum* von Niebisch und Bott (unveröffentlichte Daten) deletiert werden konnten, macht *C. glutamicum* zu einem idealen Modellorganismus für Untersuchungen dieser STPKs, da in der humanpathogenen Spezies *M. tuberculosis* die Genprodukte von *pknA* und *pknB* essentiell sind (Sassetti *et al*., 2003; Kang *et al*., 2005; Fernandez *et al*., 2006). Im Widerspruch dazu steht eine kürzlich veröffentlichte Publikation von Fiuza *et al*. (2008a), in der eine Essentialität der Gene *pknA* und *pknB* auch in *C. glutamicum* beschrieben wird. Es kann jedoch vermutet werden, dass deren beschriebene Methodik zur Herstellung von Insertionsmutanten fehlerbehaftet ist. Da die beiden Gene *pknA* und *pknB* in einem putativen Operon benachbart angeordnet sind (vgl. Abb. 3.3), könnte eine nicht im Leserahmen befindliche *pknA*-Insertionsmutation einen negativen polaren Effekt auf die Expression von *pknB* ausüben. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass die gleichzeitige Deletion von *pknA* und *pknB* in *C. glutamicum* letal zu sein scheint, da mehrere Versuche, diese beiden Gene gleichzeitig zu deletieren, fehlschlugen. Die von Fiuza *et al*. (2008a) fehlgeschlagene Konstruktion einer *pknB*-Insertionsmutante kann allerdings nicht plausibel erklärt werden.

Nach der erfolgreichen Konstruktion von weiteren STPK-Doppel- und Dreifachdeletionsmutanten in dieser Arbeit wurde in den folgenden Wachstumsexperimenten festgestellt, dass die Wachstumsrate umso mehr abnimmt, je mehr STPKs gleichzeitig in *C. glutamicum* deletiert vorliegen (vgl. Abb. 5.11 und Tab. 5.4). Die geringsten

Wachstumsraten in dem sehr nährstoffreichen BHI-Komplexmedium mit zusätzlich 4 % (w/v) Glucose zeigten die beiden Dreifachdeletionsmutanten Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*. Da derartige STPK-Mehrfachdeletionen in anderen Actinomyceten noch nicht beschrieben sind, können hier keine Vergleiche herangezogen werden. Analysen zur Zellmorphologie ergaben des Weiteren, dass alle vier STPKs vermutlich einen direkten oder indirekten Einfluss auf Proteine ausüben, die in die Zellteilungsmaschinerie involviert sind, da die vier Einfachdeletionsmutanten Δ*pknA*, Δ*pknB*, Δ*pknG* und Δ*pknL* im Vergleich zum Wildtyp eine elongierte Zellmorphologie erkennen lassen (vgl. Abb. 5.13). Diese veränderte bzw. elongierte Zellmorphologie ist auch in mykobakteriellen Stämmen beschrieben, in denen die Genprodukte von *pknA* und *pknB* durch RNA-Antisense-Methodik reduziert vorliegen (Kang *et al*., 2005). Dabei könnte das in dieser Arbeit als *in-vitro*-Substrat von PknA, PknB und PknL identifizierte FtsZ-Protein eine Rolle spielen, das als in die Zellteilung involvierte GTPase fungiert (vgl. Kapitel V.4). In den anschließenden Western-Blot- und 2-D-Gelelektrophoresestudien zur Beantwortung der Frage, welche weitere STPK OdhI neben PknG zusätzlich *in vivo* noch phosphoryliert, konnte aufgezeigt werden, dass OdhI unter den gewählten Bedingungen neben PknG (Niebisch *et al*., 2006) vorwiegend von PknA *in vivo* phosphoryliert wird. Daneben scheinen aber auch PknB und PknL zur Phosphorylierung von OdhI beitragen zu können, wenn auch nur in geringem Maße (vgl. Abb. 5.14 und 5.15). Da die direkten Stimuli von PknA, PknB und PknL noch nicht bzw. von PknG nur unzureichend (Glutamin?, Glutamat?) bekannt sind, ist es durchaus vorstellbar, dass OdhI unter anderen Kultivierungsbedingungen auch stärker von PknB oder PknL als von PknG oder PknA phosphoryliert werden könnte, sowie es auch für GarA, dem zu OdhI homologen Protein aus *M. tuberculosis,* vermutet wird (Villarino *et al*., 2005; O'Hare *et al*., 2008).

Die *in-vivo*-Experimente, die zur Aufdeckung einer PknG-unabhängigen OdhI-Phosphorylierung durch PknA, PknB und PknL führten, sollten im Anschluss durch *in-vitro*-Experimente untermauert und ergänzt werden. Da es sich bei PknA, PknB und PknL im Gegensatz zu PknG um membranintegrale STPKs handelt (vgl. Abb. 5.17), wurden von PknA, PknB und PknL nur die aminoterminal lokalisierten Kinasedomänen von Aminosäure 1 – 287 ohne nachfolgende Transmembranhelix für die *in-vitro*-Phosphorylierungsstudien gereinigt. Das Derivat der löslichen Proteinkinase PknG, welches die Aminosäuren von 1 – 342 beinhaltet, sollte in diesen Experimenten als Kontrolle dienen. Nach erfolgreicher Aufreinigung konnte eine Autophosphorylierung der gereinigten Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL beobachtet werden (vgl. Abb. 5.18), sowie es mit vergleichbaren Konstrukten aus *C. glutamicum* ($PknA_{1-332}$, $PknB_{1-313}$ und $PknL_{1-396}$ (Fiuza *et al*., 2008a)) als auch aus *M. tuberculosis* ($PknA_{1-338}$ (Molle *et al*., 2006a), $PknB_{1-279\ bzw.\ 1-280\ bzw.\ 1-331}$ (Boitel *et al*., 2003; Duran *et al*., 2005; Molle *et al*., 2006b), $PknG_{1-360}$ (Molle *et al*., 2006b) und $PknL_{1-369}$ (Molle *et al*., 2006b)) bereits demonstriert werden konnte. Die nur sehr geringe

Autophosphorylierungs- sowie Transphosphorylierungsaktivität von gereinigtem PknG-KD_{His} in dieser Arbeit könnte auf das Fehlen der carboxyterminalen Aminosäuren zurückzuführen sein, da in *C. glutamicum* die am Carboxyterminus von PknG gelegenen Aminosäuren Thr-451 und Thr-787 autophosphoryliert werden (Fiuza *et al*., 2008a). Im Gegensatz dazu konnten in den Arbeiten von Fiuza *et al*. (2008a) im aminoterminalen Bereich von PknA (Thr-179, Thr-181, Ser-228, Ser-229 und Ser-231), von PknB (Thr-169) und von PknL (Thr-123) Autophosphorylierungsstellen identifiziert werden. Es ist in der erst kürzlich erschienenen Publikation von O'Hare *et al*. (2008) beschrieben, dass eine PknG-Autophosphorylierung der in dieser Spezies allerdings am Aminoterminus befindlichen Aminosäuren Thr-23, Ser-31 oder Thr-32, Thr-63 oder Thr-64 oder Ser-65 entscheidend ist für eine effiziente GarA-Interaktion. Die dennoch beobachtete und evtl. unphysiologische PknG-KD_{His}-abhängige OdhI-Transphosphorylierung kann abschließend nicht eindeutig erklärt werden. Evtl. bietet das in den *in-vitro*-Versuchen verwendete unphysiologische Enzym-Substrat-Verhältnis eine Erklärung.

Eine „*back-to-back*"-Dimerisierung der Kinasedomänen von PknB (Ortiz-Lombardía *et al*., 2003; Young *et al*., 2003; Wehenkel *et al*., 2006), PknD (Greenstein *et al*., 2007a) oder PknE (Gay *et al*., 2006), die alle eine Transmembranhelix vorzuweisen haben, konnte in *M. tuberculosis* als weiterer möglicher Aktivierungsmechanismus der Autokinaseaktivität gefunden werden. Dabei spielt die Dimerisierung wohl vermutlich *in vivo* eine mitentscheidende Rolle für die Aktivität, da angenommen wird, dass ein Stimulus, der von der extrazellulären Domäne von PknB, PknD oder PknE detektiert wird, die Dimerisierung fördert, welche wiederum die Autophosphorylierungsaktivität stimuliert. Die mit den Kinasedomänen von PknA, PknB, PknG und PknL durchgeführten nativen Größenbestimmungen lassen ebenfalls vermuten, dass eine derartige Dimerisierung bis Oligomerisierung auch bei den corynebakteriellen Kinasedomänen stattfinden könnte (vgl. Abb. 5.19 und 5.20).

Die *in-vitro*-Studien mit OdhI zeigten, dass mit PknA-KD_{His} eine effiziente OdhI-Transphosphorylierung erfolgte, wohingegen mit PknG-KD_{His} nur eine geringe OdhI-Phosphorylierung zu verzeichnen war, was, wie oben bereits erwähnt, evtl. auf dem Fehlen des Carboxyterminus beruhen könnte (vgl. Abb. 5.21). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in-vivo*-Studien zeigte PknL-KD_{His} eine sehr effiziente OdhI-Phosphorylierung *in vitro*, wohingegen mit PknB-KD_{His} wie bei den *in-vivo*-Untersuchungen nur eine sehr geringe *in-vitro*-Phosphorylierung von OdhI zu beobachten war.

Eine PknG-unabhängige *in-vitro*-OdhI-Phosphorylierung durch PknA und PknB wurde ebenfalls kürzlich in den Arbeiten von Fiuza *et al*. (2008a) aufgezeigt, die jedoch zusätzlich eine PknA-PknG-Signalkaskade postulieren. Bei dieser Signalkaskade soll PknG erst nach

einer Transphosphorylierung durch PknA aktiv in *C. glutamicum* vorliegen. Gegen dieses Modell spricht jedoch:

(i) $PknG_{Strep}$ (aus *C. glutamicum* Δ*pknG*/pEKEx2-*pknG* gereinigt) zeigt *in vitro* Auto- wie auch $OdhI_{Strep}$-Transphosphorylierungsaktivität (Niebisch *et al*., 2006).

(ii) PknG-KD_{His} (aus *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*pknG*-KD gereinigt) zeigt *in vitro* Auto- wie auch $OdhI_{Strep}$- und $OdhI_{His}$-Transphosphorylierungsaktivität.

(iii) $PknG_{Strep}$, das aus *C. glutamicum* Δ*pknA*/pEKEx2-*pknG* gereinigt wurde, zeigt *in vitro* Auto- wie auch $OdhI_{Strep}$-Transphosphorylierungsaktivität (Daten nicht gezeigt).

(iv) *C. glutamicum* Δ*pknA* zeigt im Gegensatz zu *C. glutamicum* Δ*pknG* keinen Wachstumsdefekt auf Glutamin-Medium.

Der von Fiuza *et al*. (2008a) postulierte „*Cross-Talk*" zwischen PknA und PknG kann jedoch nicht kategorisch ausgeschlossen werden. In *M. tuberculosis* ist in diesem Kontext bereits eine gegenseitige Phosphorylierung von PknA und PknB beschrieben (Kang *et al*., 2005), so dass auch zwischen den vier corynebakteriellen STPKs ein „*Cross-Talk*" möglich sein könnte.

Die Klärung der Frage, welche OdhI-Aminosäure(n) *in vitro* von PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His} bzw. PknL-KD_{His} phosphoryliert wird/werden, sollte durch massenspektrometrische Analysen erfolgen, doch hierbei ergaben sich zu Beginn keine eindeutigen Resultate. Da in den MALDI-TOF-MS-Analysen stets nur das OdhI-Phosphopeptidfragment von Aminosäure 2 – 19 nach *in-vitro*-Phosphorylierung durch PknA-KD_{His} bzw. PknL-KD_{His} detektiert wurde (vgl. Abb. 5.22), war es naheliegend, die PknA- bzw. PknL-abhängige(n) OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) in diesem Peptidfragment zu vermuten, welches neben Thr-14 noch vier zusätzliche Serin- bzw. Threoninreste (Ser-2, Thr-7, Thr-15, Ser-16) enthält. Da die PknB-abhängige *in-vitro*-OdhI-Phosphorylierung keine ausreichende Effizienz zeigte, konnten auch keine weiterführenden massenspektrometrischen Analysen unternommen werden (vgl. Abb. 5.21). Die folgenden *in-vitro*-Phosphorylierungsassays mit den in dieser Arbeit konstruierten verschiedenen OdhI-Derivaten ließen jedoch abschließend keine eindeutige Aussage über die PknA- bzw. PknL-abhängige(n) OdhI-Phosphorylierungsstelle(n) zu. Das Derivat OdhI-S2A/T7A/T14A/T15A/S16A wurde neben PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His} und PknL-KD_{His} überraschenderweise auch von PknG-KD_{His} in geringem Umfang phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Folglich musste zumindest eine weitere OdhI-Phosphorylierungsstelle in einem von diesem Peptidfragment verschiedenen OdhI-Bereich zu finden sein. Die Beobachtung, das PknG-KD_{His} dieses OdhI-Derivat noch phosphoryliert, wohingegen das Volllängenprotein $PknG_{Strep}$ keine *in-vitro*-Phosphorylierung

von OdhI-T14A zeigte (Niebisch *et al*., 2006), könnte evtl. in der Verwendung eines unphysiologischen Enzym-Substrat-Verhältnisses begründet sein. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dieser *in-vitro*-Phosphorylierung um eine unspezifische und nicht-physiologische Phosphorylierung handelt. Es konnte z.B. für die STPK PknL *in vitro* eine unspezifische Serin-Phosphorylierung im Histidin-„Tag" des Proteins (MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH) nachgewiesen werden (Canova *et al*., 2008b).

ESI-TOF-MS/MS-Analysen konnten abschließend Klarheit über die PknA- bzw. PknL-abhängigen OdhI-Phosphorylierungsstellen erbringen. In *M. tuberculosis* ist neben einer PknG-abhängigen Threoninrest-21-Phosphorylierung (O'Hare *et al*., 2008) eine PknB-abhängige *in-vitro*-Phosphorylierung von GarA, dem zu OdhI homologen Protein, am Threoninrest-22 beschrieben. GarA kann aber auch von den STPKs PknD, PknE und PknF geringfügig *in vitro* phosphoryliert werden (Villarino *et al*., 2005). Bis zu diesem Zeitpunkt war nur eine OdhI-Phosphorylierung von Thr-14 durch PknG bekannt (Niebisch *et al*., 2006). Der Threoninrest-21 und der Threoninrest-22 des GarA-Proteins entsprechen gemäß dem Alignment in Abb. 6.1 den Threoninresten 14 und 15 im OdhI-Protein von *C. glutamicum*, wobei in dieser Arbeit mittels ESI-TOF-MS/MS-Analyse der Threoninrest-15 als weitere PknA- und PknL-abhängige *in-vitro*-OdhI-Phosphorylierungsstelle in *C. glutamicum* identifiziert werden konnte. Über die zu OdhI homologen Proteine aus den anderen in Abb. 6.1 aufgelisteten Actinomyceten außer *M. tuberculosis* (Villarino *et al*., 2005; O'Hare *et al*., 2008) ist soweit noch nichts Näheres bekannt, außer, dass GarA aus *M. smegmatis* evtl. eine Rolle im Glycogen-Stoffwechsel spielt (Belanger and Hatfull, 1999). Es konnte durch diese ESI-TOF-MS/MS-Analysen aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass PknA-KD_{His} und PknL-KD_{His} evtl. auch Thr-14 *in vitro* phosphorylieren. Im Gegensatz zu Thr-14 hat die Phosphorylierung bzw. Nicht-Phosphorylierung von Thr-15 keinen Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum* mit Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, da der Stamm *C. glutamicum* Δ*odhI*/pJC1-*odhI*-T15A (Niebisch *et al*., 2006) ebenso wie die Δ*pknA*- und Δ*pknL*-Deletionsmutanten auf Glutamin-Medium wachsen. Dies lässt wiederum vermuten, dass *in vivo* vermutlich nicht Thr-14, sondern Thr-15 von PknA und PknL phosphoryliert wird. Neben Thr-14 (PknG, PknA?, PknL?) und Thr-15 (PknA und PknL) konnte *in vitro* als weitere PknA- und PknL-abhängige OdhI-Phosphorylierungsstelle der Serinrest-46 in massenspektrometrischen Analysen mittels ESI-TOF-MS/MS identifiziert werden. Dieser Rest ist in den in Abb. 6.1 aufgeführten OdhI-Homologen konserviert, mit Ausnahme der Proteine von *Corynebacterium diphtheriae*, *Nocardia farcinica* und *Thermobifida fusca*.

Da in den 2-D-Gelelektrophoresestudien und Verwendung des Zellrohextraktes einer Δ*ppp*-Mutante kein dreifach-phosphoryliertes OdhI-Protein in drei unabhängig durchgeführten Versuchen detektierbar war (vgl. Abb. 5.23), scheint eine solche Form *in vivo*

nicht vorzukommen oder aber in Mengen, die mit der verwendeten Methode nicht nachweisbar sind. Da im Zellrohextrakt der Δ*ppp*-Mutante nach ungefähr 16-stündiger ÜN-Kultivierung aber immer noch ca. 50 % des OdhI-Proteins im einfach-phosphorylierten Zustand vorliegt, kann vermutet werden, dass die gewählte Kultivierungsbedingung in BHI-Komplexmedium mit 4 % (w/v) Glucose nicht geeignet ist, um *in vivo* den evtl. vorhandenen dreifach-phosphorylierten OdhI-Zustand zu erhalten. Zur Klärung der Frage, welche Rolle die Ser-46-Phosphorylierung oder auch die Thr-15-Phosphorylierung spielt, bedarf es weiterer *in-vitro* wie *in-vivo*-Experimente. Eine OdhI-Affinitätsreinigung aus der Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*-Mutante und eine anschließende massenspektrometrische Analyse könnte z.B. Klarheit darüber bringen, ob Thr-15 und/oder Ser-46 *in vivo* tatsächlich von PknA phosphoryliert werden, vorausgesetzt, es findet unter der gewählten Kultivierungsbedingung eine OdhI-Phosphorylierung durch PknA statt. Ebenso müssten noch folgende *in-vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit den noch zu konstruierenden OdhI-Varianten OdhI-T14A/S46A, OdhI-T15A/S46A sowie OdhI-T14A/T15A/S46A durchgeführt werden, um die Frage zu beantworten, ob zumindest die Dreifach-Mutante *in vitro* nicht mehr phosphoryliert werden kann.

In *C. glutamicum* ist nur eine einzige Phospho-Ser-/Thr-Proteinphosphatase annotiert (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003), welche phosphorylierte Serin- und Threoninreste zu dephosphorylieren vermag und somit die Reversibilität der Regulation gewährleistet. Das Genprodukt von *cg0062* ist in *C. glutamicum* nicht essentiell (Schultz *et al*., 2007), doch der sehr pleomorphe Phänotyp einer Δ*ppp*-Deletionsmutante, von coccoiden bis hin zu elongierten Zellen (vgl. Abb. 5.13) sowie die sehr geringe Wachstumsrate (vgl. Abb. 5.11 und Tab. 5.4) spiegeln die Bedeutung dieses regulatorisch-wirksamen Enzyms wieder. In einer Δ*ppp*-Mutante liegen nach Wachstum in BHI-Glucose-Medium ca. 50 % von OdhI in einfach- und ca. 50 % in zweifach-phosphorylierter Form vor (vgl. Abb. 5.15). Somit scheint, wie bereits erwähnt, in *C. glutamicum* die gewählte Kultivierungsbedingung ungeeignet zu sein, um OdhI vollständig zu phosphorylieren. Gemäß dem aktuellen posttranslationalen ODH-Regulationsmodell müsste mit einer Δ*ppp*-Mutante eine ähnlich drastische Reduzierung der Glutamat-Bildung zu beobachten sein wie mit einer Δ*odhI*-Mutante, da der überwiegende Teil des OdhI-Proteins in der Zelle phosphoryliert vorliegt und somit den ODH-Komplex nicht inhibiert. Diese Hypothese wurde jedoch auf Grund der sehr geringen Wachstumsrate des Δ*ppp*-Stammes selbst in sehr nährstoffhaltigem BHI-Komplexmedium nicht überprüft.

3 Welchen Rolle spielen OdhI und die Ser-/Thr-Proteinkinasen bei der Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum*?

Die Sekretion der Aminosäure L-Glutamat kann durch Biotin-Mangel (Shiio *et al*., 1962a, b) und durch Zugabe von Tween-40 (Duperray *et al*., 1992), Penicillin G (Nunheimer *et al*., 1970) oder Ethambutol (Radmacher *et al*., 2005) induziert werden. Es gibt bis zum jetzigen Zeitpunkt aber kein einheitliches Modell, warum diese Aminosäure von *C. glutamicum* unter diesen verschiedenen Kultivierungsbedingungen ausgeschieden wird (Eggeling *et al*., 2001; Kimura, 2002). Die herausragende Bedeutung der ODH während der Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum* wird durch Stoffffluss-Analysen (Shimizu *et al*., 2003; Shirai *et al*., 2005) sowie durch ODH-Aktivitätsbestimmungen (Shiio *et al*., 1961; Shingu and Terui, 1971; Kawahara *et al*., 1997) unterstützt, die zeigten, dass die ODH-Aktivität unter diesen Bedingungen um 40 – 60 % reduziert vorliegt und dass die Glutamat-Produktion mit sinkender ODH-Aktivität steigt. Es konnte folglich vermutet werden, dass die posttranslationale Regulation der ODH bei der Glutamat-Produktion eine wichtige Rolle spielen bzw. eine Erklärung für die beschriebene ODH-Aktivitätsreduktion liefern könnte.

Im Einklang mit dem aktuellen ODH-Regulationsmodell konnte mit einer Δ*pknG*-Deletionsmutante eine Steigerung der Glutamat-Produktion bei Ethambutol-Behandlung und unter Biotin-Mangelbedingungen festgestellt werden, nicht jedoch bei Tween-40-Behandlung (vgl. Abb. 5.5 und Tab. 5.1). Folglich führt eine Deletion des *pknG*-Gens nicht unter allen Kultivierungsbedingungen zu einer erhöhten Glutamat-Ausscheidung.

Ähnlich einer Δ*pknG*-Mutante zeigte eine Δ*pknA*-Mutante eine um 105 % gesteigerte Glutamat-Produktion nach Ethambutol-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 5.16). Die nicht weiter steigerbare Glutamat-Bildung mit einer Δ*pknA*Δ*pknG*-Doppel- sowie einer Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* und Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG*-Dreifachdeletionsmutante nach Ethambutol-Behandlung lässt die Schlussfolgerung zu, dass mit diesen Stämmen im Vergleich zu den beiden Einfachdeletionsmutanten Δ*pknA* und Δ*pknG* kein additiver Effekt bzgl. der Glutamat-Produktion erzielt werden kann (vgl. Abb. 5.16). Eine Thr-14-Phosphorylierung durch PknA ist aus dem Grunde nicht auszuschließen, da mit einer Δ*pknA*-Mutante ähnlich einer Δ*pknG*-Mutante eine gesteigerte Glutamat-Produktion zu verzeichnen ist. Es kann folglich spekuliert werden, ob unterschiedliche Kultivierungsbedingungen wie die Behandlung oder die Nicht-Behandlung von *C. glutamicum* mit Ethambutol zur *in-vivo*-Phosphorylierung unterschiedlicher Aminosäurereste im OdhI-Protein führen. Bei Kultivierung auf Glutamin als einziger Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ist eine fehlende Phosphorylierung von Thr-14 in einer Δ*pknG*-Mutante anscheinend ausreichend, um den ODH-Komplex zu inhibieren, wohingegen eine Δ*pknA*-Deletionsmutante auf Glutamin-

Medium wächst. Ein genaues Verständnis des „Feintunings“ des OdhI-Phosphorylierungsstatus kann nur in noch folgenden Experimenten erfolgen.

Die unerwartete Feststellung, dass die Glutamat-Produktion mit einer Δ*pknB*- und Δ*pknL*-Einfachdeletionsmutante nahezu vollständig zum Erliegen kommt (vgl. Abb. 5.16), kann wohl nur mit den noch nicht identifizierten weiteren PknB- und PknL-Substraten in *C. glutamicum* begründet werden. Die Präsenz von PASTA-Domänen (*penicillin-binding protein and serine/threonine kinase associated domain*) in diesen beiden STPKs, die eine Rolle bei der Erkennung von extrazellulären Signalen spielen sollen, könnte eine weitere Erklärung liefern (Yeats *et al*., 2002). Diese beiden Deletionsmutanten zeigten nach 24 h nur 25 % bzw. 37 % der Glutamat-Produktion des Wildtyps, wohingegen nach 48 h gar kein Glutamat mehr im Kulturüberstand nachweisbar war. Die Wiederverwertung von zuvor sekretiertem Glutamat findet in *C. glutamicum* vermutlich durch das L-Glutamat-Aufnahmesystem GltS (Trötschel *et al*., 2003) statt. Ebenso könnte Glutamat durch das primär aktive L-Glutamat-Aufnahmesystem, das durch das *gluABCD*-Operon kodiert wird, wieder aufgenommen werden (Krämer *et al*., 1994; Kronemeyer *et al*., 1995). Die Expression von *gluABCD* steigt nach Ethambutol-Behandlung mit sinkender Glucose-Konzentration (Radmacher *et al*., 2005). Zukünftige Experimente mit den entsprechenden STPK-Deletionsmutanten müssten zur Klärung der Frage herangezogen werden, welche Rolle die einzelnen STPKs in *C. glutamicum* unter anderen Induktionsbedingungen zur Glutamat-Ausscheidung (Biotin-Limitation, Zugabe von Penicillin G bzw. Tween-40) spielen.

Mit einer Δ*odhI*-Deletionsmutante wurde ersichtlich, dass das ODH-Inhibitorprotein von außerordentlicher Bedeutung für eine effiziente Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum* ist. Mit dieser Mutante konnte unter den vier getesteten Kultivierungsbedingungen, die zur Glutamat-Ausscheidung führen, nur 1 – 13 % der Glutamat-Produktion des Wildtyps nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.6 und Tabelle 5.1). Die zusätzlich durchgeführten Komplementationsexperimente mit dem Stamm *C. glutamicum* Δ*odhI*/pJC1-*odhI* bestätigten, dass die Deletion von *odhI* für die drastische Reduktion der Glutamat-Produktion verantwortlich ist, da unter Biotin-limitierenden Bedingungen (2,5 µg l^{-1} Biotin) sowie nach Zugabe von Penicillin G und Tween-40 wieder eine Glutamat-Bildung auf Wildtyp-Niveau beobachtet werden konnte (74 % (Biotin-Limitation); 101 % (Penicillin G); 87 % (Tween-40); vgl. Abb. 5.7 und Tabelle 5.1). Einzig nach Ethambutol-Behandlung wurde nur 34 % der Glutamat-Produktion des Wildtyps erzielt. Dies könnte mit der leicht erhöhten Molekülzahl (10 – 30) des plasmid-kodierten OdhI-Proteins erklärt werden, so dass der ODH-Komplex in diesem Stamm stärker inhibiert werden könnte als im Wildtyp. Dieser Effekt einer erhöhten OdhI-Molekülzahl im Stamm *C. glutamicum* Δ*odhI*/pJC1-*odhI* hat aber offensichtlich keine Auswirkungen auf die Glutamat-Bildung bei Behandlung der Zellen mit Penicillin G und nur

geringfügigere Auswirkungen unter Biotin-limitierenden Bedingungen oder bei Behandlung der Zellen mit Tween-40.

Darüber hinaus konnte unter Biotin-limitierenden Kultivierungsbedingungen (2,5 µg l^{-1} Biotin) in den vergleichenden Western-Blot-Experimenten zur Analyse des OdhI-Phosphorylierungsstatus beobachtet werden, dass die Biotin-Konzentration einen Einfluss auf den OdhI-Phosphorylierungsstatus hat, da weniger phosphoryliertes OdhI detektierbar war als unter „normalen“ Bedingungen. Dieser Effekt konnte jedoch unter den anderen drei Bedingungen (Zugabe von Ethambutol, Tween-40- und Penicillin G) nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 5.8).

Die immer noch geringen Mengen Glutamat im Kulturüberstand einer Δ*odhI*- sowie einer Δ*pknG*Δ*odhI*-Doppelmutante (vgl. Abb. 5.6 und Tabelle 5.1) deuten jedoch an, dass trotz der wichtigen Funktion von OdhI bzw. der posttranslationalen ODH-Regulation kein einheitliches Modell bzgl. der Glutamat-Produktion in *C. glutamicum* auf molekularer Ebene erfolgen kann. Es spielen folglich wohl auch weitere Faktoren eine Rolle, wie z.B. der Export von Glutamat durch Cg1434 (Nakamura *et al*., 2007), die transkriptionale Repression von *odhA* und *sucB* bei Biotin-Mangel und nach Zugabe von Penicillin G (Kataoka *et al*., 2006), oder die Membranfluidität, welche ihrerseits wiederum die Exporteraktivität beeinflusst (Hoischen and Krämer, 1989, 1990; Gutmann *et al*., 1992; Eggeling *et al*., 2001; Nampoothiri *et al*., 2002; Bokas *et al*., 2007).

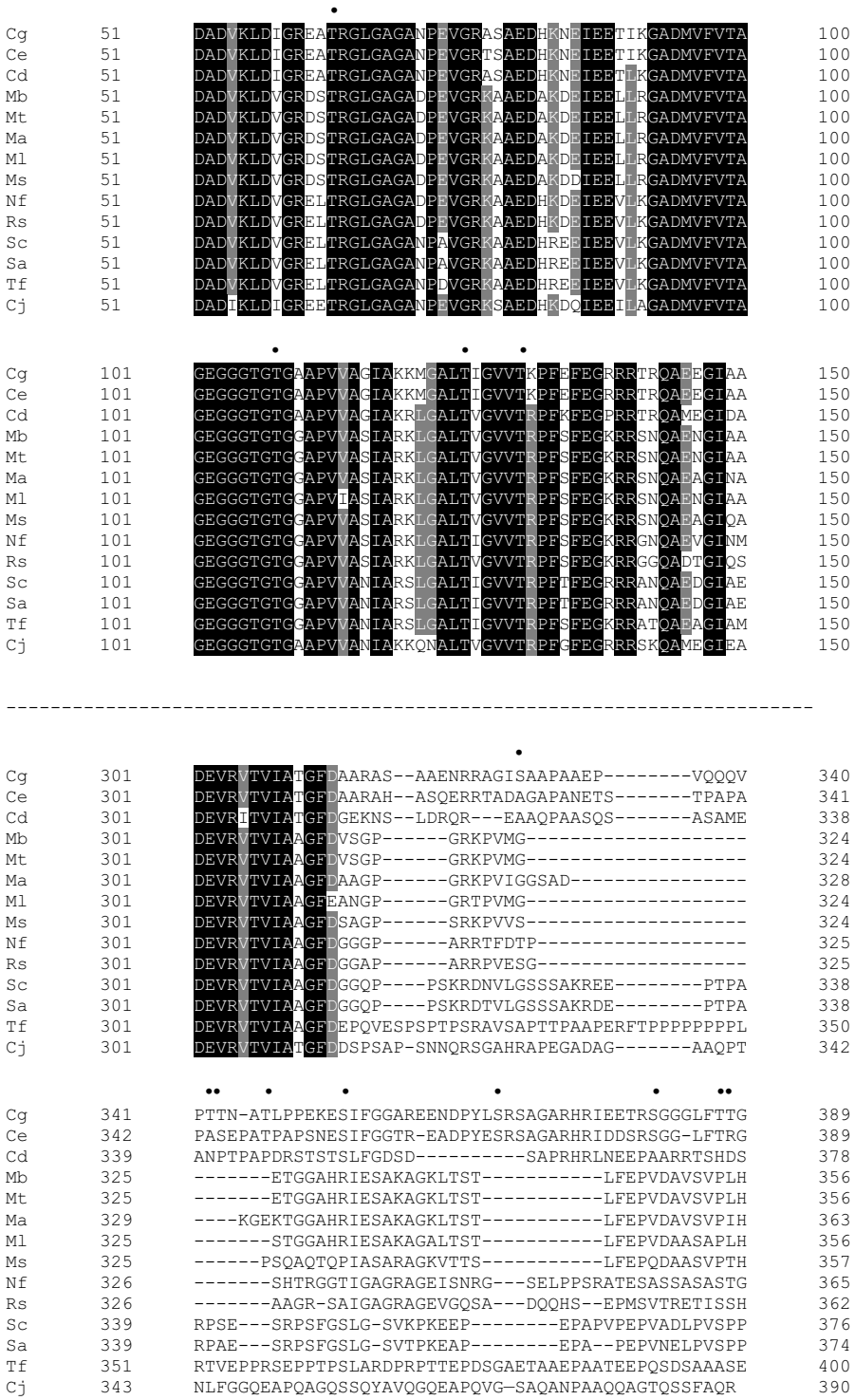
4 Identifizierung neuer Substrate für Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in *C. glutamicum*

Neben dem kürzlich identifizierten PknA-Substrat MurC, welches in die Peptidoglykan-Biosynthese involviert ist (Fiuza *et al*., 2008b), ist OdhI das bisher einzige identifizierte Substrat von STPKs in *C. glutamicum*. Somit stellte sich in dieser Arbeit zusätzlich die Frage nach weiteren Substraten. In *M. tuberculosis* wurden bereits eine Handvoll Substrate für PknA, PknB, PknG und PknL identifiziert (siehe Kapitel III.3). Es konnten bereits mehrmals Vorhersagen über mögliche STPK-Substrate getroffen werden, deren Gene auf dem Chromosom in enger Nachbarschaft zu einem STPK-kodierenden Gen liegen. Auf diese Weise wurde z.B. der putative Transkriptionsregulator Rv2175c (Cg2386 in *C. glutamicum*) als Substrat für PknL (Rv2176) in *M. tuberculosis* identifiziert (Canova *et al*., 2008a). Somit sind die zu *pknA*, *pknB*, *pknG* oder *pknL* benachbarten Genprodukte wie z.B. *cg0063* und *cg0064* als FHA-Domänen kodierende Proteine, PbpA und RodA (vgl. Abb. 3.3) sowie die Genprodukte des *dcw*-Clusters, aber auch evtl. die hypothetischen Membranproteine Cg0055, Cg2389 und Cg2390 potentielle Kandidaten für weitere STPK-Substrate in *C. glutamicum*. In *M. tuberculosis* konnte bereits die Phosphorylierung von Rv0020c (Grundner *et al*., 2005), dem zu Cg0064 homologen Protein, und Rv0016c (Dasgupta *et al*., 2006), dem zu PbpA homologen Protein, durch PknB (Rv0014c) gezeigt werden. Bendt *et al*. (2003) konnten bereits 31 potentielle STPK-Substrate in *C. glutamicum* identifizieren, die sowohl mittels 2-D-Gelelektrophoresestudien unter Verwendung einer *in-vivo*-Radioaktiv-Markierung mit [^{33}P]-Phosphorsäure als auch unter Verwendung von monoklonalen Phosphoserin- und Phosphothreonin-Antikörpern nachweisbar waren. Es wurden u.a. Citrat-Synthase, Fumarase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase sowie Glutamin-Synthetase als phosphorylierte Proteine identifiziert. Es konnte jedoch bisher noch nicht nachgewiesen werden, ob und welche der vier STPKs für die Phosphorylierung verantwortlich sind, welche Aminosäuren phosphoryliert werden und welchen Einfluss die Phosphorylierung auf die Enzymaktivität hat.

Der in dieser Arbeit verwendete Deletionsstamm Δ*ppp* ist zur Identifikation von STPK-Substraten hervorragend geeignet, da Ppp aller Wahrscheinlichkeit nach die einzige annotierte Phospho-Ser-/Thr-Proteinphosphatase (STPP) in *C. glutamicum* darstellt (Ikeda and Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al*., 2003). Im Proteom einer Δ*ppp*-Deletionsmutante liegen alle STPK-Substrate theoretisch im phosphorylierten Zustand vor, vorausgesetzt, dass unter den gewählten Kultivierungsbedingungen eine Phosphorylierung stattfindet. Im Zuge der 2-D-Gelelektrophoresestudien mit der Δ*ppp*-Mutante und durch *in-vitro*-Phosphorylierungsstudien mit gereinigten Proteinen wurde das in die Zellteilungsmaschinerie involvierte Protein FtsZ (Cg2366) als *in-vivo*-Substrat für Ppp und als *in-vitro*-Substrat für

PknA, PknB und PknL identifiziert (vgl. Abb. 5.25 und Abb. 5.26). In einem der vier FtsZ-Proteinspots im 2-D-Gel konnte durch massenspektrometrische Analysen das Phosphopeptidfragment von Aminosäure 381 – 395 identifiziert werden, welches später auch in den *in-vitro*-Phosphorylierungsansätzen mit PknL-KD_{His} identifiziert wurde. Das in *C. glutamicum* essentielle Gen *ftsZ* (Kobayashi *et al*., 1997; Honrubia *et al*., 1998, 2001) ist im sogenannten *dcw*-cluster (*division cell wall*) lokalisiert, welches divergent und in Nachbarschaft zu *pknL* angeordnet ist und vorwiegend für Zellteilungsproteine (*cg2360* – *cg2378*) kodiert (Letek *et al*., 2008). Die Phosphorylierung von FtsZ in *M. tuberculosis* durch PknA ist ebenfalls bereits beschrieben und beeinflusst dort die GTPase-Aktivität von FtsZ, wodurch die Polymerisationsaktivität reduziert wird (Thakur and Chakraborti, 2006). Es wurden allerdings keine PknA-abhängigen FtsZ-Phosphorylierungsstellen bestimmt. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Phosphorylierungsassays ergaben, dass FtsZ außer durch PknL auch durch PknA und PknB von *C. glutamicum in vitro* phosphoryliert werden kann. Eine PknG-KD_{His}-abhängige FtsZ-Phosphorylierung konnte nicht beobachtet werden. MALDI-TOF- und ESI-TOF-MS/MS-Analysen ergaben für die PknA-KD_{His}-abhängige FtsZ-Phosphorylierung drei und für die PknL-KD_{His}-abhängige FtsZ-Phosphorylierung vier identifizierbare tryptische Phosphopeptidfragmente. In diesen Phosphopeptidfragmenten konnten bisher der Rest Thr-63 eindeutig als PknL-abhängige FtsZ-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Weitere mögliche Phosphorylierungsstellen sind Thr-108, Thr-125, Thr-130, Ser-328, Thr-342, Thr-343, Thr-346, Ser-353, Ser-381, Thr-387 und Thr-388 (vgl. Abb. 6.2).

Abbildung 6.2: Sequenz-Alignment von Teilen des FtsZ-Proteins verschiedener Actinomyceten mittles ClustalW V1.83 (Thompson *et al*., 1994). Cg = *Corynebacterium glutamicum*; Ce = *Corynebacterium efficiens*; Cd = *Corynebacterium diphtheriae*; Mb = *Mycobacterium bovis subsp. bovis*; Mt = *Mycobacterium tuberculosis*; Ma = *Mycobacterium avium paratuberculosis*; Ml = *Mycobacterium leprae*; Ms = *Mycobacterium smegmatis*; Nf = *Nocardia farcinica*; Rs = *Rhodococcus sp.*; Sc = *Streptomyces coelicolor*; Sa = *Streptomyces avermitilis*; Tf = *Thermobifida fusca*; Cj = *Corynebacterium jeikeium*. Die Zahlen geben die Positionen der amino- und carboxyterminalen Aminosäuren an. Schwarz hinterlegt sind Aminosäuren, die in allen Sequenzen vorkommen. Grau hinterlegt sind Aminosäuren, die in wenigstens elf Sequenzen vorkommen.
• = in *C. glutamicum* identifizierte bzw. mögliche Phosphorylierungsstellen.
(nächste Seite)


Cg 51 DADVKLDIGREATRGLGAGANPEVGRASAEDHKNEIEETIKGADMVFVTA 100
Ce 51 DADVKLDIGREATRGLGAGANPEVGRTSAEDHKNEIEETIKGADMVFVTA 100
Cd 51 DADVKLDIGREATRGLGAGANPEVGRASAEDHKNEIEETIKGADMVFVTA 100
Mb 51 DADVKLDVGRDSTRGLGAGADPEVGRKAAEDAKDEIEELIRGADMVFVTA 100
Mt 51 DADVKLDVGRDSTRGLGAGADPEVGRKAAEDAKDEIEELIRGADMVFVTA 100
Ma 51 DADVKLDVGRDSTRGLGAGADPEVGRKAAEDAKDEIEELIRGADMVFVTA 100
Ml 51 DADVKLDVGRDSTRGLGAGADPEVGRKAAEDAKDEIEELIRGADMVFVTA 100
Ms 51 DADVKLDVGRDSTRGLGAGADPEVGRKAAEDAKDDIEELIRGADMVFVTA 100
Nf 51 DADVKLDVGRELTRGLGAGADPEVGRKAAEDHKDEIEEVLKGADMVFVTA 100
Rs 51 DADVKLDVGRELTRGLGAGADPEVGRKAAEDHKDEIEEVLKGADMVFVTA 100
Sc 51 DADVKLDVGRELTRGLGAGANPAVGRKAAEDHREEIEEVLKGADMVFVTA 100
Sa 51 DADVKLDVGRELTRGLGAGANPAVGRKAAEDHREEIEEVLKGADMVFVTA 100
Tf 51 DADVKLDVGRELTRGLGAGANPDVGRKAAEDHREEIEEVLKGADMVFVTA 100
Cj 51 DADIKLDIGREETRGLGAGANPEVGRKSAEDHKDQIEEILAGADMVFVTA 100
Cg 101 GEGGGTGTGAAPVVAGIAKKMGALTIGVVTKPFEFEGRRRTRQAEEGIAA 150
Ce 101 GEGGGTGTGAAPVVAGIAKKMGALTIGVVTKPFEFEGRRRTRQAEEGIAA 150
Cd 101 GEGGGTGTGAAPVVAGIAKRLGALTVGVVTRPFKFEGPRRTRQAMEGIDA 150
Mb 101 GEGGGTGTGGAPVVASIARKLGALTVGVVTRPFSFEGKRRSNQAENGIAA 150
Mt 101 GEGGGTGTGGAPVVASIARKLGALTVGVVTRPFSFEGKRRSNQAENGIAA 150
Ma 101 GEGGGTGTGGAPVVASIARKLGALTVGVVTRPFSFEGKRRSNQAEAGINA 150
Ml 101 GEGGGTGTGGAPVIASIARKLGALTVGVVTRPFSFEGKRRSNQAENGIAA 150
Ms 101 GEGGGTGTGGAPVVASIARKLGALTVGVVTRPFSFEGKRRSNQAEAGIQA 150
Nf 101 GEGGGTGTGGAPVVASIARKLGALTIGVVTRPFSFEGKRRGNQAEVGINM 150
Rs 101 GEGGGTGTGGAPVVASIARKLGALTVGVVTRPFSFEGKRRGGQADTGIQS 150
Sc 101 GEGGGTGTGGAPVVANIARSLGALTIGVVTRPFTFEGRRRANQAEDGIAE 150
Sa 101 GEGGGTGTGGAPVVANIARSLGALTIGVVTRPFTFEGRRRANQAEDGIAE 150
Tf 101 GEGGGTGTGGAPVVANIARSLGALTIGVVTRPFSFEGKRRATQAEAGIAM 150
Cj 101 GEGGGTGTGAAPVVANIAKKQNALTVGVVTRPFGFEGRRRSKQAMEGIEA 150
Cg 301 DEVRVTVIATGFDAARAS--AAENRRAGISAAPAAEP--------VQQQV 340
Ce 301 DEVRVTVIATGFDAARAH--ASQERRTADAGAPANETS-------TPAPA 341
Cd 301 DEVRITVIATGFDGEKNS--LDRQR---EAAQPAASQS-------ASAME 338
Mb 301 DEVRVTVIAAGFDVSGP------GRKPVMG---------- 324
Mt 301 DEVRVTVIAAGFDVSGP------GRKPVMG---------- 324
Ma 301 DEVRVTVIAAGFDAAGP------GRKPVIGGSAD------ 328
Ml 301 DEVRVTVIAAGFEANGP------GRTPVMG---------- 324
Ms 301 DEVRVTVIAAGFDSAGP------SRKPVVS---------- 324
Nf 301 DEVRVTVIAAGFDGGGP------ARRTFDTP---------- 325
Rs 301 DEVRVTVIAAGFDGGAP------ARRPVESG---------- 325
Sc 301 DEVRVTVIAAGFDGGQP----PSKRDNVLGSSSAKREE--------PTPA 338
Sa 301 DEVRVTVIAAGFDGGQP----PSKRDTVLGSSSAKRDE--------PTPA 338
Tf 301 DEVRVTVIAAGFDEPQVESPSPTPSRAVSAPTTPAAPERFTPPPPPPPL 350
Cj 301 DEVRVTVIATGFDDSPSAP-SNNQRSGAHRAPEGADAG-------AAQPT 342
Cg 341 PTTN-ATLPPEKESIFGGAREENDPYLSRSAGARHRIEETRSGGGLFTTG 389
Ce 342 PASEPATPAPSNESIFGGTR-EADPYESRSAGARHRIDDSRSGG-LFTRG 389
Cd 339 ANPTPAPDRSTSTSLFGDSD----------SAPRHRLNEEPAARRTSHDS 378
Mb 325 -------ETGGAHRIESAKAGKLTST-----------LFEPVDAVSVPLH 356
Mt 325 -------ETGGAHRIESAKAGKLTST-----------LFEPVDAVSVPLH 356
Ma 329 ----KGEKTGGAHRIESAKAGKLTST-----------LFEPVDAVSVPIH 363
Ml 325 -------STGGAHRIESAKAGALTST-----------LFEPVDAASAPLH 356
Ms 325 ------PSQAQTQPIASARAGKVTTS-----------LFEPQDAASVPTH 357
Nf 326 -------SHTRGGTIGAGRAGEISNRG---SELPPSRATESASSASASTG 365
Rs 326 -------AAGR-SAIGAGRAGEVGQSA---DQQHS--EPMSVTRETISSH 362
Sc 339 RPSE---SRPSFGSLG-SVKPKEEP--------EPAPVPEPVADLPVSPP 376
Sa 339 RPAE---SRPSFGSLG-SVTPKEAP--------EPA--PEPVNELPVSPP 374
Tf 351 RTVEPPRSEPPTPSLARDPRPTTEPDSGAETAAEPAATEEPQSDSAAASE 400
Cj 343 NLFGGQEAPQAGQSSQYAVQGQEAPQVG—SAQANPAAQQAGTQSSFAQR 390

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere bisher nicht identifizierte FtsZ-Phosphorylierungsstellen existieren, da die in den MALDI-TOF-MS- (35 – 45 %) bzw. ESI-TOF-MS-Analysen (26 – 60 %) detektierten tryptischen Peptidfragmente nicht alle 23 Serin- bzw. 25 Threoninreste im FtsZ-Protein beinhalteten. Es fällt auf, dass die FtsZ-Phosphorylierungsstelle an Position 63 und die möglichen FtsZ-Phosphorylierungsstellen an Position 108, 125 und 130 in einem in Actinomyceten hoch-konservierten FtsZ-Bereich, der sich von Aminosäure 1 – 313 erstreckt, befinden (vgl. Abb. 6.2). Folglich könnten die in *C. glutamicum* identifizierten FtsZ-Phosphorylierungsstellen auch der Aufdeckung von FtsZ-Phosphorylierungsstellen in anderen Actinomyceten dienen.

In Abb. 6.3 wird an Hand der Kristallstruktur von mykobakteriellem FtsZ (dimere Form; Leung *et al.*, 2000) und mit Hilfe der Software Cn3D V4.1 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ersichtlich, dass v.a. Thr-63 in der Peripherie von FtsZ lokalisiert ist, so dass eine gute Zugänglichkeit für Protein-Protein-Interaktion und Proteinphosphorylierung gegeben ist. Eine Regulation von FtsZ auf posttranslationaler Ebene durch STPKs bzw. STPP ist naheliegend, da in *C. glutamicum* wie auch anderen Actinomyceten weder positive Regulatoren wie ZipA oder ZapA noch negative Regulatoren wie EzrA, Noc, SlmA, SulA oder MinCD zur FtsZ-Polymerisationsregulation vorhanden sind wie sie z.B. in *E. coli* oder *Bacillus subtilis* zu finden sind (Letek *et al.*, 2007, 2008).



Abbildung 6.3: Ausschnitt der Kristallstruktur von dimerem FtsZ aus *M. tuberculosis* im Komplex mit Guanosin-5´-(3-O-thio)triphosphat (Cn3D V4.1). Die in *C. glutamicum* identifizierten möglichen FtsZ-Phosphorylierungsstellen an Position Thr-63, Thr-108, Thr-125 und Thr-130 sind gelb dargestellt.

Die Isocitrat-Dehydrogenase (Icd; Cg0766; Eikmanns *et al*., 1995) konnte als weiteres *in-vitro*-Substrat von PknA-KD_{His}, PknB-KD_{His} und PknG-KD_{His} in *C. glutamicum* identifiziert werden. Eine phosphorylierte Form dieses Tricarbonsäurezyklusenzyms wurde bereits von Bendt *et al.* (2003) in *C. glutamicum* nachgewiesen, so dass eine Phosphorylierung durch eine STPK nahe lag. Andererseits wurde eine Phosphorylierung der Icd bisher nicht vermutet, da eine zur *E. coli*-Icd veränderte strukturelle Organisation im Bereich des Serinrestes-113 besteht (Imabayashi *et al*., 2006). Der Serinrest-113, der in *E. coli* durch AceK phosphoryliert wird (Garnak and Reeves, 1979a, b; LaPorte, 1993), kann auf Grund von zu geringer Sequenzhomologie nicht direkt auf die corynebakterielle Icd extrapoliert werden, auch wenn der äquivalente Serinrest-130 in vielen NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen konserviert ist (Imabayashi *et al*., 2006).

In den nachfolgenden MALDI-TOF-MS-Analysen, bei denen im Durchschnitt eine ca. 40 %-ige Icd-Sequenzabdeckung erzielt wurde (vgl. Tabelle A3), konnte aber bisher kein einziges Icd-Phosphopeptid nach Inkubation mit einer der vier STPKs identifiziert werden. Die detektierten Peptidfragmente beinhalteten den Serinrest-130, der anscheinend nicht phosphoryliert wird. Folglich liegt/liegen die Icd-Phosphorylierungsstelle(n) höchstwahrscheinlich in Peptidfragmenten, die in diesen MALDI-TOF-MS-Analysen nicht erfasst wurden.

Neben der Methodik der *in-vivo*-Radioaktiv-Markierung mit [^{33}P]-Phosphorsäure sowie der Verwendung von spezifischen Phosphoserin- und Phosphothreonin-Antikörpern in Verbindung mit der 2-D-Gelelektrophorese-Technik (Bendt *et al*., 2003; Sopko *et al*., 2008), könnte das oft beobachtete und auch in dieser Arbeit festgestellte Problem der zu geringen Menge an vorhandenen Phosphopeptidfragmenten in einer Probe mit Hilfe von verschiedenen Anreicherungstechniken gelöst werden (Han *et al*., 2008). Ausblickend betrachtet müssten noch weitere vergleichende 2-D-Gelelektrophoresestudien zwischen dem Wildtyp und der Δ*ppp*-Deletionsmutante in einem zu pH 4,0 – 5,0 unterschiedlichen pH-Bereich sowie unter anderen Kultivierungsbedingungen durchgeführt werden, um weitere STPK-Substrate identifizieren zu können. Darüber hinaus muß in folgenden Experimenten die *in-vivo*-Relevanz der FtsZ- sowie der Icd-Phosphorylierung untersucht werden, d.h., welchen Einfluss die Phosphorylierung auf die GTPase-Aktivität von FtsZ (vgl. Thakur and Chakraborti, 2006) bzw. die Icd-Aktivität hat (vgl. Garnak and Reeves, 1979a, b; LaPorte, 1993).

5 Zusammenfassende Darstellung der posttranslationalen Regulation durch Ser-/Thr-Proteinkinasen und Phosphatasen in *C. glutamicum*

Im Folgenden wurden die in *C. glutamicum* identifizierten tryptischen Phosphopeptidfragmente, die bisher in den Proteinen OdhI und FtsZ nach Inkubation mit PknA-KD_{His}, $PknG_{Strep}$ und PknL-KD_{His} *in vitro* identifiziert wurden, miteinander verglichen, um möglicherweise eine vorhandene Erkennungssequenz für STPKs oder auch STPP ableiten zu können. Bisher sind solche Konsensussequenzen nur in Eukaryonten beschrieben (Kennelly and Krebs, 1991; Han *et al.*, 2008), wohingegen solche Erkennungssequenzen in Prokaryonten wie den Actinomyceten noch vollkommen unbekannt sind. Wie aus Tabelle 6.1 ersichtlich wird, kann eine solche Konsensussequenz für corynebakterielle STPKs bzw. STPP bisher nicht abgeleitet werden, so dass weitere Substrate und ihre Phosphorylierungsstellen in *C. glutamicum* identifiziert werden müssen, um eine solche Sequenz evtl. ableiten zu können. Es fällt jedoch auf, dass in drei der identifizierten Phosphopeptide zwei Threoninreste benachbart liegen (OdhI-14/15; FtsZ-342/343; FtsZ-387/388). Als Vergleichskriterium wurden die Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren (unpolar, polar, unpolar-aliphatisch, unpolar-aromatisch bzw. polar-aromatisch) herangezogen.

Tabelle 6.1: Vergleich der identifizierten tryptischen Phosphopeptidfragmente in den STPK-Substraten OdhI und FtsZ zur möglichen Ableitung eines Phosphorylierungs-Sequenzmotivs. Die Aminosäuren werden folgendermaßen farblich unterschieden: unpolar (rot), polar (grün), unpolar-aliphatisch (schwarz), unpolar-aromatisch (blau), polar-aromatisch (violett). Umrandet sind eindeutig identifizierte OdhI- bzw. FtsZ-Phosphorylierungsstellen, gelb hinterlegt mögliche FtsZ-Phosphorylierungsstellen.

Substrat	Start-Ende (aa)	STPK	
OdhI	2 - 19	PknA/PknG/PknL	S D N N G T P E P Q V E T T S V F R
OdhI	25 - 52	PknA/PknL	E M E S S T G T A P A S T G A E N L P A G S A L L V V K
FtsZ	61 - 76	PknL	E A T R G L G A G A N P E V G R
FtsZ	92 - 119	PknA	G A D M V F V T A G E G G G T G T G A A P V V A G I A K
FtsZ	121 - 138	PknA/PknL	M G A L T I G V V T K P F E F E G R
FtsZ	325 - 359	PknA	A G I S A A P A A E P V Q Q Q V P T T N A T L P P E K E S I F G G A R
FtsZ	325 - 368	PknL	A G I S A A P A A E P V Q Q Q V P T T N A T L P P E K E S I F G G A R E E N D P Y L S R
FtsZ	381 - 396	PknL	S G G G L F T T G N D R D Y R R

Zusammenfassend lässt sich das posttranslationale Regulationsnetzwerk durch STPKs in *C. glutamicum*, so wie sie sich bisher darstellt, folgendermaßen darstellen (vgl. Abb. 6.4): OdhI wird *in vivo* bei Wachstum in BHI-Glucose-Medium überwiegend von PknG und PknA phosphoryliert, geringfügig evtl. auch von PknB und PknL. *In vitro* ist eine OdhI-Phosphorylierung durch alle vier Kinasedomänen nachweisbar. OdhI und FtsZ werden *in vivo* von Ppp dephosphoryliert. *In vitro* konnte eine FtsZ-Phosphorylierung durch die Kinasedomänen von PknA, PknB und PknL und eine Icd-Phosphorylierung durch die Kinasedomänen von PknA, PknB und PknG aufgezeigt werden.

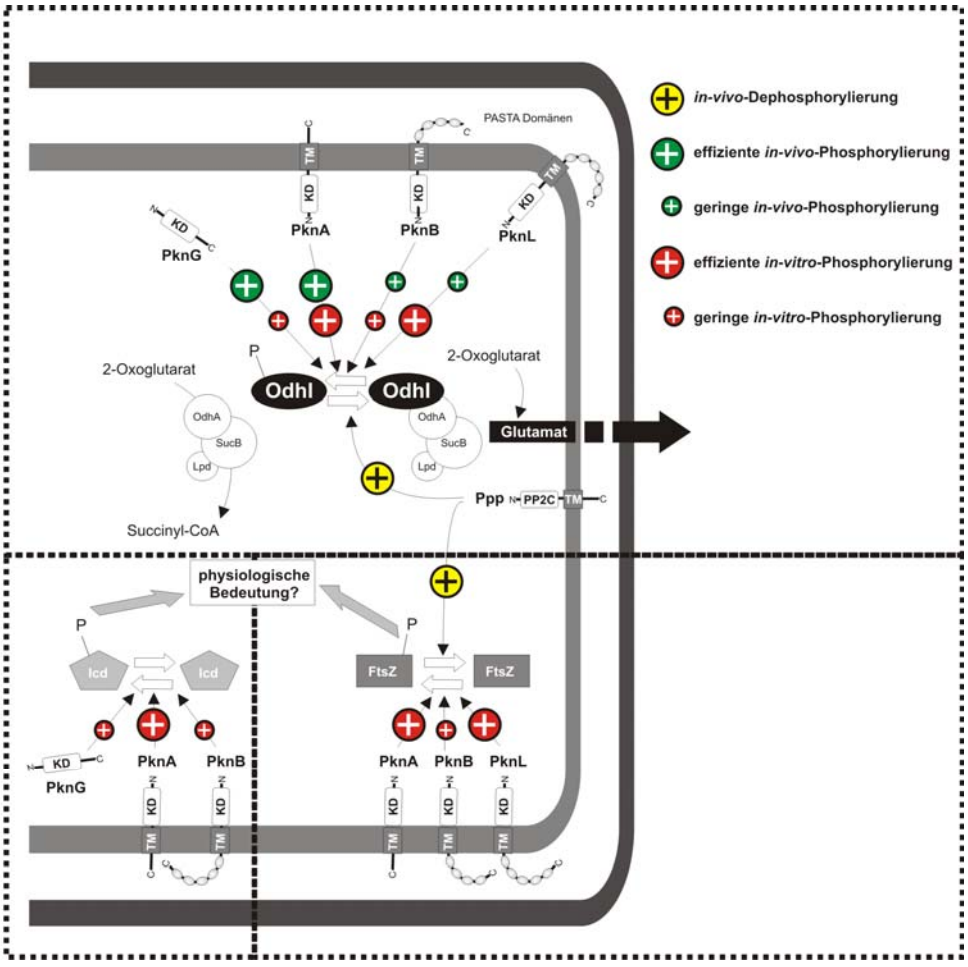


Abbildung 6.4: Zusammenfassung der posttranslationalen Regulation von OdhI, FtsZ und Icd durch PknA, PknB, PknG, PknL und Ppp in *C. glutamicum*. KD = Kinasedomäne; TM = Transmembranhelix; PP2C = Protein-Phosphatase-Domäne (Familie 2C).

VII Literaturverzeichnis

Abe, S., Takayama, K.I., and Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.

Asakura, Y., Kimura, E., Usuda, Y., Kawahara, Y., Matsui, K., Osumi, T., and Nakamatsu, T. (2007) Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1308-1319.

Av-Gay, Y., Jamil, S., and Drews, S.J. (1999) Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect. Immun.* **67**: 5676-5682.

Av-Gay, Y., and Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **8**: 238-244.

Beckers, G., Nolden, L., and Burkovski, A. (2001) Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology* **147**: 2961-2970.

Belanger, A.E., and Hatfull, G.F. (1999) Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **181**: 6670-6678.

Bendt, A.K., Burkovski, A., Schaffer, S., Bott, M., Farwick, M., and Hermann, T. (2003) Towards a phosphoproteome map of *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **3**: 1637-1646.

Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F., and Stork, H. (1974) Glucosetest. *In Methoden der enzymatischen Analyse II, Bergmeyer, H.U., ed., VCH Weinheim*: 1241-1246.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Boitel, B., Ortiz-Lombardía, M., Durán, R., Pompeo, F., Cole, S.T., Cerveñansky, C., and Alzari, P.M. (2003) PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1493-1508.

Bokas, D., Uy, D., Grattepanche, F., Duportail, G., Guedon, E., Delaunay, S., and Goergen, J.L. (2007) Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 773-781.

Bott, M. (2007) Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends Microbiol.* **15**: 417-425.

Börmann, E.R., Eikmanns, B.J., and Sahm, H. (1992) Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **6**: 317-326.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Burkovski, A. (2008) Corynebacteria: genomics and molecular biology. *Norfolk, U.K.: Caister Academic Press*.

Canova, M.J., Veyron-Churlet, R., Zanella-Cléon, I., Cohen-Gonsaud, M., Cozzone, A.J., Becchi, M., Kremer, L., and Molle, V. (2008a) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinase PknL phosphorylates Rv2175c: mass spectrometric profiling of the activation loop phosphorylation sites and their role in the recruitment of Rv2175c. *Proteomics* **8**: 521-533.

Canova, M.J., Kremer, L., and Molle, V. (2008b) pETPhos: a customized expression vector designed for further characterization of Ser/Thr/Tyr protein kinases and their substrates. *Plasmid* **60**: 149-153.

Chaba, R., Raje, M., and Chakraborti, P.K. (2002) Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1078-1085.

Chopra, P., Singh, B., Singh, R., Vohra, R., Koul, A., Meena, L.S., Koduri, H., Ghildiyal, M., Deol, P., Das, T.K., Tyagi, A.K., and Singh, Y. (2003) Phosphoprotein phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis* dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**: 112-120.

Clauser, K.R., Baker, P., and Burlingame, A.L. (1999) Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* **71**: 2871-2882.

Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K.J., Gordhan, B.G., Betts, J.C., Mizrahi, V., Smith, D.A., Stokes, R.W., and Av-Gay, Y. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **52**: 1691-1702.

Curry, J.M., Whalan, R., Hunt, D.M., Gohil, K., Strom, M., Rickman, L., Colston, M.J., Smerdon, S.J., and Buxton, R.S. (2005) An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect. Immun.* **73**: 4471-4477.

Dasgupta, A., Datta, P., Kundu, M., and Basu, J. (2006) The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division. *Microbiology* **152**: 493-504.

Delaunay, S., Gourdon, P., Lapujade, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J.M., Lindley, N.D., and Goergen, J.L. (1999) An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 762-768.

Duperray, F., Jezequel, D., Ghazi, A., Letellier, L., and Shechter, E. (1992) Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **1103**: 250-258.

Durán, R., Villarino, A., Bellinzoni, M., Wehenkel, A., Fernandez, P., Boitel, B., Cole, S.T., Alzari, P.M., and Cerveñansky, C. (2005) Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**: 858-867.

Eggeling, L., and Sahm, H. (1999) L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.

Eggeling, L., Krumbach, K., and Sahm, H. (2001) L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or Tween addition doing the same? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 67-68.

Eggeling, L., and Bott, M. (2005) Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. *CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA*.

Eikmanns, B.J., Rittmann, D., and Sahm, H. (1995) Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **177**: 774-782.

Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M., and Schaffer, S. (2004) *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ^H. *Mol. Microbiol.* **52**: 285-302.

Engels, S., Ludwig, C., Schweitzer, J.E., Mack, C., Bott, M., and Schaffer, S. (2005) The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **57**: 576-591.

Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S.T., and Alzari, P.M. (2006) The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J. Bacteriol.* **188**: 7778-7784.

Fiuza, M., Canova, M.J., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Cozzone, A.J., Mateos, L.M., Kremer, L., Gil, J.A., and Molle, V. (2008a) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J. Biol. Chem.* **283**: 18099-18112.

Fiuza, M., Canova, M.J., Patin, D., Letek, M., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Mateos, L.M., Mengin-Lecreulx, D., Molle, V., and Gil, J.A. (2008b) The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem*. *in press*.

Fountoulakis, M., and Langen, H. (1997) Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal. Biochem.* **250**: 153-156.

Garnak, M., and Reeves, H.C. (1979a) Purification and properties of phosphorylated isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**: 7915-7920.

Garnak, M., and Reeves, H.C. (1979b) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203**: 1111-1112.

Gay, L.M., Ng, H.L., and Alber, T. (2006) A conserved dimer and global conformational changes in the structure of apo-PknE Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* **360**: 409-420.

Greenstein, A.E., Echols, N., Lombana, T.N., King, D.S., and Alber, T. (2007a) Allosteric activation by dimerization of the PknD receptor Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **282**: 11427-11435.

Greenstein, A.E., MacGurn, J.A., Baer, C.E., Falick, A.M., Cox, J.S., and Alber, T. (2007b) *M. tuberculosis* Ser/Thr protein kinase D phosphorylates an anti-anti-sigma factor homolog. *PLoS Pathog.* **3**: e49.

Grundner, C., Gay, L.M., and Alber, T. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains. *Protein Sci.* **14**: 1918-1921.

Gutmann, M., Hoischen, C., and Krämer, R. (1992) Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**: 115-123.

Han, G., Ye, M., and Zou, H. (2008) Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis. *Analyst* **133**: 1128-1138.

Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA Cloning* **1**: 109-135.

Hermann, T. (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172.

Hoischen, C., and Krämer, R. (1989) Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 342-347.

Hoischen, C., and Krämer, R. (1990) Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 3409-3416.

Honrubia, M.P., Fernández, F.J., and Gil, J.A. (1998) Identification, characterization, and chromosomal organization of the *ftsZ* gene from *Brevibacterium lactofermentum*. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 97-104.

Honrubia, M.P., Ramos, A., and Gil, J.A. (2001) The cell division genes *ftsQ* and *ftsZ*, but not the three downstream open reading frames YFIH, ORF5 and ORF6, are essential for growth and viability in *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 1022-1030.

Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell* **100**: 113-127.

Ikeda, M., and Nakagawa, S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 99-109.

Imabayashi, F., Aich, S., Prasad, L., and Delbaere, L.T. (2006) Substrate-free structure of a monomeric NADP isocitrate dehydrogenase: an open conformation phylogenetic relationship of isocitrate dehydrogenase. *Proteins* **63**: 100-112.

Jakoby, M., Tesch, M., Sahm, H., Krämer, R., and Burkovski, A. (1997) Isolation of the *Corynebacterium glutamicum glnA* gene encoding glutamine synthetase I. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 81-88.

Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G., and Wohlleben, W. (1992) Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **174**: 5462-5465.

Jones, B.N., and Gilligan, J.P. (1983) *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* **266**: 471-482.

Kabus, A., Niebisch, A., and Bott, M. (2007) Role of cytochrome *bd* oxidase from *Corynebacterium glutamicum* in growth and lysine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 861-868.

Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., and Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**: 5-25.

Kang, C.M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., and Husson, R.N. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* **19**: 1692-1704.

Kanzaki, T., Isobe, K., Okazaki, H., Motizuki, K., and Fukuda, H. (1967) L-Glutamic acid fermentation. Part I. Selection of an oleic acid-requiring mutant and its properties. *Agric. Biol. Chem.* **31**: 1307-1313.

Kataoka, M., Hashimoto, K.I., Yoshida, M., Nakamatsu, T., Horinouchi, S., and Kawasaki, H. (2006) Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**: 471-476.

Kawahara, Y., Takahashi-Fuke, K., Shimizu, E., Nakamatsu, T., and Nakamori, S. (1997) Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1109-1112.

Keilhauer, C., Eggeling, L., and Sahm, H. (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.

Kelle, R., Hermann, T., and Bathe, B. (2005) L-Lysine Production. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum. Eggeling, L. and Bott, M., eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA*. pp.467-490.

Kennelly, P.J., and Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558.

Kennelly, P.J. (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**: 1-8.

Kim, J., Hirasawa, T., Sato, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., and Shimizu, H. (2008) Effect of *odhA* overexpression and *odhA* antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. *in press*.

Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y., Nakamatsu, T., and Tokuda, H. (1997) A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**: 157-161.

Kimura, E. (2002) Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by DtsR1 in coryneform bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 545-551.

Kimura, E. (2003) Metabolic engineering of glutamate production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **79**: 37-57.

Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.

Kinoshita, S. (2005). A Short History of the Birth of the Amino Acid Industry in Japan. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum. Eggeling, L. and Bott, M., eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA*. pp. 616.

Kobayashi, M., Asai, Y., Hatakeyama, K., Kijima, N., Wachi, M., Nagai, K., and Yukawa, H. (1997) Cloning, sequencing, and characterization of the *ftsZ* gene from coryneform bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 383-388.

Koul, A., Choidas, A., Tyagi, A.K., Drlica, K., Singh, Y., and Ullrich, A. (2001) Serine/threonine protein kinases PknF and PknG *of Mycobacterium tuberculosis*: characterization and localization. *Microbiology* **147**: 2307-2314.

Krämer, R., Boles, E., Eggeling, L., Erdmann, A., Gutmann, M., Kronemeyer, W., Palimeri, L. and Zittrich, S. (1994) Mechanism and energetics of amino-acid transport in coryneform bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1187**: 245-249.

Kronemeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H., and Eggeling, L. (1995) Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 1152-1158.

Krupa, A., and Srinivasan, N. (2005) Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC Genomics* **6**: 129.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lakshminarayan, H., Narayanan, S., Bach, H., Sundaram, K.G., and Av-Gay, Y. (2008) Molecular cloning and biochemical characterization of a serine threonine protein kinase, PknL, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* **58**: 309-317.

LaPorte, D.C. (1993) The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: regulation and enzymology. *J. Cell Biochem.* **51**: 14-18.

Letek, M., Ordóñez, E., Fiuza, M., Honrubia-Marcos, P., Vaquera, J., Gil, J.A., and Mateos, L.M. (2007) Characterization of the promoter region of *ftsZ* from *Corynebacterium glutamicum* and controlled overexpression of FtsZ. *Int. Microbiol.* **10**: 271-282.

Letek, M., Fiuza, M., Ordóñez, E., Villadangos, A.F., Ramos, A., Mateos, L.M., and Gil, J.A. (2008) Cell growth and cell division in the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**: 99-109.

Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., and Drauz, K. (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 1-8.

Leung, A.K., White, E.L., Ross, L.J., and Borhani, D.W. (2000) Crystallization of the *Mycobacterium tuberculosis* cell-division protein FtsZ. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **56**: 1634-1637.

Lindroth, P., and Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1667-1674.

Link, A.J., Phillips, D., and Church, G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**: 6228-6237.

Matsushita, K., Yamamoto, T., Toyama, H., and Adachi, O. (1998) NADPH oxidase system as a superoxide-generating cyanide-resistant pathway in the respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1968-1977.

Molle, V., Girard-Blanc, C., Kremer, L., Doublet, P., Cozzone, A.J., and Prost, J.F. (2003a) Protein PknE, a novel transmembrane eukaryotic-like serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 820-825.

Molle, V., Kremer, L., Girard-Blanc, C., Besra, G.S., Cozzone, A.J., and Prost, J.F. (2003b) An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **42**: 15300-15309.

Molle, V., Soulat, D., Jault, J.M., Grangeasse, C., Cozzone, A.J., and Prost, J.F. (2004) Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**: 215-223.

Molle, V., Zanella-Cléon, I., Robin, J.P., Mallejac, S., Cozzone, A.J., and Becchi, M. (2006a) Characterization of the phosphorylation sites of *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases, PknA, PknD, PknE, and PknH by mass spectrometry. *Proteomics* **6**: 3754-3766.

Molle, V., Brown, A.K., Besra, G.S., Cozzone, A.J., and Kremer, L. (2006b) The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 30094-30103.

Momose, H., and Takagi, T. (1978) Glutamic acid production in biotin-rich media by temperature-sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum*, a novel fermentation process. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1911-1917.

Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro via* a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H., and Wachi, M. (2007) Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4491-4498.

Nakao, Y., Kikuchi, M., Suzuki, M., and Doi, M. (1972) Microbial production of L-glutamic acid by glycerol auxotrophs. Part I. Induction of glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from *n*-paraffins. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 490-496.

Nampoothiri, K.M., Hoischen, C., Bathe, B., Möckel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H., and Eggeling, L. (2002) Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 89-96.

Narayan, A., Sachdeva, P., Sharma, K., Saini, A.K., Tyagi, A.K., and Singh, Y. (2007) Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function. *Physiol. Genomics* **29**: 66-75.

Neubeck, M., Prenner , E., Horvat, P., Bona, R., Hermetter, A., and Moser, A. (1993) Membrane fluidity in glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium sp*. ATCC 13869. *Arch. Microbiol.* **160**: 101-107.

Nguyen, L., Walburger, A., Houben, E., Koul, A., Muller, S., Morbitzer, M., Klebl, B., Ferrari, G., and Pieters, J. (2005) Role of protein kinase G in growth and glutamine metabolism of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **187**: 5852-5856.

Niebisch, A., and Bott, M. (2001) Molecular analysis of the cytochrome bc_1-aa_3 branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome c_1. *Arch. Microbiol.* **175**: 282-294.

Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B., and Bott, M. (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity *via* the phosphorylation status of the OdhI protein. *J. Biol. Chem.* **281**: 12300-12307.

Nishimura, T., Vertès, A.A., Shinoda, Y., Inui, M., and Yukawa, H. (2007) Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 889-897.

Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D., and Demain, A.L. (1970) Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* **20**: 215-217.

Okazaki, H., Kanzaki, T., Doi, M., Sumino, Y., and Fukuda, H. (1967) L-Glutamic acid fermentation. Part II. The production of L-glutamic acid by an oleic acid-requiring mutant. *Agric. Biol. Chem.* **31**: 1314-1317.

O'Hare, H.M., Durán, R., Cerveñansky, C., Bellinzoni, M., Wehenkel, A.M., Pritsch, O., Obal, G., Baumgartner, J., Vialaret, J., Johnsson, K., and Alzari, P.M. (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol. Microbiol. in press*.

Ortiz-Lombardía, M., Pompeo, F., Boitel, B., and Alzari, P.M. (2003) Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **278**: 13094-13100.

Pallen, M., Chaudhuri, R., and Khan, A. (2002) Bacterial FHA domains: neglected players in the phospho-threonine signalling game? *Trends Microbiol.* **10**: 556-563.

Pappin, D.J., Hojrup, P., and Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.* **3**: 327-332.

Park, S.T., Kang, C.M., and Husson, R.N. (2008) Regulation of the SigH stress response regulon by an essential protein kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**: 13105-13110.

Peirs, P., De Wit, L., Braibant, M., Huygen, K., and Content, J. (1997) A serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Biochem.* **244**: 604-612.

Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.

Radmacher, E., Stansen, K.C., Besra, G.S., Alderwick, L.J., Maughan, W.N., Hollweg, G., Sahm, H., Wendisch, V.F., and Eggeling, L. (2005) Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **151**: 1359-1368.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. *A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**: 104-108.

Sassetti, C.M., Boyd, D.H., and Rubin, E.J. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**: 77-84.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V.D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., and Bott, M. (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 4404-4422.

Scherr, N., Honnappa, S., Kunz, G., Mueller, P., Jayachandran, R., Winkler, F., Pieters, J., and Steinmetz, M.O. (2007) Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**: 12151-12156.

Schreiner, M.E., Fiur, D., Holátko, J., Pátek, M., and Eikmanns, B.J. (2005) E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects. *J. Bacteriol.* **187**: 6005-6018.

Schultz, C., Niebisch, A., Gebel, L., and Bott, M. (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 691-700.

Schulz, A.A., Collett, H.J., and Reid, S.J. (2001) Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**: 361-367.

Schwinde, J.W., Hertz, P.F., Sahm, H., Eikmanns, B.J., and Guyonvarch, A. (2001) Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* **147**: 2223-2231.

Sharma, K., Gupta, M., Krupa, A., Srinivasan, N., and Singh, Y. (2006) EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Febs J.* **273**: 2711-2721.

Shiio, I., Otsuka, S.I., and Takahashi, M. (1961) Significance of α-ketoglutaric dehydrogenase on the glutamic acid formation in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem. (Tokyo)* **50**: 164-165.

Shiio, I., Otsuka, S.I., and Takahashi, M. (1962a) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular premeability of amino acids. *J. Biochem.* **51**: 56-62.

Shiio, I., Otsuka, S.I., and Katsuya, N. (1962b) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. II. Metabolism of glucose. *J. Biochem.* **52**: 108-116.

Shiio, I., and Ozaki, H. (1970) Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J. Biochem.* **68**: 633-647.

Shiio, I., and Ujigawa-Takeda, K. (1980) Presence and regulation of α-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1897-1904.

Shimizu, H., Tanaka, H., Nakato, A., Nagahisa, K., Kimura, E., and Shioya, S. (2003) Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **25**: 291-298.

Shingu, H., and Terui, G. (1971) Studies on the process of glutamic acid fermentation at the enzyme level. I. On the changes of α-ketoglutaric acid dehydrogenase in the course of culture. *J. Ferment. Technol.* **49**: 400-405.

Shirai, T., Nakato, A., Izutani, N., Nagahisa, K., Shioya, S., Kimura, E., Kawarabayasi, Y., Yamagishi, A., Gojobori, T., and Shimizu, H. (2005) Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab. Eng.* **7**: 59-69.

Skerra, A., and Schmidt, T.G. (2000) Use of the *Strep*-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**: 271-304.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

Sopko, R., and Andrews, B.J. (2008) Linking the kinome and phosphorylome-a comprehensive review of approaches to find kinase targets. *Mol. Biosyst.* **4**: 920-933.

Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.

Strösser, J., Lüdke, A., Schaffer, S., Krämer, R., and Burkovski, A. (2004) Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **54**: 132-147.

Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**: 952-965.

Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K., and Ikeda, M. (2007) Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 1173-1182.

Takinami, K., Yoshii, H., Tsuri, H., and Odaka, H. (1965) Biochemical effect of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation: Part III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 351-359.

Tesch, M., Eikmanns, B.J., de Graaf, A.A., and Sahm, H. (1998) Ammonia assimilation in *Corynebacterium glutamicum* and a glutamate dehydrogenase-deficient mutant. *Biotechnol. Lett.* **20**: 953-957.

Thakur, M., and Chakraborti, P.K. (2006) GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *J. Biol. Chem.* **281**: 40107-40113.

Thakur, M., Chaba, R., Mondal, A.K., and Chakraborti, P.K. (2008) Inter-domain interaction reconstitutes the functionality of PknA, a eukaryotic-type Ser/Thr kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **283**: 8023-8033.

Thakur, M., and Chakraborti, P.K. (2008) Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase, to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis. *Biochem. J.* **415**: 27-33.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., and Nathan, C. (2005a) Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of α-ketoglutarate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**: 10670-10675.

Tian, J., Bryk, R., Shi, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Nathan, C. (2005b) *Mycobacterium tuberculosis* appears to lack α-ketoglutarate dehydrogenase and encodes pyruvate dehydrogenase in widely separated genes. *Mol. Microbiol.* **57**: 859-868.

Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., and Bukau, B. (2001) Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* **40**: 397-413.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**: 4350-4354.

Trötschel, C., Kandirali, S., Diaz-Achirica, P., Meinhardt, A., Morbach, S., Krämer, R., and Burkovski, A. (2003) GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 738-742.

Udaka, S. (1960) Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *J. Bacteriol.* **79**: 754-755.

Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., and Matsui, H. (1996) Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology* **142**: 3347-3354.

Uy, D., Delaunay, S., Germain, P., Engasser, J.M., and Goergen, J.L. (2003) Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J. Biotechnol.* **104**: 173-184.

Uy, D., Delaunay, S., Goergen, J.L., and Engasser, J.M. (2005) Dynamics of glutamate synthesis and excretion fluxes in batch and continuous cultures of temperature-triggered *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**: 153-162.

Valbuena, N., Letek, M., Ordóñez, E., Ayala, J., Daniel, R.A., Gil, J.A., and Mateos, L.M. (2007) Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol. Microbiol.* **66**: 643-657.

van der Rest, M.E., Lange, C., and Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545.

Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S.T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P.R., Cerveñansky, C., and Alzari, P.M. (2005) Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J. Mol. Biol.* **350**: 953-963.

Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304**: 1800-1804.

Wehenkel, A., Fernandez, P., Bellinzoni, M., Catherinot, V., Barilone, N., Labesse, G., Jackson, M., and Alzari, P.M. (2006) The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria. *FEBS Lett*. **580**: 3018-3022.

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Graña, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cerveñansky, C., Cole, S.T., and Alzari, P.M. (2008) Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**: 193-202.

Wendisch, V.F. (2003) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J. Biotechnol.* **104**: 273-285.

Wendisch, V.F. (2006) Genetic regulation of *Corynebacterium glutamicum* metabolism. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 999-1009.

Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a β-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 438-440.

Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M., and Alber, T. (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 168-174.

VIII Anhang

A1 Sequenz des Gens *odhI* aus *C. glutamicum*

Region des *C. glutamicum* Genoms mit dem *odhI*-Gen (*cg1630*) sowie der entsprechenden Proteinsequenz. Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation des *odhI*-Bereichs für die Konstruktion von pET28b-*odhI* verwendet wurden, sind unterstrichen. Primer, die zur Konstruktion von pK18*mob*-*odhI*-Strep verwendet wurden, sind grau dargestellt. Primer, die zur Überprüfung der chromosomalen Integration von pK18*mob*-*odhI*-Strep verwendet wurden, sind gepunktet dargestellt. Der Primer pK18mob-rev bindet im Vektor pK18*mob*.

```
   1  GTCCGTGAGG GAACAGGCAG CACGAGACAT CATGCTGTAC CACCTCGATT ACAACTGGTC
  61  AGAGCACCTC GCGTTGATGG ATGATGTCCG CGAATCCATT CACCTGCGCG CCATCGCCAG
 121  GGAAACCCCC CTTGATGAAT ACCACCGCAT CGCTGTGCGT GAATTCAAGG ATTTGGCACA
 181  ACGCGCTGTC GATGATGCGG TGTCCACGTT CAAGTCTGTG ACCATCGATC ACGAGGGTGC
 241  CCATTTGGAT GATGAGGGCT TGGCGCGTCC ATCAGCAACG TGGACCTACA TGGTCTCTGA
 301  CAACCCACTT GCGGGTAGTG GTAACTCAGT GATCAGTGGC ATAGGAAATA TCTTTAGATA
 361  ACCTGAGAAC TATGAAATTC CAGCTCACGG CGTTTTTTCA GGAAATTCTA GGATCTTACG
 421  GAGGGTAACT CCGCACTCAA CATCTAGACA AAGGCTATGA TGAAAATCGT TAAGAATAAT
                           ► odhI (OdhI-NdeI/OdhI-EcoRI)
 481  GTCGACACGG AGGAAGTTTA ATGAGCGACA ACAACGGCAC CCCGGAGCCA CAGGTCGAGA
                             M  S  D   N  N  G   T  P  E  P   Q  V  E

 541  CCACCTCAGT ATTCCGCGCT GATCTACTGA AGGAAATGGA GTCGAGCACC GGTACTGCTC
       T  T  S   V  F  R  A   D  L  L   K  E  M   E  S  S  T   G  T  A
                                  (OdhI-for)
 601  CAGCCTCCAC AGGAGCTGAA AACCTTCCTG CAGGATCTGC TCTTCTTGTA GTCAAGCGTG
       P  A  S   T  G  A  E   N  L  P   A  G  S   A  L  L  V   V  K  R

 661  GACCAAATGC AGGCGCTCGA TTCCTTCTGG ACCAGCCAAC CACGACCGCT GGTCGTCACC
       G  P  N   A  G  A  R   F  L  L   D  Q  P   T  T  T  A   G  R  H

 721  CAGAAAGTGA CATCTTCCTT GATGATGTCA CCGTTTCACG TCGCCACGCA GAGTTCCGCA
       P  E  S   D  I  F  L   D  D  V   T  V  S   R  R  H  A   E  F  R

 781  TCAATGAAGG TGAATTTGAA GTCGTGGACG TAGGGTCCCT CAACGGAACC TACGTTAACC
       I  N  E   G  E  F  E   V  V  D   V  G  S   L  N  G  T   Y  V  N

 841  GCGAGCCACG CAACGCTCAG GTCATGCAGA CCGGTGATGA GATCCAGATT GGCAAGTTCC
       R  E  Q   R  N  A  Q   V  M  Q   T  G  D   E  I  Q  I   G  K  F
          (OdhI-NheI/OdhI-Strep-KpnI)    ◄
 901  GCCTGGTTTT CCTCGCAGGC CCTGCTGAGT AAAAACACTT CCTAGGAAAG TTCTTTGCAG
       R  L  V   F  L  A  G   P  A  E STOP

 961  TGTTTCACTG CAAACAGTGC GGTTGCAGGA TACATACCTA TCTTGCAACC GTTTTGTGTA
1021  TAGAATGCCT AAAATAGTGG TACAAGTCCC TGTCCGCCCA TTTAATTCAC AGCAGGTAGC
1081  AGCAACATCG TGAGTGCACT CCGTAAAACA TCCCCAAACG GCTCCATCGG CGCATCCGCC
1141  ACCAGAACCG TTCCGGTGAA ACCAACCAAG ACTATGTCAA TTGGTGTGGT ACTTGAACGT
1201  CTAAACGCAG AGTTCCCCGA TGTCACTGTG TCCAAAATTC GCTTCCTCGA ATCAGAGGGG
1261  CTGATTACCC CTGAGCGAAC CGCATCTGGA TACCGCCGTT TTACGGAATC AGATGTGGAA
1321  CGCCTCCGCT ACATCCTGGT CACCCAGCGT GACAACTACC TTCCGCTGAA GGTCATCAGG
1381  GAACAGCTGG AAGCCATGGA CAACGGCTCT GTCACCGCCA TCCTTGGTT
```

A2 Sequenz der Gene *pknA* und *pknB* aus *C. glutamicum*

Region des *C. glutamicum* Genoms mit dem *pknA*- (*cg0059*) *und pknB*-Gen (*cg0057*) sowie der entsprechenden Proteinsequenzen. Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation der Kinasedomänen verwendet wurden, sind grau dargestellt. Primer, die zur Überprüfung der Deletion verwendet wurden, sind unterstrichen dargestellt.

```
   1  TAGATAACGT TCCTGGCGGC TTGGGTGAAA TCCCCGACGA TGCCGCCCTT GGACAATCCA
  61  GCATTGGCCA GCGCGACGTG CAAATGAACG TGCTGCAGGC CGCTGTCATG GCAGGAACCG
 121  TATCCAACGG TGGCGTACGC ATGGAACCAT ATTTGGTATC CCGCGTCACC GGTCAGGACC
 181  TGAGCGAACT GAGCACCCAC AAGCCGAAAT CAGTTGGTGG AGTCGAGCCA GAAATTGCAG
                              (ΔpknA-for)
 241  AACAGTTGAA GACTTTGATG GAAGCCTCAG AGCGCAATAC TTCGGGCTAC ACCGGAATTC
 301  AGATCGCTTC CAAGACTGGT ACCGCGGAAC ATGGTGATGA AAACACACCA CCACACACCT
 361  GGTACGTGGC ATTCAACAAC GACATTGCTG TTGCTGTGTT GGTGAAAGAC GGCGGTGGAT
 421  TTGGCACCAG TGCAACTGGT GGTCAGGTCG CAGCCCCAAT TGGCCGAGCT GTGCTTCAGG
                           ► pknA (PknA-NdeI)
 481  CAGCCGGAGG ATTTTAAAAT ATGAGTCAAG AAGACATCAC TGGAAAAGAT CGACTCCAAG
                              M  S  Q   E  D  I   T  G  K  D   R  L  Q

 541  AACTCATCGG CGCTGATTAT CGTCTGCAGT GGATCATCGG ACACGGTGGC ATGTCCACCG
       E  L  I   G  A  D  Y   R  L  Q   W  I  I   G  H  G  G   M  S  T

 601  TATGGCTCGC AGATGATGTG GTCAATGATC GCGAAGTAGC CATCAAGGTA CTGCGCCCGG
       V  W  L   A  D  D  V   V  N  D   R  E  V   A  I  K  V   L  R  P

 661  AATTTTCCGA CAACCAGGAG TTCTTGAACC GTTTCCGCAA TGAAGCGCAA GCGGCTGAGA
       E  F  S   D  N  Q  E   F  L  N   R  F  R   N  E  A  Q   A  A  E

 721  ATATCGATTC TGAACACGTG GTGGCCACCT ATGACTACCG TGAGGTTCCA GACCCTGCTG
       N  I  D   S  E  H  V   V  A  T   Y  D  Y   R  E  V  P   D  P  A

 781  GGCATACTTT CTGCTTCATC GTCATGGAAT TTGTCCGCGG TGAATCGCTT GCGGATCTTC
       G  H  T   F  C  F  I   V  M  E   F  V  R   G  E  S  L   A  D  L

 841  TAGAGCGCGA AGGCAGACTG CCGGAAGACC TGGCTCTTGA TGTGATGGAA CAGGCGGCAC
       L  E  R   E  G  R  L   P  E  D   L  A  L   D  V  M  E   Q  A  A

 901  ATGGTTTGTC GGTGATTCAC CGGATGGACA TGGTGCACCG CGATATCAAG CCGGGCAACA
       H  G  L   S  V  I  H   R  M  D   M  V  H   R  D  I  K   P  G  N

 961  TGCTGATCAC AGCCAATGGC ATTGTGAAGA TCACGGACTT TGGTATCGCT AAGGCTGCCG
       M  L  I   T  A  N  G   I  V  K   I  T  D   F  G  I  A   K  A  A

1021  CTGCTGTGCC TTTGACCCGC ACCGGCATGG TGGTGGGTAC TGCTCAATAT GTTTCACCTG
       A  A  V   P  L  T  R   T  G  M   V  V  G   T  A  Q  Y   V  S  P
                                                    (ΔpknA-rev2)
1081  AGCAAGCCCA GGGCAAGGAA GTCACCGCGG CTTCTGATAT TTATTCTCTC GGTGTGGTCG
       E  Q  A   Q  G  K  E   V  T  A   A  S  D   I  Y  S  L   G  V  V

1141  GCTATGAGAT GATGGCTGGC CGCCGCCCGT TCACTGGAGA TTCTTCGGTG TCTGTGGCGA
       G  Y  E   M  M  A  G   R  R  P   F  T  G   D  S  S  V   S  V  A

1201  TCGCGCACAT CAACCAAGCT CCGCCGCAGA TGCCCACCAG CATTTCGGCA CAGACTCGCG
       I  A  H   I  N  Q  A   P  P  Q   M  P  T   S  I  S  A   Q  T  R

1261  AGTTGATTGG CATTGCGTTG CGCAAGGATC CGGGTCGCCG TTTCCCTGAT GGAAATGAAA
       E  L  I   G  I  A  L   R  K  D   P  G  R   R  F  P  D   G  N  E
```

```
                                    (ΔpknB-1PknA-XhoI)
1321  TGGCGCTAGC TGTTTCTGCT GTGCGCCTTG GCAAGCGCCC GCCTCAACCG CGCACGAGCG
       M  A  L   A  V  S  A   V  R  L   G  K  R   P  P  Q  P   R  T  S

1381  CGATGATGGC GCAGGCGGAG GCGCCGTCGC CAAGCGAATC AACGGCGATG CTGGGCAGGG
       A  M  M   A  Q  A  E   A  P  S   P  S  E   S  T  A  M   L  G  R

1441  TGGCCCGGCC TGCAACAATC ACCCAAGAAG CGGCCCCGAA ACGCGGTTCC GGCATTGGCA
       V  A  R   P  A  T  I   T  Q  E   A  A  P   K  R  G  S   G  I  G

1501  TTGGTCTGTT CATCGCAGCT TTGCTTGCCG TGATTATTGG CGCGGTGATC TATGCGGGCA

       I  G  L   F  I  A  A   L  L  A   V  I  I   G  A  V  I   Y  A  G

1561  CCACCGGAAT TTTGTTCAAC GACACTCCGG AAGAAACCAC CACACCTGAA ACCATTACGG
       T  T  G   I  L  F  N   D  T  P   E  E  T   T  T  P  E   T  I  T

1621  AAACATACAC CCCAACCGTG GAGGAAACCA CCTCTCAGTG GGTACCGCCA ACGCCTCCAA
       E  T  Y   T  P  T  V   E  E  T   T  S  Q   W  V  P  P   T  P  P

1681  CACGGTCAAC ATTCACCGAA CCTGAAACAA CTTCACACCG TCCGACGACA AGTGAAGAGA
       T  R  S   T  F  T  E   P  E  T   T  S  H   R  P  T  T   S  E  E

1741  GCACATCCGA GGAACCAACC ACGGAAGCTC CAACAAGTAG CCGAACTGTG CCTCAAATCC
       S  T  S   E  E  P  T   T  E  A   P  T  S   S  R  T  V   P  Q  I

1801  CTACCTCTAC ACCTAGGACG AGTGCTAGCG TTCCAGTTGA GACTAATGCA CCGGCTGATG
       P  T  S   T  P  R  T   S  A  S   V  P  V   E  T  N  A   P  A  D
                                                              ◄
1861  ATTTAATCGA CGCCGTAAAT GGCCTATTGG ATGTAGGAGG AGCGCAGTGA CCTTCGTGAT
       D  L  I   D  A  V  N   G  L  L   D  V  G   G  A  Q STOP
                                                 pknB ► (PknB-NdeI)
                                                          V  T  F  V

1921  CGCTGATCGC TATGAACTGG ATGCCGTCAT CGGCTCCGGT GGCATGAGCG AGGTGTTCGC
      I  A  D  R   Y  E  L   D  A  V   I  G  S  G   G  M  S   E  V  F

1981  GGCCACCGAC ACGCTCATTG GTCGGGAGGT CGCGGTAAAG ATGCTGCGCA TCGACCTTGC
      A  A  T  D   T  L  I   G  R  E   V  A  V  K   M  L  R   I  D  L

2041  GAAAGATCCC AATTTCCGAG AACGCTTCCG CAGGGAAGCC CAAAACTCCG GAAGGTTGAG
      A  K  D  P   N  F  R   E  R  F   R  R  E  A   Q  N  S   G  R  L

2101  CCACTCTTCG ATCGTCGCTG TTTTTGACAC CGGCGAAGTA GACAAAGACG GCACCTCTGT
      S  H  S  S   I  V  A   V  F  D   T  G  E  V   D  K  D   G  T  S

2161  TCCCTACATT GTGATGGAAC GCGTGCAGGG TCGAAACCTG CGCGAAGTTG TCACCGAAGA
      V  P  Y  I   V  M  E   R  V  Q   G  R  N  L   R  E  V   V  T  E

2221  CGGCGTATTC ACCCCAGTTG AGGCAGCCAA CATCCTCATC CCTGTGTGTG AAGCGCTGCA
      D  G  V  F   T  P  V   E  A  A   N  I  L  I   P  V  C   E  A  L

2281  GGCATCCCAT GACGCCGGCA TTATTCACCG CGATGTGAAA CCCGCCAACA TCATGATCAC
      Q  A  S  H   D  A  G   I  I  H   R  D  V  K   P  A  N   I  M  I

2341  CAACACCGGT GGCGTGAAAG TCATGGACTT CGGCATCGCC CGCGCGGTCA ACGATTCCAC
      T  N  T  G   G  V  K   V  M  D   F  G  I  A   R  A  V   N  D  S
            (ΔpknA-4)
2401  CTCCGCCATG ACTCAAACCT CCGCAGTCAT CGGCACCGCC CAGTACCTCT CCCCTGAGCA
      T  S  A  M   T  Q  T   S  A  V   I  G  T  A   Q  Y  L   S  P  E

2461  GGCCCGCGGC AAACCCGCCG ATGCGCGTTC CGATATTTAC GCCACCGGCT GCGTCATGTA
      Q  A  R  G   K  P  A   D  A  R   S  D  I  Y   A  T  G   C  V  M
```

```
2521  CGAATTAGTC ACCGGTAAGC CACCTTTTGA AGGCGAGTCC CCTTTCGCCG TGGCCTACCA
      Y  E  L  V   T  G  K   P  P  F   E  G  E  S   P  F  A   V  A  Y

2581  ACACGTCCAG GAAGACCCCA CCCCTCCTTC GGATTTCATC GCGGACCTCA CCCCGACCTC
      Q  H  V  Q   E  D  P   T  P  P   S  D  F  I   A  D  L   T  P  T

2641  TGCTGTCAAC GTGGATGCCG TGGTACTCAC CGCCATGGCA AAACACCCCG CCGACCGCTA
      S  A  V  N   V  D  A   V  V  L   T  A  M  A   K  H  P   A  D  R
                                                              (PknB-XhoI)
2701  CCAAACAGCC TCCGAAATGG CCGCTGACCT GGGCCGGCTA TCCCGCAATG CAGTCTCCCA
      Y  Q  T  A   S  E  M   A  A  D   L  G  R  L   S  R  N   A  V  S

2761  TGCCGCACGC GCGCATGTAG AAACAGAAGA AACCCCAGAA GAGCCCGAAA CTCGCTTCTC
      H  A  A  R   A  H  V   E  T  E   E  T  P  E   E  P  E   T  R  F

2821  GACGCGCACC TCCACCCAAG TGGCCCCCGC CGCAGGCGTG GCTGCGGCCA GTACGGGGTC
      S  T  R  T   S  T  Q   V  A  P   A  A  G  V   A  A  A   S  T  G

2881  AGGGTCTTCT TCGCGTAAAC GTGGATCCAG AGGCCTCACC GCCCTGGCCA TCGTGTTATC
      S  G  S  S   S  R  K   R  G  S   R  G  L  T   A  L  A   I  V  L

2941  CCTAGGTGTC GTCGGCGTTG CCGGTGCCTT CACCTACGAC TACTTTGCCA ACAGCTCCTC
      S  L  G  V   V  G  V   A  G  A   F  T  Y  D   Y  F  A   N  S  S

3001  CACTGCAACC AGCGCGATCC CCAATGTGGA AGGCCTCCCG CAGCAAGAAG CTCTCACAGA
      S  T  A  T   S  A  I   P  N  V   E  G  L  P   Q  Q  E   A  L  T
                                        (ΔpknB-rev2)
3061  ACTTCAAGCA GCAGGATTTG TTGTCAACAT CGTCGAAGAA GCCAGCGCCG ACGTCGCCGA
      E  L  Q  A   A  G  F   V  V  N   I  V  E  E   A  S  A   D  V  A

3121  AGGCCTCGTC ATCCGAGCAA ACCCAAGCGT TGGATCCGAA ATCCGCCAAG GGGCCACCGT
      E  G  L  V   I  R  A   N  P  S   V  G  S  E   I  R  Q   G  A  T

3181  CACCATCACC GTGTCCACCG GCCGAGAAAT GATCAACATC CCAGACGTCT CCGGCATGAC
      V  T  I  T   V  S  T   G  R  E   M  I  N  I   P  D  V   S  G  M

3241  ACTTGAGGAC GCCGCCCGCG CCCTCGAAGA CGTTGGTCTC ATACTCAACC AAAACGTTCG
      T  L  E  D   A  A  R   A  L  E   D  V  G  L   I  L  N   Q  N  V

3301  GGAAGAAACC TCCGACGACG TCGAATCTGG CCTCGTCATC GACCAAAACC CCGAAGCCGG
      R  E  E  T   S  D  D   V  E  S   G  L  V  I   D  Q  N   P  E  A

3361  CCAAGAAGTA GTCGTGGGTT CCTCTGTATC TCTAACCATG TCTTCAGGCA CCGAGAGCAT
      G  Q  E  V   V  V  G   S  S  V   S  L  T  M   S  S  G   T  E  S

3421  CCGAGTGCCC AACCTCACCG GCATGAACTG GTCACAAGCA GAACAAAACC TCATCTCCAT
      I  R  V  P   N  L  T   G  M  N   W  S  Q  A   E  Q  N   L  I  S

3481  GGGCTTTAAC CCCACAGCTT CCTACTTAGA CAGCAGCGAA CCAGAAGGCG AAGTCCTCTC
      M  G  F  N   P  T  A   S  Y  L   D  S  S  E   P  E  G   E  V  L

3541  AGTTTCCAGC CAAGGAACTG AACTACCCAA GGGTTCATCC ATCACAGTGG AAGTCTCCAA
      S  V  S  S   Q  G  T   E  L  P   K  G  S  S   I  T  V   E  V  S

3601  CGGCATGCTC ATCCAAGCCC CCGATCTCGC CCGCATGTCC ACCGAACAGG CCATCAGTGC
      N  G  M  L   I  Q  A   P  D  L   A  R  M  S   T  E  Q   A  I  S

3661  CCTCCGCGCT GCTGGCTGGA CCGCCCCAGA TCAATCCCTG ATCGTCGGCG ACCCCATCCA
      A  L  R  A   A  G  W   T  A  P   D  Q  S  L   I  V  G   D  P  I

3721  CACCGCAGCC CTCGTGGATC AAAACAAAAT CGGATTCCAA TCCCCAACCC CTGCAACCCT
      H  T  A  A   L  V  D   Q  N  K   I  G  F  Q   S  P  T   P  A  T
```

```
3781  CTTCCGCAAA GACGCCCAAG TGCAAGTGCG ACTCTTCGAA TTCGATCTCG CTGCACTCGT
       L  F  R  K   D  A  Q   V  Q  V   R  L  F  E   F  D  L   A  A  L

 3841  GCAATAGCCA ACAAGGAAAC CGTCAAGGTA GCTGGCCCGG CAACTGATAC GTTAAGCTCA
       V  Q STOP

 3901  AACAAGATAA GTACCAGTTG CTGGGGTTTT TCCAAGACAA TAAATTATGA AGGTGTGAAC
 3961  AATGCCAAAG GCAAGAGTAA CTAAAAACGA GACCGCACCG GTTTCAAGCA ACCCAAGCGC
 4021  AAACCGCACC CCGGTTAAGA TCAATTCCGC CGGAACCCCA ATGTGGTACA AGGTCATCAT
 4081  GTTTGCCTTC ATGATCGTCG GCCTAGCCTG GTTGATCATT AACTACCTCG TGGGCCCACA
 4141  GATCCCATTC ATGGCTGATC TTGGTGCATG GAACTATGGC ATCGGCTTCG GTCTGATGAT
 4201  CATCGGCCTA CTCATGACCA TGGGTTGGCG TTAATCCTTC AAAAAAGTGA CTGCCGCAGC
 4261  ACAGCGTTGA TTCGTTGTGC TGCGGCAGTT GTTTTGTGCG GGCGGATCCA GATTTAGCCC
                 (ΔpknB-for)
 4321  CTCATGGGCA CTCTCGTTTG GCAGTT
```

A3 Sequenz des Gens *pknG* aus *C. glutamicum*

Region des *C. glutamicum* Genoms mit dem *pknG*-Gen (*cg3046*) sowie der entsprechenden Proteinsequenz. Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation der Kinasedomäne verwendet wurden, sind grau dargestellt. Primer, die zur Überprüfung der Deletion verwendet wurden, sind unterstrichen dargestellt.

```
    1  CCACTCACCA CGCGAGTCGG CGCTGCATTG CTGGCCGCAA CGCTGCTTGC TTCCTGCACT
   61  CCAACACCTG TGGAACCGGC AGAAACCTTG ACTGCTTTGG ATCCCGATGC CGGTCCACCA
  121  CTGCCACCGG ATTCTTCGAT TGAAGCTCCC GGTGAAAAAG AGCCCATTGT GGAAGTAATA
  181  GAGAATTGGC CAGGTTCTTT ACGCCCGGAT GATCTGACCC CTGAGGAGCG GGTACCTGGC
  241  ATCGTCAACC GGGGTCGCAT CATTGTGGGT GTGGATCAAT CGCAAAACTT GCTCAGTTTC
                              (ΔpknG-for)
  301  CGTGATCCGG TGACTGGTGA GCTGCGCGGT TTTGAAGTGG AATTAGCGAG GGAAATTTCC
  361  CGCGACATTT TCGGTGACCC CAATAAGGTG GATTTCCGAT TCGTCGGCTC GTCCGACCGT
  421  CTGCGTTCCC TTGACCAAGG TGATGTAGAT ATTGTGATTC GTTCCGTCAC GATCACCGAC
  481  GAACGCGCCA AATTGGTGGA ATTTTCCACA CCGTACCTGC GCACCCAAAC CCGCATGTTG
  541  ACCATGGAAT CTTCAGGAAT CACGTCCATC GCAGATCTAC CCGGCCACAC CATTTGTGTC
  601  ACCGATGGCT CCACTTCATT GCAGCGAGCC CGCACCATTG CGCCGGAGGC CTCAATCTTA
  661  AAAACTCGCA ATTGGTCCGA TTGTCTCATG GCGTTGCAGC AGCATCAGGC TCAGGTCATT
  721  TTGGGCGATG ATGTCATTTT GTCCGGCATC GCAGCACAGG ATCCCTACAC CGAGATTCTT
  781  GATACCTCCC TCGATTCCCA TTCCTATGGA GTGGCAGCGG CATCGACCAC TGCTGAAACA
  841  GACTCTTCGG GGTTGATTCG GCAGGTAAAC TACACAATTG AACGGATCCG CACAGACCGC
  901  ATGTGGTGGA CAATGTTCGA CGATTGGTTC GGACCTTATC TCTGGTCCTA CGGTCCACCA
                                                 ► pknG (PknG-NdeI)
  961  CAGCTGCAGT ACATGCCAGA GGAAGAAGGG ACAGAAAACG ATGAAGGATA ATGAAGATTT
                                                    M  K  D   N  E  D

 1021  CGATCCAGAT TCACCAGCAA CCGAAGCTGT TGCCTTCAAC CCTTTCGACG ATGACGATGA
       F  D  P  D   S  P  A   T  E  A   V  A  F  N   P  F  D   D  D  D

 1081  GGATGATTCC CCCGCTACCT CAGCCGTTGC CTTTAACCCT TTTGAAGATG ACGATGACGA
       E  D  D  S   P  A  T   S  A  V   A  F  N  P   F  E  D   D  D  D

 1141  CGATGAGTTC CAAGGCGAAG GCCTAGAATT CCTGCTGCGC GACCTCGACA ATCTGCGAGC
       D  D  E  F   Q  G  E   G  L  E   F  L  L  R   D  L  D   N  L  R

 1201  CACCCAAGGT CAAATGGTGG TGGAACAACC AGCAGTTGAA GACAGCCTCG GGTCAGCATC
       A  T  Q  G   Q  M  V   V  E  Q   P  A  V  E   D  S  L   G  S  A

 1261  TGCGCATACG GAGACAACTG CGGCCTCACT GCGTCCCCGC CCAGAGGTGG ATCCAAGTGA
       S  A  H  T   E  T  T   A  A  S   L  R  P  R   P  E  V   D  P  S
```

```
1321  GAGGAGTCGT CGACAAGCAA TTTCGCTGTT CCGCGAACGG CGCCGCGTAA GGCGCCAATC
      E  R  S  R   R  Q  A   I  S  L   F  R  E  R   R  R  V   R  R  Q

1381  CCGCCCAGTT GCTGATGGCA TGGTGGAATT GCCGTTCATC ACCCCCAAAC CGGAAGATGA
      S  R  P  V   A  D  G   M  V  E   L  P  F  I   T  P  K   P  E  D

1441  GCTGCTCATC GACCCGGAAA AGAAGCGCAA ACCTGGTGTG GCAGCGCCGC AACTTGTCGC
      E  L  L  I   D  P  E   K  K  R   K  P  G  V   A  A  P   Q  L  V

1501  GGGCGATATC GTCGCAGAGC AATATGAAGT CCTCGGCGTC ATCGCGCACG GCGGCATGGG
      A  G  D  I   V  A  E   Q  Y  E   V  L  G  V   I  A  H   G  G  M

1561  TTGGATTTAC CTCGCCAACG ACCGCAATGT GTCCGGCCGC ATCGTGGTGC TCAAAGGCAT
      G  W  I  Y   L  A  N   D  R  N   V  S  G  R   I  V  V   L  K  G

1621  GATGGCGCAA TCTTCCGTTC AAGACCAAGG CACCGCTGAA GCCGAACGCG AATTCCTCGC
      M  M  A  Q   S  S  V   Q  D  Q   G  T  A  E   A  E  R   E  F  L
                                  (ΔpknG-rev2)
1681  CGACATCACC CACCCCGGCA TCGTGAAGGC CTACAACTTC ATCGACGACC CCCGCGTCCC
      A  D  I  T   H  P  G   I  V  K   A  Y  N  F   I  D  D   P  R  V

1741  CGGCGGATTC ATCGTCATGG AATACGTCAA CGGCCCCTCC CTGAAAGACC GCTGCAAAGC
      P  G  G  F   I  V  M   E  Y  V   N  G  P  S   L  K  D   R  C  K

1801  CCAACCCGAC GGCGTGCTCC GCGTCGACCT CGCCATCGGC TACATCCTCG AACTCCTCCC
      A  Q  P  D   G  V  L   R  V  D   L  A  I  G   Y  I  L   E  L  L

1861  CGCCATGGAC TACCTGCACC AACGCGGCGT AGTGTACAAC GACCTCAAAC CCGAAAACGT
      P  A  M  D   Y  L  H   Q  R  G   V  V  Y  N   D  L  K   P  E  N

1921  CATCGCCACC GAAGACCAAG TTAAACTCAT CGACCTCGGC GCGGTTACCG GCATCGGCGC
      V  I  A  T   E  D  Q   V  K  L   I  D  L  G   A  V  T   G  I  G
                                     (PknG-XhoI)
1981  ATTCGGCTAC ATTTACGGCA CCAAAGGATT CCAAGCACCC GAAGTAGCCA CCCATGGCCC
      A  F  G  Y   I  Y  G   T  K  G   F  Q  A  P   E  V  A   T  H  G

2041  CTCAATCTCC TCCGATATTT TCACCATCGG ACGCACCCTC GCAGCACTCA CCATGCCCCT
      P  S  I  S   S  D  I   F  T  I   G  R  T  L   A  A  L   T  M  P

2101  CCCCGTTGAA GACGGTGTCC TCGCACCGGG CATCCCCTCG CCCAAAAATT CACCTCTTCT
      L  P  V  E   D  G  V   L  A  P   G  I  P  S   P  K  N   S  P  L

2161  GCGCAGGCAT TTGTCGTTCT ACCGCCTCCT GCAACGCGCC ACCGCCGACG ACCCCCAACA
      L  R  R  H   L  S  F   Y  R  L   L  Q  R  A   T  A  D   D  P  Q

2221  CCGATTCCGC AACGTCAGCG AACTACGCAC CCAACTCTAC GGCGTACTGC GTGAAATTTT
      H  R  F  R   N  V  S   E  L  R   T  Q  L  Y   G  V  L   R  E  I

2281  GGCAGTCCGC GACGGCAAAC AATACCCGCC ACAGCACTCA CTATTCTCCC CACAGCGAAG
      L  A  V  R   D  G  K   Q  Y  P   P  Q  H  S   L  F  S   P  Q  R

2341  CACCTTTGGC ACCAAACACC TCGTGTTCCG CACCGACCGC ATCATCGACG GCATCGAACG
      S  T  F  G   T  K  H   L  V  F   R  T  D  R   I  I  D   G  I  E

2401  ACAAGCACGC ATCACAGCAC CAGAAATTGT CTCCGCGCTG CCTGTCCCAC TCATCGACCG
      R  Q  A  R   I  T  A   P  E  I   V  S  A  L   P  V  P   L  I  D

2461  CACCGACCCC GGCGCCCGTA TGCTCTCCGG ATCCTCCTAT GCAGAACCCT CCGAAACCCT
      R  T  D  P   G  A  R   M  L  S   G  S  S  Y   A  E  P   S  E  T

2521  GGAAACTCTG CGCAACTCCA TGGAAGACGA GCAATACCGC CAATCAATCG AGATCCCCCT
      L  E  T  L   R  N  S   M  E  D   E  Q  Y  R   Q  S  I   E  I  P
```

```
2581  CGGTGTCGTC CGAGCCCTCC TTGACCTAGG CTTTACCACC GAAGCACGCC AATGGCTCGA
      L  G  V  V   R  A  L   L  D  L   G  F  T  T   E  A  R   Q  W  L

2641  AACCCTAGAG GGACGCATCG GCGACGACTG GCGACACAAA TGGTTCTCCG GAATCACCTA
      E  T  L  E   G  R  I   G  D  D   W  R  H  K   W  F  S   G  I  T

2701  CCTCCTCCTC GACGACTACG CCACCGCCCA AGTATTCTTC AACCACGTCC TGACCATCCT
      Y  L  L  L   D  D  Y   A  T  A   Q  V  F  F   N  H  V   L  T  I

2761  GCCCGGCGAA GCCGCTCCTA AACTAGCCCT CGCAGCTGTT GACGAACTCA TCCTCCAACA
      L  P  G  E   A  A  P   K  L  A   L  A  A  V   D  E  L   I  L  Q

2821  AATCGGCGCC GAATCCACCG CCTATCTCAC CCCAGACATC GTCTCTGCAA CCGCGACCCT
      Q  I  G  A   E  S  T   A  Y  L   T  P  D  I   V  S  A   T  A  T

2881  CAGCAAAGAT TTCGAAGACC TCGACGCCTC CGCCTTCGAA TCACTCAGCG ACACCTGGTC
      L  S  K  D   F  E  D   L  D  A   S  A  F  E   S  L  S   D  T  W

2941  CCACATCTCC AGCGACCCAC ACGTAGTCCG CTTCCATTCA CTGCGCCTCT ACGCACTTGT
      S  H  I  S   S  D  P   H  V  V   R  F  H  S   L  R  L   Y  A  L

3001  CTGGGCAACC AACCCCACCA CCGTGTCCTC CGCGTTCGGG CTCGCCCGCC AACTCATGGC
      V  W  A  T   N  P  T   T  V  S   S  A  F  G   L  A  R   Q  L  M

3061  CGAAAACCAA ATCGAACTCG CAGTCCAAGC CCTAGACAAA CTCCCCCAAT CATCCACCCA
      A  E  N  Q   I  E  L   A  V  Q   A  L  D  K   L  P  Q   S  S  T

3121  CTACCGAATG GCCACCCTCA CCACCATCTT GTTGCTGGTC AGCTCCAATT TGAGTGAATC
      H  Y  R  M   A  T  L   T  T  I   L  L  L  V   S  S  N   L  S  E

3181  CCGCATCCGA CGGGCTGCCC GCCGACTCAC CGAAATCCCC ACAAACGAAC CCCGCTTCAA
      S  R  I  R   R  A  A   R  R  L   T  E  I  P   T  N  E   P  R  F

3241  CCAAATCAAA ATTGCCATCA TGTCGGCAGG CCTCAGCTGG CTTCGAGAGC GAAAACTCAA
      N  Q  I  K   I  A  I   M  S  A   G  L  S  W   L  R  E   R  K  L

3301  AGCTTCCGCC TCCGCGAACC CTTTGTTTGA ATACCCGTTC TCCCAAAAAG GCCTGCGCAC
      K  A  S  A   S  A  N   P  L  F   E  Y  P  F   S  Q  K   G  L  R

3361  CGGCATCTCC GAGGCACTCC GCATTCAGGC ACGTTCTGCA CCGTTCCCGC ACCACCGTTA
      T  G  I  S   E  A  L   R  I  Q   A  R  S  A   P  F  P   H  H  R
                                                          ◄
3421  CGCACTTGTG GATATGGCGA ATGCCGTGCG GCCACTGAGT TGGTTCTAGC TGTTTTGACT
      Y  A  L  V   D  M  A   N  A  V   R  P  L  S   W  F STOP

3481  TGGGGCTATT TGGTAGGTGG CGATTTAAGG GCCTTTAGGA GTGCGATGTC CCCTAGTTTG
3541  ACTTTGGGCG AGTTAGGCCC TTAGAAGCGA TTCTGGGGGA GTTACTTTTG GGACAATTGG
3601  GGCTGATGTG ATTTCTGCGG GGTTACTGCA GGTTTCCTGT TCAACTTCTC GTTACGGGTT
3661  GCTGGAATTC GATGAAATGG AACGAATATT CGCATAATAG CAAGGTGTTA GAGCAAATTT
3721  TCGACCAAAA CCGGCCTTTT AATGTTCGGT GGGGACGAAA ATTCGCAACC CCAAGAGGTC
3781  TAGGGGCCAA CAAGCGATTC CTGTGAAGCT CCAGGGCAAG GATCCACCAC GTTCCAAAGG
3841  AAAACTGGGA TCTGTGGTGG ATCCGTGCAG TTTCACCCCT TAAAAACGCA AAAATCCACC
3901  ACAAAACCGC TGATCAGAGC GATTTGTGGT GGATCCTAAC CAGGAGAGCT AAGCGAACTT
3961  CACCGCGTAC CTAGCGATAG CTAACTCTTC ATTAGTTGGA ATAACAAACA CCTTCACCTT
                                                    (ΔpknG-rev)
4021  GGAGGCATCG GTGGAAATCA ATCGAGGACC ATCGTTTGGC AATGCGTTAC GCTCTGGATC
4081  GATCTCAATT CCGTACATTT CCAAACCTGC CAAGGCATCC TCACGGACAA ACTGGGCATT
4141  TTCACCGACA CCGGCGGTGA ACACGATGGT GTCTACCCGT CCCAGTGCCA CCATGTAGGA
4201  ACCGAGGTAG CGGCGGAGTT GGTGTATGTA AATGTTGTAC GCGGACCAGG CATCTTGATC
4261  ATTGTTGTCG ATCATTTCCC GCAGTTCACG GAAATCATTA ACACCGGAAA GTCCCTTTAC
4321  ACCCGACTTT TTGTTCAGCA GATTATCGAT CTCATCGATG CTCATGCCAG CGGTGCGGGA
4381  AAGGTGGAAG ACGATACCTG GATCAATGTC ACCGCTTCGG GTACCCATGA CAAGGCCCGC
4441  GAGAGGTGTC ATACCCATGG AAGTAT
```

A4 Sequenz des Gens *pknL* aus *C. glutamicum*

Region des *C. glutamicum* Genoms mit dem *pknL*-Gen (*cg2388*) sowie der entsprechenden Proteinsequenz. Anlagerungsbereiche der Primer, die zur Amplifikation der Kinasedomäne verwendet wurden, sind grau dargestellt. Primer, die zur Überprüfung der Deletion verwendet wurden, sind unterstrichen dargestellt.

```
   1  TTTCGACTAC AACGCAGTGG TTAATGTTGT GCGCTCAATC TCCATGCTGA TCATGCTTGG
  61  CGGGTTGGTC GTATGTTGGT GGCTGTTCCG CCAGAACGAA CGCAGGGCGG TCACTGGTAC
 121  AGCAGCGGCT TATGCCGTGG CTTTTGTGTT CAATTCTGTG ACCTTGCCGT GGTACTACGC
 181  CAGCTTGATC TCTTTGCTCG GCACATTTAA ACCACCGATG TGGTTGATTC GCTTCGCAGC
 241  GGGTGCTTCG GTGTTTATCG CGCTGATGTT TACCGGAAGT GGAAACCACC AGCTGTACAA
          (ΔpknL-for)
 301  CATCGTTACG GTGATCATCG CAGCAATTAT CGCGTGGCTT GCCACCGTGG TGATCTTTGA
 361  TGACACTGAC CCTGCAACAA CGGCCACGGA GAAACCCTCC CCGCATACCG TTTCCTAGTT
 421  GCATAAGGTA AACCGCCACC CCACTAACAA AATGGGATGG CGGTTTTTTA GATCTTTTAG
 481  AAAGCGCTTA GAACGCCATT GCTTGAGCGC GTCGCATAAC TTCACGAGCC AACTGGCCAT
 541  GAAGTGCATC GATGGGGCGA CCAGGAAGGG TCTCGTCTTC GGTAAACAGG AACGCGAGGA
 601  TTTCCTCGTC GCTGAAGCCA CCGTCGGCAA GCAAGGCAAT AACTCCAGGG ATGAAACGGT
 661  TGGTGTTTTC CTTCTTGGTG CTCAGGAAAG CTTCTGGAAT GTAGCGAATA CCGTCGCGCC
 721  GGACCACGAT CAATTTGTGT TCATTGACCA GATCCATCAC CTTGGTGACA ACAACGCCGA
 781  GGCGCTCGGC TGTCTCCGGA AGGGTCAGCA ATGGTTCATT GTCGGGCAGG GCGAAGGAAG
 841  ATTCATTGTT GGAACTCACA GTCTTAATTT AGCTGGTTCG AGCTCTAATG GAGAATCTTT
 901  AGGGTATTTC TGCGCGTGCC GGGAATGAAA GCACCTTCTT GACCTTTGAA AACAGGATGT
                                                 ► pknL (PknL-NdeI)
 961  CACTACCACT TTTTGTGTAC CTTCCGACAT ACTGGAACGC ATGGCAAACT TGAAGGTCGG
                                                   M  A  N   L  K  V

1021  TGACGTTTTA GAGGACAGGT ATCGGATTGA AACTCCGATT GCCCGGGGTG GTATGTCTAC
      G  D  V  L   E  D  R   Y  R  I   E  T  P  I   A  R  G   G  M  S

1081  CGTGTACAGG TGCCTTGATC TTCGTTTAGG ACGTTCCATG GCGCTTAAAG TCATGGAAGA
      T  V  Y  R   C  L  D   L  R  L   G  R  S  M   A  L  K   V  M  E

1141  AGATTTCGTT GATGATCCCA TTTTCCGGCA GCGTTTCCGT AGGGAAGCTC GGTCAATGGC
      E  D  F  V   D  D  P   I  F  R   Q  R  F  R   R  E  A   R  S  M

1201  GCAGCTAAAT CATCCAAATT TGGTCAATGT GTATGATTTT TCCGCTACTG ACGGTTTGGT
      A  Q  L  N   H  P  N   L  V  N   V  Y  D  F   S  A  T   D  G  L

1261  GTATCTGGTG ATGGAGTTAA TCACTGGTGG CACCTTGCGT GAGTTGCTGG CTGAGCGGGG
      V  Y  L  V   M  E  L   I  T  G   G  T  L  R   E  L  L   A  E  R

1321  ACCTATGCCC CCGCATGCTG CTGTGGGCGT TATGCGTGGG GTGCTCACGG GTCTCGCGGC
      G  P  M  P   P  H  A   A  V  G   V  M  R  G   V  L  T   G  L  A

1381  TGCCCACCGG GCGGGCATGG TGCACCGGGA TATCAAGCCT GACAACGTGT TGATCAATAG
      A  A  H  R   A  G  M   V  H  R   D  I  K  P   D  N  V   L  I  N

1441  TGATCACCAG GTGAAACTGT CTGATTTCGG CTTGGTTCGA GCGGCTCACG CCGGCCAGTC
      S  D  H  Q   V  K  L   S  D  F   G  L  V  R   A  A  H   A  G  Q

1501  TCAGGACAAT CAGATTGTGG GCACGGTGGC TTATCTTTCC CCTGAGCAGG TTGAGGGCGG
      S  Q  D  N   Q  I  V   G  T  V   A  Y  L  S   P  E  Q   V  E  G
                                                        (ΔpknL-rev2)
1561  TGAGATCGGG CCGGCCAGCG ACGTGTATTC GGCAGGCATT GTGCTCTTTG AGCTGCTCAC
      G  E  I  G   P  A  S   D  V  Y   S  A  G  I   V  L  F   E  L  L

1621  AGGCACCACG CCTTTTTCGG GCGAGGATGA TCTCGACCAT GCATACGCCC GCCTTACGGA
      T  G  T  T   P  F  S   G  E  D   D  L  D  H   A  Y  A   R  L  T
```

```
1681  AGTCGTGCCG GCACCGAGTT CGCTTATCGA CGGCGTCCCC TCCCTCATCG ATGAGCTTGT
      E  V  V  P   A  P  S   S  L  I   D  G  V  P   S  L  I   D  E  L

1741  CGCGACAGCT ACCTCCATTA ATCCTGAGGA TCGTTTCGAT GATTCTGGAG AGTTTTTGTC
      V  A  T  A   T  S  I   N  P  E   D  R  F  D   D  S  G   E  F  L
                                                    (PknL-XhoI)
1801  CGCACTGGAA GATGTCGCAA CAGAGTTGAG CTTGCCGGCT TTCCGGGTCC CTGTGCCGGT
      S  A  L  E   D  V  A   T  E  L   S  L  P  A   F  R  V   P  V  P

1861  TAATTCCGCA GCCAATAGGG CTAATGCCCA GGTCCCGGAT GCTCAGCCAA CTGATATGTT
      V  N  S  A   A  N  R   A  N  A   Q  V  P  D   A  Q  P   T  D  M

1921  TACCACCCAT ATCCCCAAGA CTCCTGAGCC TGATCACACT GCGATCATTC CGGTGGCCTC
      F  T  T  H   I  P  K   T  P  E   P  D  H  T   A  I  I   P  V  A

1981  AGCAAATGAG ACGTCGATTC TGCCTGCGCA AAACATGGCA CAAAATATGG CGCAGAATCC
      S  A  N  E   T  S  I   L  P  A   Q  N  M  A   Q  N  M   A  Q  N

2041  GCTGCAACCT CCGGAACCTG ATTTCGCCCC GGAGCCACCT CCGGACACAG CGCTGAATAT
      P  L  Q  P   P  E  P   D  F  A   P  E  P  P   P  D  T   A  L  N

2101  TCAAGATCAA GAGCTTGCGC GCGCCGATGA GCCAGAAATT AATACCGTCA GCAATCGTTC
      I  Q  D  Q   E  L  A   R  A  D   E  P  E  I   N  T  V   S  N  R

2161  CAAATTGAAG CTGACGTTGT GGTCAATTTT CGTGGTCGCA GTGATCGCTG CTGTTGCTGT
      S  K  L  K   L  T  L   W  S  I   F  V  V  A   V  I  A   A  V  A

2221  TGGCGGTTGG TGGTTCGGTT CAGGCCGTTA CGGTGAGATT CCGCAGGTGT TGGGCATGGA
      V  G  G  W   W  F  G   S  G  R   Y  G  E  I   P  Q  V   L  G  M

2281  TGAGGTCCAG GCAGTAGCTG TTGTAGAGGA AGCTGGTTTC GTGGCAGTGG CTGAACCTCA
      D  E  V  Q   A  V  A   V  V  E   E  A  G  F   V  A  V   A  E  P

2341  GTATGACAAT GAGGTTCCCA CTGGTTCGAT TATTGGGACT GAACCTTCTT TTGGTGAGCG
      Q  Y  D  N   E  V  P   T  G  S   I  I  G  T   E  P  S   F  G  E

2401  CCTTCCTCGC GGCGAGGATG TTTCTGTCCT CGTCTCTCAA GGGCGTCCCG TGGTGCCGGA
      R  L  P  R   G  E  D   V  S  V   L  V  S  Q   G  R  P   V  V  P

2461  TCTTAGCGAG GATCGATCCT TAAGCACCGT TCGTGAAGAG TTGGAACAGC GCACGTTCGT
      D  L  S  E   D  R  S   L  S  T   V  R  E  E   L  E  Q   R  T  F

2521  CTGGGTTGAT GGCCCAGGTG AATATTCTGA CGATGTTCCA GAAGGACAAG TAGTTTCTTT
      V  W  V  D   G  P  G   E  Y  S   D  D  V  P   E  G  Q   V  V  S

2581  TACACCGTCG TCAGGCACGC AGCTTGATGT TGGTGAAACC GTGCAGATCC ATTTGAGCCG
      F  T  P  S   S  G  T   Q  L  D   V  G  E  T   V  Q  I   H  L  S

2641  AGGCCCCGCC CCGGTTGAGA TTCCTGATGT CTCTGGCATG GGAGTGGATC AGGCAACACG
      R  G  P  A   P  V  E   I  P  D   V  S  G  M   G  V  D   Q  A  T

2701  TGTGTTGGAG CGCGCAGGTT TGAGCGTCGA GCGTACTGAA GAAGGCTTTG ATGCTGAGAC
      R  V  L  E   R  A  G   L  S  V   E  R  T  E   E  G  F   D  A  E

2761  ACCAAATGGT GATGTCTACG GGACTTCGCC CAAGGTATCT ACTGAGGTCA AGCGCGGAAC
      T  P  N  G   D  V  Y   G  T  S   P  K  V  S   T  E  V   K  R  G

2821  CTCTGTTGTG CTGCAGGTGT CCAATGCTAT TTCGGTACCG GATGTGGTGG GTATGACCAA
      T  S  V  V   L  Q  V   S  N  A   I  S  V  P   D  V  V   G  M  T

2881  GGACGAAGCC ACCGCGGCGC TTGCGGAAGA AGGATTGGTC GTGGCGTCGA CAAGCATTAT
      K  D  E  A   T  A  A   L  A  E   E  G  L  V   V  A  S   T  S  I
```

```
2941  TCCTGGTGAG GCGGCGAGCT CCGCTGACGC CGTCGTGACC GTCGAGCCTG AATCCGGCAG
      I  P  G  E   A  A  S   S  A  D   A  V  V  T   V  E  P   E  S  G

3001  CCGCGTTGAT CCAGCGCATC CGCAGGTCAG CCTCGGGTTA GCTGGGGAGA TTCAAGTTCC
      S  R  V  D   P  A  H   P  Q  V   S  L  G  L   A  G  E   I  Q  V

3061  AAGCGTGGTT GGACGTAAGG TTAGCGATGC TCGAAGCATT CTGGAAGAAG CCGGTTTAAC
      P  S  V  V   G  R  K   V  S  D   A  R  S  I   L  E  E   A  G  L

3121  GCTGACAACT GATGCGGACG ACAACGATCG AATTTATAGT CAAACCCCTC GTGCACGCAG
      T  L  T  T   D  A  D   D  N  D   R  I  Y  S   Q  T  P   R  A  R
                                                    ◄
3181  CGAAGTCTCG GTAGGGGGAG AAGTTACAGT AAGGGCGTTT TAGTGGTTCC CTCGTTGCAG
      S  E  V  S   V  G  G   E  V  T   V  R  A  F STOP

3241  CAATGGCGAA AACCTGCTCT CATCCTGGCC ATTTTGACGG TGCTAGGCGT ACTCCTGACC
3301  CATTGGTTCG CCTGGCCACT CACCTGGCCG CTGGGGCTGC GTCTTCCCGT TGATGTAGAG
3361  GTGTACTGGC AGGGTGCGCG CGAGTTTTGG CTCGCCGATG ATCTCTACGA CATCAGGTAT
3421  GACACCACTT TCGACAACTT GCCGTTCACC TATCCCCCTT TCGGTGCGTT GGTGTTCACC
3481  CCATTGTGGT GGATTCATGA CCTCTTTGGT CTTCTCGTCA CCGAACGTGT CTTCGCGCTA
3541  ATCACGCTGC TCACCACCTA CGCTGTGGCA GTTTTCCTGC TCCGCCTGGC CGGCGTGCGC
3601  GATCGTGTGT GGGAATTCGT CGCATTCGCA GCCCTGCTCG TGTCCGCGCC GGTGTATTTC
3661  ACACTCAATA TTGGGCAAAT AAACGTCATG CTCATGGCTT TAACGCTTTT CGACGTCGCC
3721  CTCCCCCGCA GCACGCGCCA TTCAGGCGTG CTCAAATACG TGCCACTCGG CGTACTCACC
3781  GGCATTGCCG CTGCGATCAA ACTAACCCCA CTAGTGTTCG GGCTGTATTT CCTCATCCTG
3841  TGGGTCGTGA CTAAATCACC ACGCGGACTG TTTGGAATGA TTGGTGGCTT CCTCGGGGCA
                                  (ΔpknL-rev)
3901  TCCGGGCTTG CAATTATTTT CCGACCATCC ATTAGCATCC AATATTTCAC CGACGTGCTG
3961  TTTACCGCAG AACGCATCGG CGACCTCCAC TTCGCACGCA ATGTCTCCAT CCGTGCGGTT
4021  TTGGAACGAC TCCCCGAACT TGGTTCCGCA GCATCTATCA TGTGGCTTGT TGCTGTGGCG
4081  CTAGTGATCA TCGCAGTCGC AGTTGCTGCT TACCGAATCC TGCGGACGGA TCTCTCCGCG
4141  CACAATCGTC TGCTGGCTGT TTCCCTCGTG TCGCTCGTTG CACTGTTGTG CTCCCCCGTC
4201  AGTTGGTACC ACCACTGGGT
```

A5 Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

pET28b-*odhI*

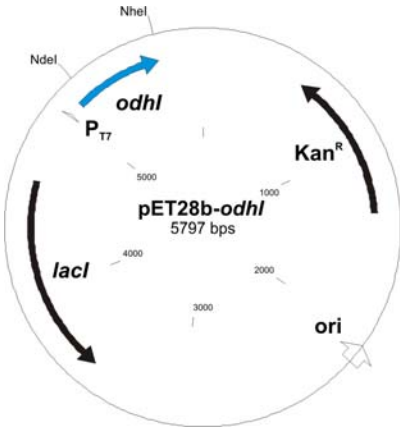


Abbildung A5.1: Plasmid pET28b mit einem 449-bp-PCR-Fragment (Primer OdhI-NdeI/OdhI-NheI) in den NdeI- und NheI-Schnittstellen, das den *odhI*-Genbereich (AS 1 – 143) aus *C. glutamicum* enthält. Das kodierte OdhI-Protein trägt 20 zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus inklusive eines Hexahistidin-„Tags“ und einer Thrombin-Proteaseschnittstelle.

pET16b-*pknA*-KD

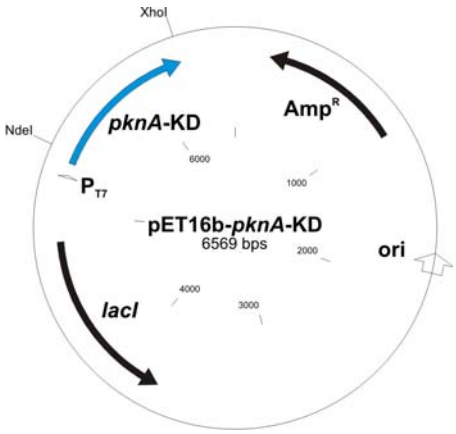


Abbildung A5.2: Plasmid pET16b mit einem 878-bp-PCR-Fragment (Primer PknA-NdeI/PknA-XhoI) in den NdeI- und XhoI-Schnittstellen, das den *pknA*-Genbereich (AS 1 – 287) aus *C. glutamicum* enthält. Das kodierte PknA-Protein trägt 21 zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus inklusive eines Decahistidin-„Tags“ und einer Factor Xa-Proteaseschnittstelle.

pET16b-*pknB*-KD

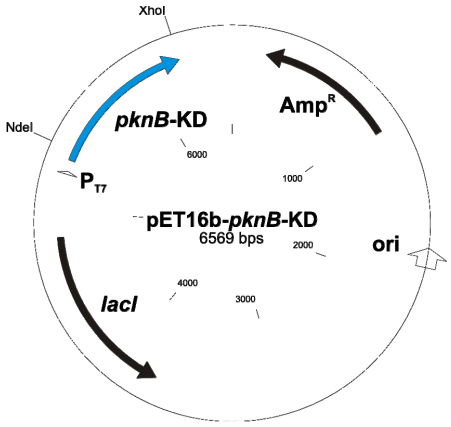


Abbildung A5.3: Plasmid pET16b mit einem 878-bp-PCR-Fragment (Primer PknB-NdeI/PknB-XhoI) in den NdeI- und XhoI-Schnittstellen, das den *pknB*-Genbereich (AS 1 – 287) aus *C. glutamicum* enthält. Das kodierte PknB-Protein trägt 21 zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus inklusive eines Decahistidin-„Tags“ und einer Factor Xa-Proteaseschnittstelle.

pET16b-*pknG*-KD

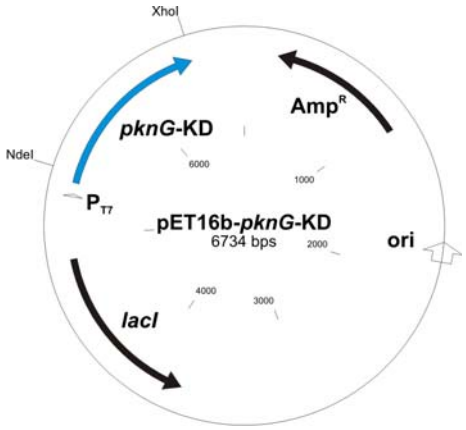


Abbildung A5.4: Plasmid pET16b mit einem 1043-bp-PCR-Fragment (Primer PknG-NdeI/PknG-XhoI) in den NdeI- und XhoI-Schnittstellen, das den *pknG*-Genbereich (AS 1 – 342) aus *C. glutamicum* enthält. Das kodierte PknG-Protein trägt 21 zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus inklusive eines Decahistidin-„Tags“ und einer Factor Xa-Proteaseschnittstelle.

pET16b-*pknL*-KD

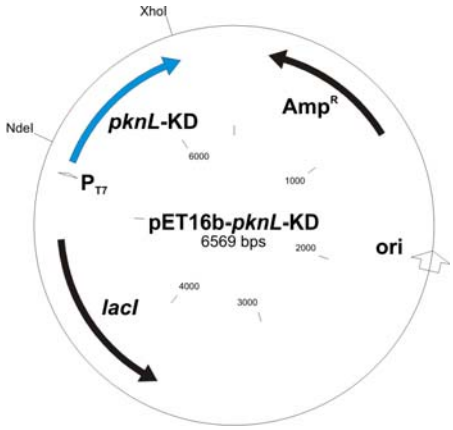


Abbildung A5.5: Plasmid pET16b mit einem 878-bp-PCR-Fragment (Primer PknL-NdeI/PknL-XhoI) in den NdeI- und XhoI-Schnittstellen, das den *pknL*-Genbereich (AS 1 – 287) aus *C. glutamicum* enthält. Das kodierte PknL-Protein trägt 21 zusätzliche Aminosäurereste am N-Terminus inklusive eines Decahistidin-„Tags“ und einer Factor Xa-Proteaseschnittstelle.

pK18*mob-odhI*-Strep

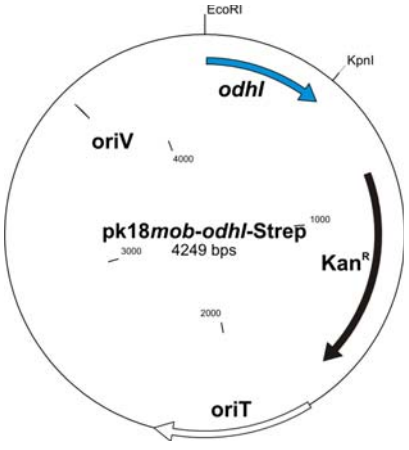


Abbildung A5.6: Plasmid pK18*mob* mit einem 476-bp-PCR-Fragment (Primer OdhI-EcoRI/OdhI-Strep-KpnI) in den EcoRI- und KpnI-Schnittstellen, das den *odhI*-Genbereich (AS 1 – 142; ohne Stop-Codon) aus *C. glutamicum* inklusive einer C-terminalem *Strep*Tag-II-kodierenden Sequenz enthält.

A6 MALDI-TOF-MS Peptidmassenfingerprintanalysen

Tabelle A1: Repräsentative Peptidmassenfingerprintanalyse von $OdhI_{Strep}$ (Cg1630) nach *in-vitro*-Phosphorylierung durch (a) $PknA\text{-}KD_{His}$ und (b) $PknL\text{-}KD_{His}$. Die Δppm-Werte geben die Abweichung der experimentell bestimmten zu den berechneten monoisotopischen Massen an.

Nr.	Protein (*Gen*)				Sequenz-abdeckung
	m/z	Δppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
(a)	**OdhI (*odhI*)**				**84 %**
	1977,9523	19	2-19	M.SDNNGTPEPQVETTSVFR.A	
	2057,9167	17	2-19	M.SDNNGTPEPQVETTSVFR.A	Phospho (ST)
	2704,3740	15	25-52	K.EMESSTGTAPASTGAENLPAGSALLVVK.R	Oxidation (M)
	2860,5069	25	25-53	K.EMESSTGTAPASTGAENLPAGSALLVVKR.G	Oxidation (M)
	1319,7284	25	61-72	R.FLLDQPTTTAGR.H	
	3030,6022	28	61-87	R.FLLDQPTTTAGRHPESDIFLDDVTVSR.R	
	1729,8795	23	73-87	R.HPESDIFLDDVTVSR.R	
	1885,9827	23	73-88	R.HPESDIFLDDVTVSRR.H	
	2311,1715	22	94-114	R.INEGEFEVVDVGSLNGTYVNR.E	
	2693,3825	24	94-117	R.INEGEFEVVDVGSLNGTYVNREPR.N	
	1647,8305	18	118-132	R.NAQVMQTGDEIQIGK.F	Oxidation (M)
	1935,0190	23	118-134	R.NAQVMQTGDEIQIGKFR.L	
	1951,0098	20	118-134	R.NAQVMQTGDEIQIGKFR.L	Oxidation (M)
(b)	**OdhI (*odhI*)**				**84 %**
	1977,9458	16	2-19	M.SDNNGTPEPQVETTSVFR.A	
	2057,9138	16	2-19	M.SDNNGTPEPQVETTSVFR.A	Phospho (ST)
	2704,3115	-9	25-52	K.EMESSTGTAPASTGAENLPAGSALLVVK.R	Oxidation (M)
	2860,4863	18	25-53	K.EMESSTGTAPASTGAENLPAGSALLVVKR.G	Oxidation (M)
	1319,7204	19	61-72	R.FLLDQPTTTAGR.H	
	1729,8718	19	73-87	R.HPESDIFLDDVTVSR.R	
	1885,9750	18	73-88	R.HPESDIFLDDVTVSRR.H	
	2311,1657	20	94-114	R.INEGEFEVVDVGSLNGTYVNR.E	
	2693,3786	23	94-117	R.INEGEFEVVDVGSLNGTYVNREPR.N	
	1647,8255	15	118-132	R.NAQVMQTGDEIQIGK.F	Oxidation (M)
	1935,0063	16	118-134	R.NAQVMQTGDEIQIGKFR.L	
	1951,0001	15	118-134	R.NAQVMQTGDEIQIGKFR.L	Oxidation (M)

Tabelle A2: Repräsentative Peptidmassenfingerprintanalyse von $FtsZ_{His}$ (Cg2366) nach *in-vitro*-Phosphorylierung durch (a) PknA-KD_{His} und (b) PknL-KD_{His}. Die Δppm-Werte geben die Abweichung der experimentell bestimmten zu den berechneten monoisotopischen Massen an.

Nr.	Protein (*Gen*)				Sequenz-abdeckung
	m/z	Δppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
(a)	**FtsZ (*ftsZ*)**				**35 %**
	1254,6504	-33	13-26	K.VVGVGGGGVNAVNR.M	
	1097,5435	-24	65-76	R.GLGAGANPEVGR.A	
	2716,9704	-60	92-119	K.GADMVFVTAGEGGGTGTGAAPVVAGIAK.K	Oxidation (M) 3 Phospho (ST)
	2096,0362	-40	120-138	K.KMGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M)
	1967,9508	-38	121-138	K.MGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M)
	2047,9026	-44	121-138	K.MGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M) Phospho (ST)
	1220,6312	-26	305-316	R.VTVIATGFDAAR.A	
	2842,4129	-33	324-351	R.RAGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEK.E	
	2686,2933	-41	325-351	R.AGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEK.E	
	3503,7192	-27	325-359	R.AGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEKESIFGGAR.E	
	3583,6897	-25	325-359	R.AGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEKESIFGGAR.E	Phospho (ST)
	1939,8408	-38	352-368	K.ESIFGGAREENDPYLSR.S	
	1122,4787	-25	360-368	R.EENDPYLSR.S	
	1615,6845	-38	381-395	R.SGGGLFTTGNDRDYR.R	
	1591,6653	-37	429-442	R.DDRGDDLDVPSFLQ.-	
(b)	**FtsZ (*ftsZ*)**				**45 %**
	1254,6779	-11	13-26	K.VVGVGGGGVNAVNR.M	
	1097,5710	1	65-76	R.GLGAGANPEVGR.A	
	2477,1885	-18	92-119	K.GADMVFVTAGEGGGTGTGAAPVVAGIAK.K	Oxidation (M)
	2096,0882	-16	120-138	K.KMGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M)
	2176,0546	-15	120-138	K.KMGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M) Phospho (ST)
	1967,9981	-14	121-138	K.MGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M)
	2047,9765	-8	121-138	K.MGALTIGVVTKPFEFEGR.R	Oxidation (M) Phospho (ST)
	1807,8988	-15	166-181	R.LLELGDANLSIMEAFR.A	Oxidation (M)
	2734,2841	-12	281-304	R.ERSDEDVNLIFGTIIDDNLGDEVR.V	
	2449,1383	-14	283-304	R.SDEDVNLIFGTIIDDNLGDEVR.V	
	1220,6630	-0	305-316	R.VTVIATGFDAAR.A	
	2842,4554	-18	324-351	R.RAGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEK.E	
	2686,3608	-16	325-351	R.AGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEK.E	
	3503,7977	-4	325-359	R.AGISAAPAAEPVQQQVPTTNATLPPEKESIFGGAR.E	
	1939,8838	-16	352-368	K.ESIFGGAREENDPYLSR.S	
	1122,5080	2	360-368	R.EENDPYLSR.S	
	1181,5509	-3	381-392	R.SGGGLFTTGNDR.D	
	1615,7252	-13	381-395	R.SGGGLFTTGNDRDYR.R	
	1695,6802	-19	381-395	R.SGGGLFTTGNDRDYR.R	Phospho (ST)
	1591,7015	-14	429-442	R.DDRGDDLDVPSFLQ.-	

Tabelle A3: Peptidmassenfingerprintanalyse von (a) Cg2444 (hypothetisches Protein), (b) Cg0802 (AccBC) und (c) Cg0766 (Icd). Die Δppm-Werte geben die Abweichung der experimentell bestimmten zu den berechneten monoisotopischen Massen an.

Nr.	Protein (*Gen*)				Sequenz-abdeckung
	m/z	Δppm	Position	zugeordnetes Peptid	Modifikation
(a)	**Hyp.Protein (*cg2444*)**				**35 %**
	2142,9557	27	92-109	R.EDGPIYADDLIDEDEDYR.A	
	2571,2145	30	92-113	R.EDGPIYADDLIDEDEDYRAQTK.S	
	1429,7390	8	114-125	K.SQINDEVINEIR.D	
	1178,5698	0	148-158	R.YGDFGGPRGPR.G	
	1681,8042	17	162-177	R.NDGPFGPFGPFGPGYR.G	
	1992,0027	26	162-180	R.NDGPFGPFGPFGPGYRGPR.F	
(b)	**AccBC (*cg0802*)**				**20 %**
	1013,4844	-160	8-16	K.ITKVLVANR.G	
	1310,7703	-15	11-22	K.VLVANRGEIAIR.V	
	1700,8449	-2	244-258	K.LVEEAPAPFLTDDQR.E	
	1986,0061	7	244-260	K.LVEEAPAPFLTDDQRER.L	
	2036,0780	6	299-316	R.LQVEHPVTEETTGIDLVR.E	
	1761,9100	-2	321-336	R.IAEGHELSIKEDPAPR.G	
	1604,7286	-5	344-359	R.INGEDAGSNFMPAPGK.I	
	1459,7585	-5	360-372	K.ITSYREPQGPGVR.M	
	959,5161	-15	394-401	K.LIVWGDTR.E	
	1821,0325	5	487-505	R.RVEVALPGDLALGGTAGPK.K	
(e)	**Icd (*icd*)**				**40 %**
	3162,8538	62	9-38	R.TDEAPLLATYSLKPVVEAFAATAGIEVETR.D	
	973,5514	5	46-53	R.ILAQFPER.L	
	1649,8530	-86	81-96	K.LPNISASVPQLKAAIK.E	
	3088,6281	55	97-123	K.ELQDQGYDIPELPDNATTDEEKDILAR.Y	
	912,5258	0	129-137	K.GSAVNPVLR.E	
	1723,8998	155	156-168	K.FPHRMGEWSADSK.T	Oxidation (M) 2 Phospho (ST)
	1345,7755	21	229-240	K.ALDAFLLEQVAR.A	
	1338,7798	20	259-270	K.VSDPIIFGHVVR.A	
	2336,3278	50	333-354	R.GITNLHVPSDVIVDASMPAMIR.T	
	2352,3160	47	333-354	R.GITNLHVPSDVIVDASMPAMIR.T	Oxidation (M)
	3178,7439	56	425-453	R.IEADGVVQVVSSNGDVLIEHDVEANDIWR.A	
	1617,8634	33	475-488	R.LSGMPAVFWLDPER.A	
	1633,8526	30	475-488	R.LSGMPAVFWLDPER.A	Oxidation (M)
	2097,1164	40	475-492	R.LSGMPAVFWLDPERAHDR.N	
	1516,8186	7	530-543	R.RGEDTISVTGNVLR.D	
	1756,9133	118	530-543	R.RGEDTISVTGNVLR.D	3 Phospho (ST)
	1897,0309	38	544-560	R.DYNTDLFPILELGTSAK.M	
	2247,2587	48	561-584	K.MLSVVPLMAGGGLFETGAGGSAPK.H	
	1740,9311	41	597-611	R.WDSLGEFLALAESFR.H	
	1919,0074	95	647-661	K.VGEIDNRGSHFWLTK.F	2 Phospho (ST)
	2172,2700	39	719-737	K.LTNIMRPVAQFNEIVDALK.K	
	2300,3851	46	719-738	K.LTNIMRPVAQFNEIVDALKK.-	
	2316,3768	44	719-738	K.LTNIMRPVAQFNEIVDALKK.-	Oxidation (M)

A7 2-D-Gele

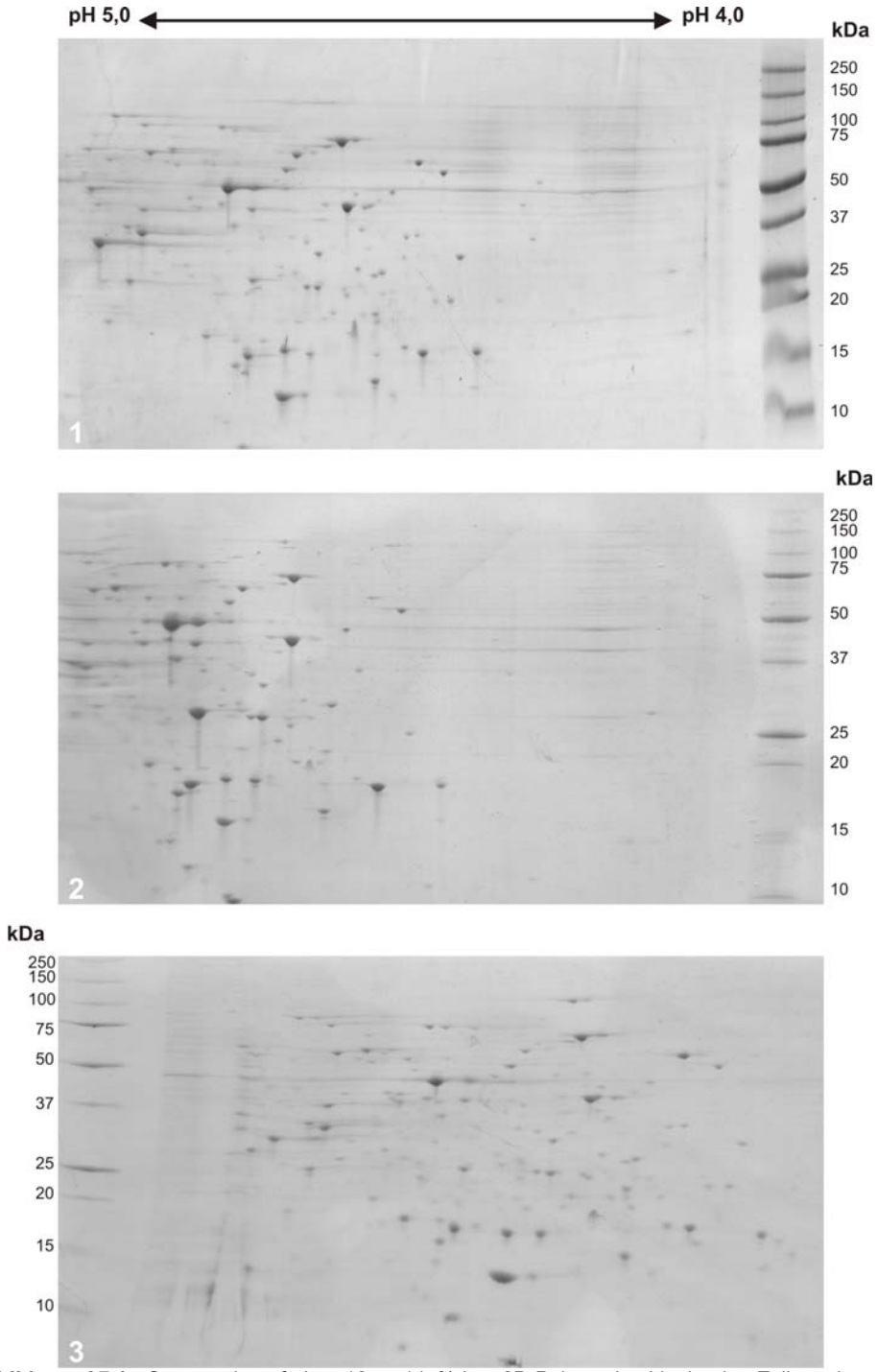


Abbildung A7.1: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

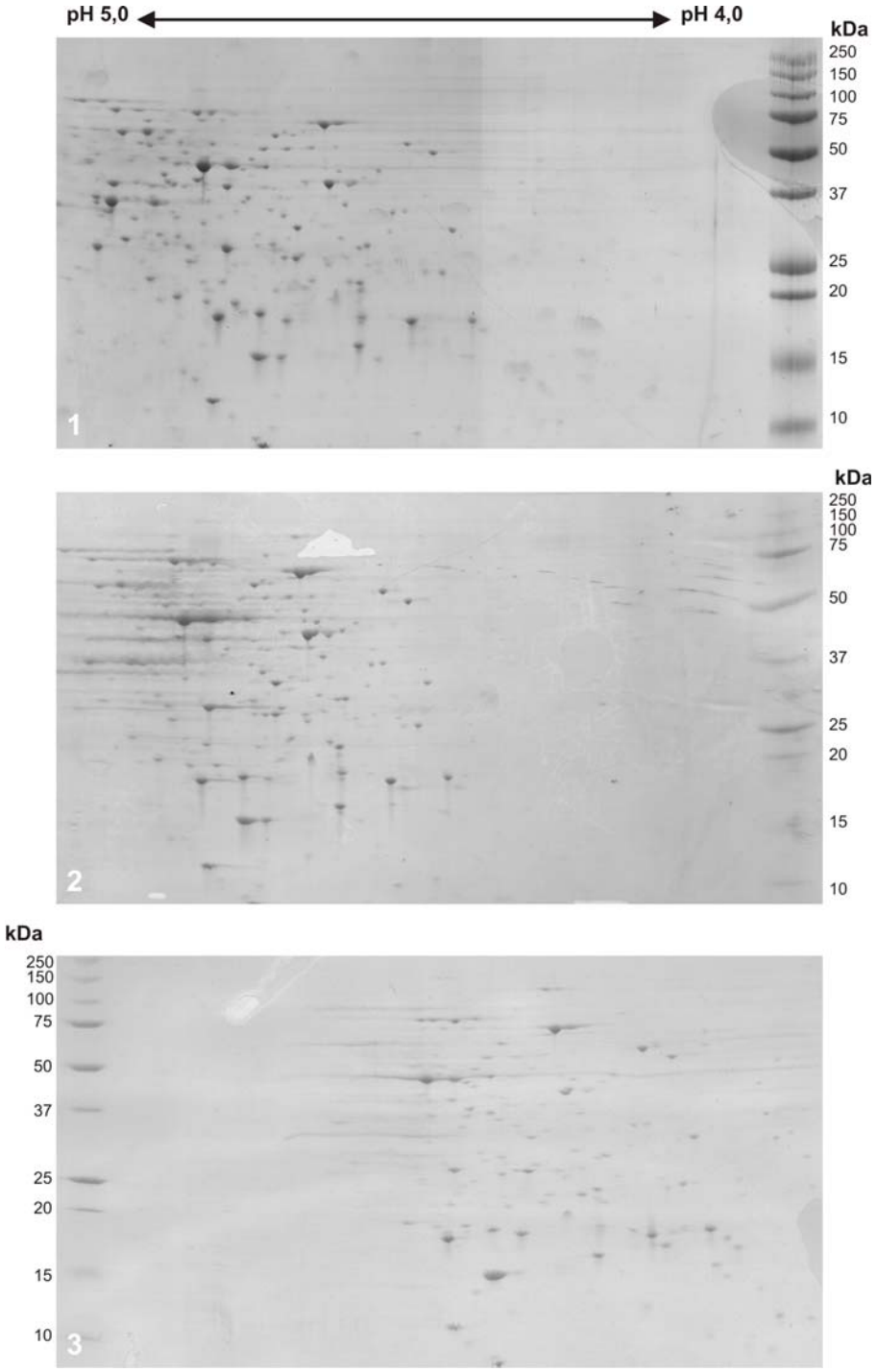


Abbildung A7.2: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*ppp* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

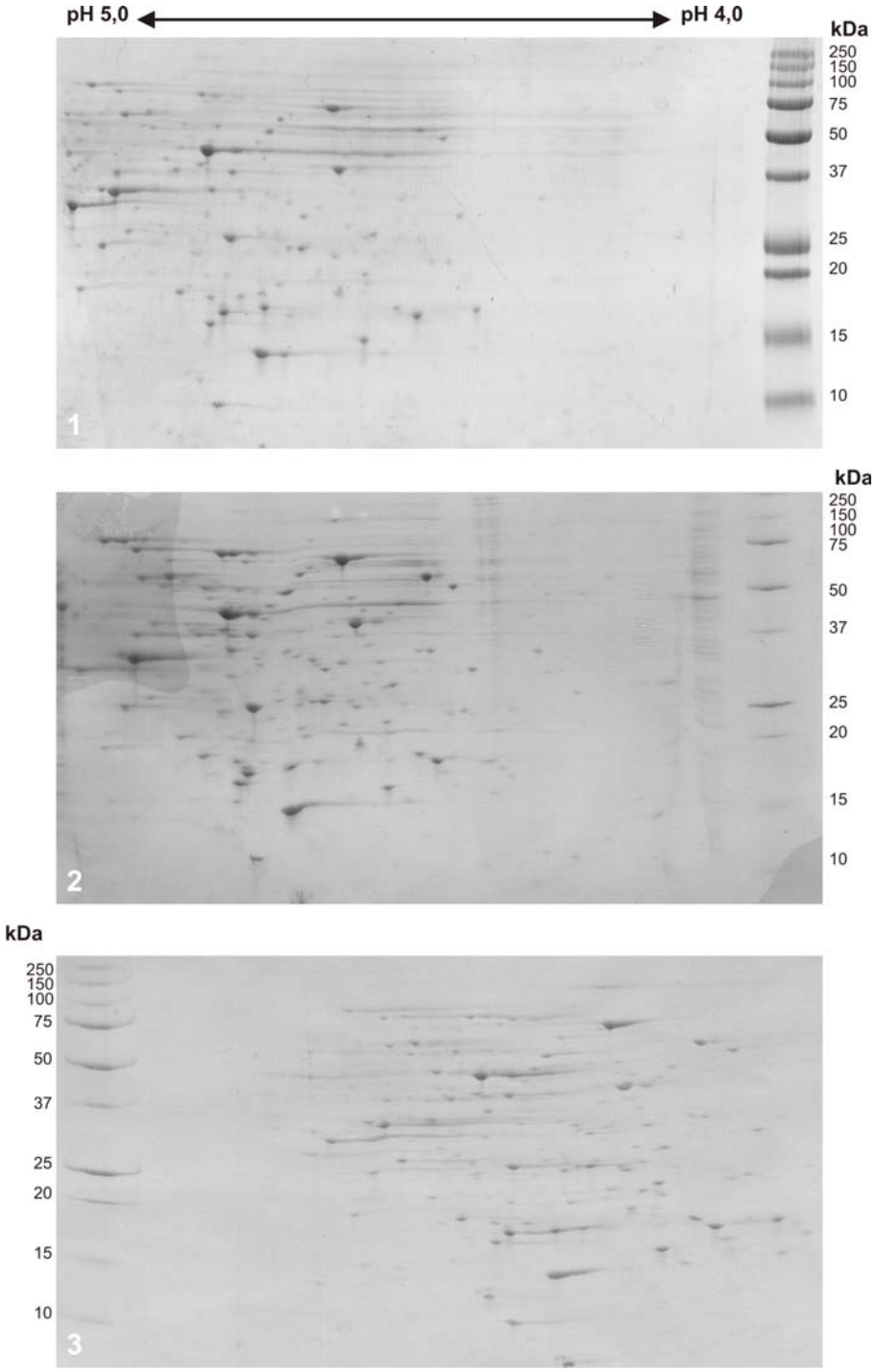


Abbildung A7.3: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*pknG* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

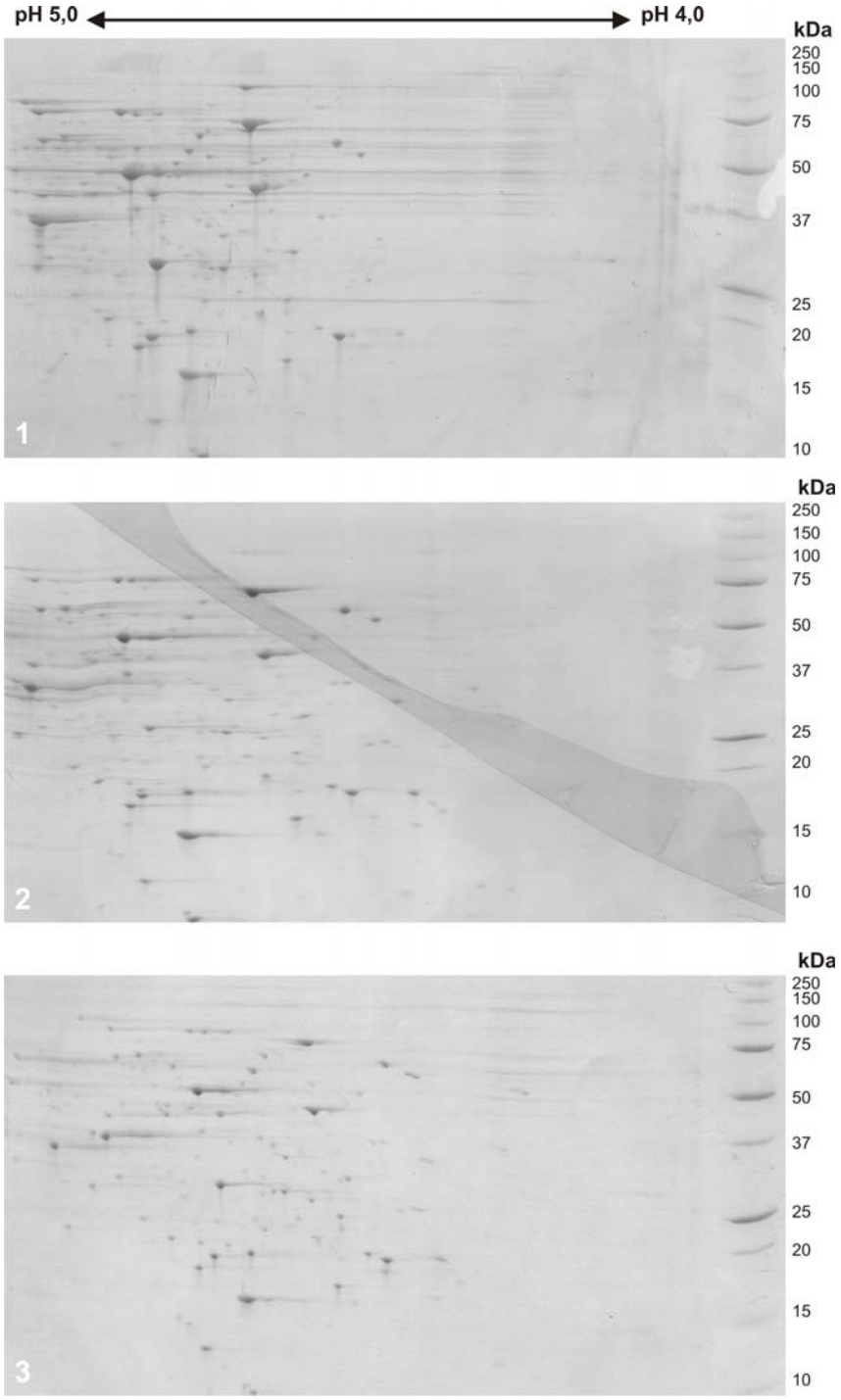


Abbildung A7.4: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*pknA*Δ*pknG* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

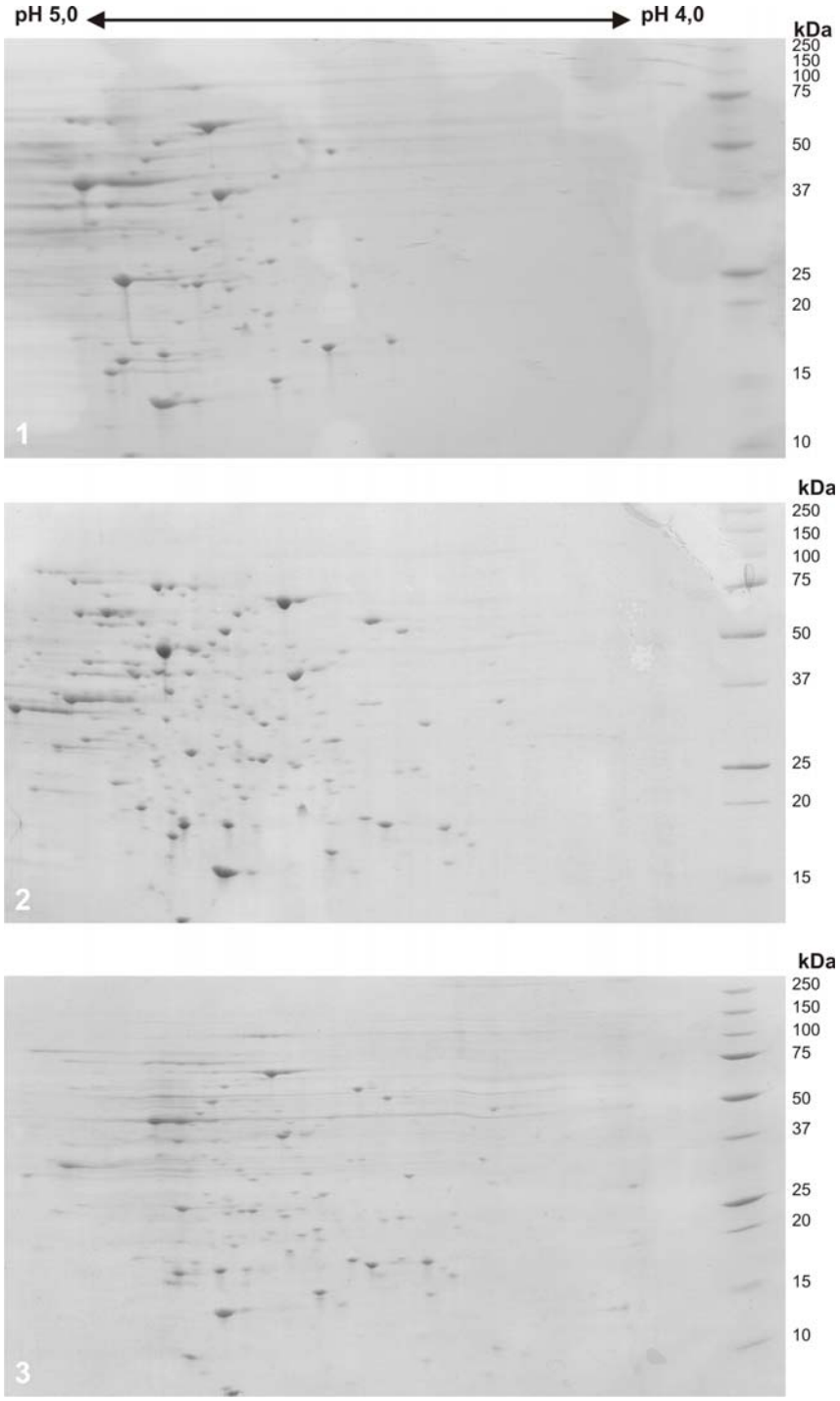


Abbildung A7.5: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*pknB*Δ*pknG* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

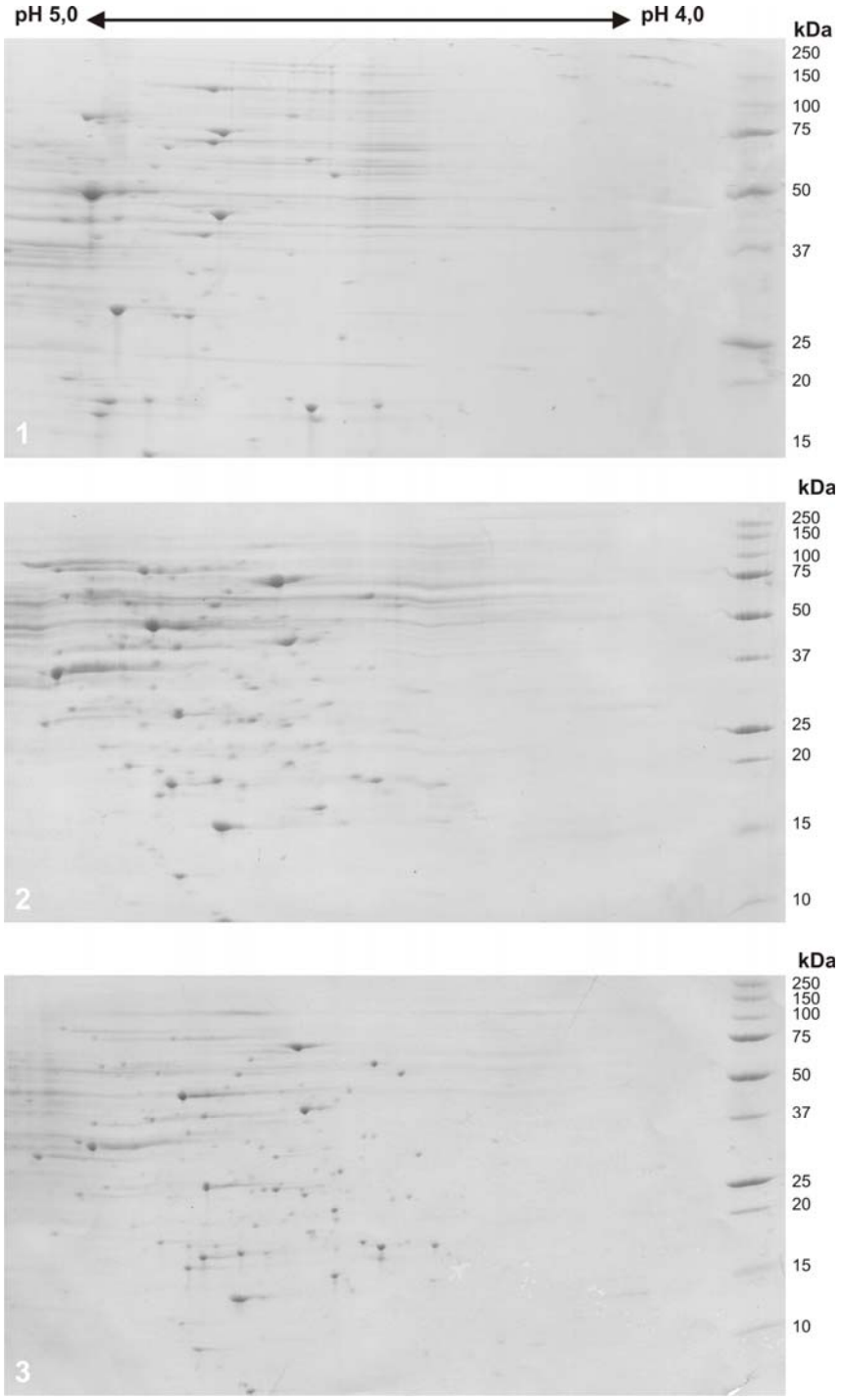


Abbildung A7.6: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*pknL*Δ*pknG* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

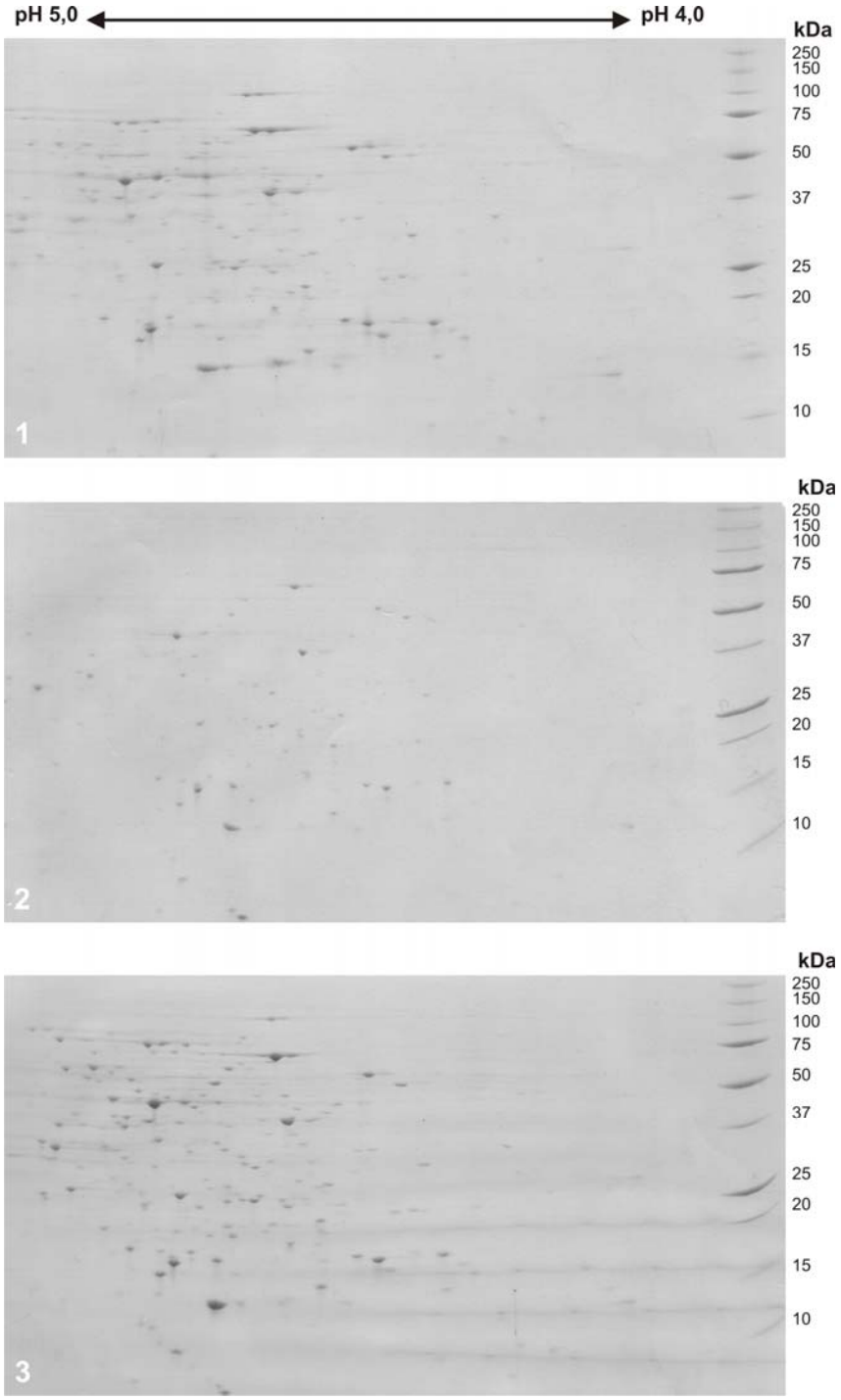


Abbildung A7.7: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*pknA*Δ*pknL*Δ*pknG* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

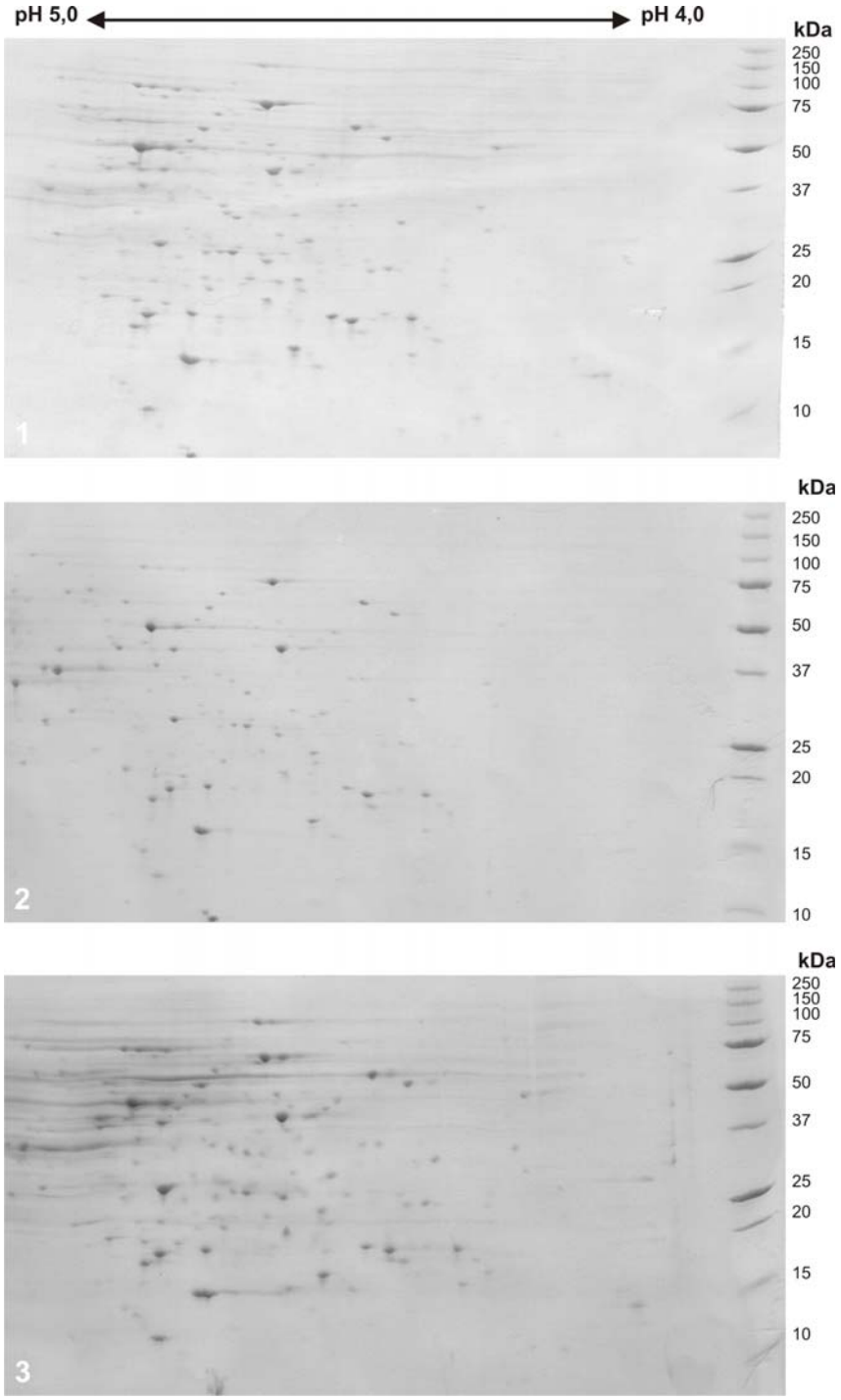


Abbildung A7.8: Coomassie-gefärbte 12 – 14 %-ige 2D-Polyacrylamidgele der Zellextrakte von *C. glutamicum* ATCC 13032 Δ*pknB*Δ*pknL*Δ*pknG* aus drei unabhängigen Experimenten (1, 2, 3) in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0.

Danksagungen

Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, der erstklassigen Betreuung, dem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie der kritischen Durchsicht dieses Manuskripts.

Bei Prof. Dr. Joachim Ernst möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Bei Prof. Dr. Hermann Sahm bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am IBT1 und seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Axel Niebisch, der diese Arbeit mit seinen hervorragenden initialen Arbeiten erst ermöglicht hat und mir in der Anfangszeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Dr. Marc Bramkamp und Astrid Schwaiger möchte ich mich für die ausgesprochen nette Kooperation, Diskussionsbereitschaft und Hilfe bedanken.

Dr. Sabine Metzger möchte ich dafür danken, dass Sie mir mit Ihren massenspektrometrischen Analysen am Ende meiner Arbeit weitergeholfen hat.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern meiner Arbeitgruppe Meike Baumgart, Graziella Bosco, Melanie Brocker, Michael Bußmann, Verena Engels, Sabine Enns, Julia Frunzke, Lena Gebel, Tobias Georgi, Sonja Hasenbein, Armin Kabus, Abigail Koch-Koerfges, Sabine Krawczyk, Andreas Krug, Steffen Lindner, Boris Litsanov, Christina Mack, Tino Polen, Sarah Schaaf, Stephanie Schelder, Jens Schweitzer, Brita Weil, Han Min Woo und Daniela Zaade bedanke ich mich vor allem für die gemeinsame Zeit im Labor, im Büro und auch mal außerhalb.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen am IBT1, insbesondere den Arbeitsgruppen Eggeling, Freudl und Bringer-Meyer für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern danke ich für die unbezahlbare oder auch manchmal bezahlbare Unterstützung vor und während meines Studiums. Auf Euch kann ich immer zählen. Tausend Dank.

Weiterer Dank geht an meine Freunde, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Christiane, die mich in guten wie in schlechteren Zeiten liebevoll unterstützt hat, stets an mich geglaubt hat, mich immer wieder ermuntert hat und mir meinen Goldschatz Leonie Annabell geschenkt hat.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
   von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-506-7

2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
   von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-510-4

3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
   von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-511-1

4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***
   von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-512-8

5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**
   von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-519-7

6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
   von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-520-3

7. **Visuospatial Attention:** Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect
   by S. Vossel (2008), XIV, 176 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-526-5

8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
   von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-528-9

9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
   von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
   ISBN: 978-3-89336-539-5

10.**Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9



Band | Volume 10
ISBN 978-3-89336-560-9

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM