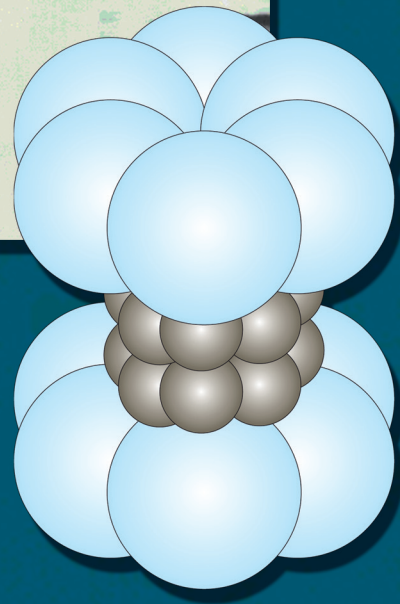
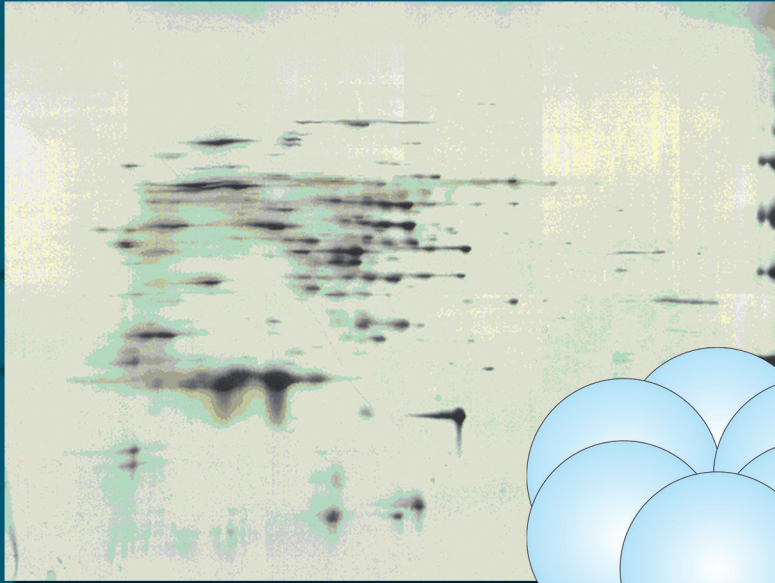




Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum*

Jens-Eric Schweitzer

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1)

Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum*

Jens-Eric Schweitzer

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 8

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-528-9

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 2008

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 8

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2007)

ISSN 1866-1785
ISBN: 978-3-89336-528-9

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.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	5
2.1 Aufbau ATP-abhängiger Proteasen.....	5
2.2 Aufbau und Domänenstruktur von Clp-Proteasen	6
2.3 Funktion der Clp-Protease	8
2.4 Substraterkennung und Adaptoren von Clp-Proteasen	9
2.5 ATP-abhängige Proteolyse in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
2.6 Ziele der Arbeit	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Chemikalien und Enzyme	16
3.2 Stammlösungen	16
3.3 Bakterienstämme und Plasmide.....	17
3.3.1 Bakterienstämme.....	17
3.3.2 Plasmide	18
3.4 Oligonukleotide	20
3.5 Nährmedien	22
3.6 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien.....	23
3.6.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	23
3.6.2 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> -Stämmen	23
3.6.3 Stammhaltung von Bakterien	23
3.6.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen	24
3.7 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.7.1 Isolierung von DNA.....	24
3.7.1.1 Plasmid-Isolierung	24
3.7.1.2 Isolierung chromosomaler DNA.....	24
3.7.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	25
3.7.2 Reinigung und Konzentration von DNA.....	25
3.7.2.1 Reinigung von PCR-Produkten.....	25
3.7.2.2 Konzentration von DNA-Lösungen mit Mikrokonzentratoren	25
3.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	25
3.8 Rekombinante DNA-Techniken.....	26
3.8.1 Restriktion.....	26

3.8.2	5'-Dephosphorylierung von linearer Plasmid-DNA	26
3.8.3	Ligation.....	26
3.8.4	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.9	Klonierungsexperimente	28
3.9.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode	28
3.9.2	Herstellung elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	28
3.9.3	Transformation Rubidiumchlorid-kompeter <i>E. coli</i> -Zellen.....	29
3.9.4	Elektroporation elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> -Zellen.....	29
3.9.5	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR) ...	30
3.9.6	Kolonie-PCR	31
3.9.7	Konstruktion von Deletionsmutanten	31
3.9.8	Ortsgerichtete Mutagenese.....	32
3.9.9	DNA-Sequenzanalyse.....	34
3.10	Biochemische Methoden.....	34
3.10.1	Zellaufschluss von <i>C. glutamicum</i> mit Glasperlen	34
3.10.2	Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle.....	35
3.10.3	Reinigung von Proteinen mit StrepTag-II.....	35
3.10.4	Entfernung von ClpP-ST aus dem Eluat der StrepTactin-Affinitätschromatographie	36
3.10.5	Konzentration von Proteinen.....	36
3.10.6	Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	36
3.10.7	N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen	37
3.10.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.10.9	Western-Blot	37
3.10.10	Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen.....	38
3.10.11	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau	39
3.10.12	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen	39
3.10.13	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	40
3.10.14	MALDI-ToF Massenspektrometrie	41
4	Ergebnisse.....	43
4.1	„Fangen“ von Clp-Protease-Substraten <i>in vivo</i>	43
4.1.1	Konstruktion der Substratfallenstämme	44
4.1.1.1	Deletion der Gene <i>smpB</i> , <i>clpE</i> und <i>clpX</i> in dem Stamm <i>C. glutamicum</i> P_{tetA} - <i>clpP1P2</i>	45
4.1.1.2	Gerichtete Mutagenese von <i>clpP1</i> und <i>clpP2</i>	46
4.1.1.3	Konstruktion von ClpCP1 ^{TRAP} und ClpCP2 ^{TRAP}	48
4.1.2	Co-Reinigung von Substraten mit ClpP	49
4.1.3	Kontrollen zur Spezifität der Co-Reinigung.....	53

4.1.3.1	Versuche zur Konstruktion eines Stammes mit Deletionen von <i>clpC</i> , <i>clpE</i> und <i>clpX</i>	53
4.1.3.2	Versuche zur Reinigung von aktivem ClpP1 und ClpP2	54
4.1.3.3	Reinigung von ClpP1 mit einem N-terminalen StrepTag-II.....	57
4.1.3.4	Reinigung der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	59
4.2	Identifizierung von potentiellen Substraten der ClpCP-Protease	62
4.3	Ableitung und Überprüfung von Erkennungsmotiven	68
4.3.1	Ableitung der Sequenzmotive.....	68
4.3.2	Überprüfung der Relevanz der abgeleiteten Motive.....	70
4.3.3	Einfluss des N-Terminus von ClgR auf dessen Stabilität.....	75
4.4	Bioinformatische Auswertung möglicher Substrate der ClpXP-Protease	76
5	Diskussion.....	79
5.1	Identifizierung von potentiellen Substraten der ClpCP-Protease	79
5.1.1	Co-Reinigung von potentiellen Substraten mit inaktivem ClpP1 und ClpP2	79
5.1.2	Kontrollen zur Spezifität der Co-Reinigung	80
5.1.3	Identifizierung der mit ClpP1 bzw. ClpP2 co-gereinigten Proteine.....	82
5.2	Ableitung und Überprüfung potentieller Erkennungsmotive von ClpC	83
5.3	ClpCP-abhängige Degradation der putativen Substrate	84
5.4	ClgR – ein konditionales Substrat der ClpCP-Protease.....	90
5.5	Potentielle Substrate der <i>C. glutamicum</i> ClpXP-Protease	92
5.6	Ausblick	93
6	Literatur	95
7	Anhang.....	110

Abkürzungen

Ø	Aminosäure mit hydrophober Seitenkette
2D	zweidimensional
A	Adenin, Ampere
Å	Angström
abs.	absolut
ATC	Anhydrotetracyclin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHAPS	3-(3-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-1-propansulfonat
Δ	Delta
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
d/ddATP	Desoxy-/Didesoxy-Adenosin-5'-triphosphat
d/ddCTP	Desoxy-/Didesoxy-Cytidin-5'-triphosphat
d/ddGTP	Desoxy-/Didesoxy-Guanosin-5'-triphosphat
d/ddTTP	Desoxy-/Didesoxy-Thymidin-5'-triphosphat
DFP	Diisopropylmonofluorophosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
et al.	und andere
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	(-fache) Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
gr.	groß(e, es)
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
k	Kilo- (10 ³)
kb	Kilobasenpaare
kl.	klein(e, es)
l	Liter
m	milli- (10 ⁻³)
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
M	molar (mol/l)
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
n	nano- (10 ⁻⁹)
N	jede Nukleinsäure
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
Ω	Ohm
Orf	offener Leserahmen
p	pico- (10 ⁻¹²)

p.A.	pro Analyse
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
ppm	Teilchen pro Million
R	Purin (Adenin oder Guanin)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
S	Svedberg, (Cytosin oder Guanin)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte (r, n)
spec.	Spezies
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur der DNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt, (Adenin oder Thymin)
w/v	Gewicht pro Volumen
X	jede Aminosäure
Y	Pyrimidin (Cytosin oder Thymin)
z. B.	zum Beispiel

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

1 Zusammenfassung

Der konditionale Abbau von Proteinen durch ATP-abhängige Proteasen ist ein wichtiges regulatorisches Prinzip. Mit ClgR, dem Transkriptionsregulator von Genen, die an der Proteolyse und der DNA-Reparatur beteiligt sind, und GlnK, dem P_{II}-Typ-Regulator der Stickstoffmangel-Antwort, sind bereits zwei Substrate der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum* bekannt. Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung weiterer Substrate von ClpCP und die Bestimmung von Sequenzmotiven innerhalb dieser Substrate, die für eine Erkennung durch ClpC wichtig sind. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. Zur Co-Reinigung von Substraten mit inaktiven ClpP-Derivaten, bei denen der katalytisch aktive Serin-Rest durch einen Glycin-Rest ersetzt worden war und die einen C-terminalen StrepTag-II trugen, wurden die beiden so genannten Substratfallenstämme ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} konstruiert. StrepTactin-Affinitätschromatographie von Extrakten dieser Stämme führte zur Co-Reinigung von 61 Proteinen mit ClpP1*-ST bzw. ClpP2*-ST, von denen 14 in mindestens fünf der zehn Reinigungen mit inaktivem ClpP1 und ClpP2 auftraten. Die Proteine konnten in unterschiedliche Funktionsklassen wie Translation, Chaperone, Aminosäuremetabolismus und Energiemetabolismus eingruppiert werden. Eine Co-Reinigung war auch mit ClpP-Derivaten möglich, die den Serin-Glycin-Austausch nicht besaßen, was auf eine Inaktivierung dieser Derivate bereits durch den C-terminalen StrepTag-II hindeutet.
2. Kontrollexperimente unterstützten eine Spezifität der Co-Reinigung dieser Proteine für ClpP1 und ClpP2. Die plasmid-kodierte E1-Untereinheit des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (OdhA) mit C-terminalem StrepTag-II wurde ohne Co-Reinigung weiterer Proteine aus demselben Stammhintergrund isoliert wie ClpP1*-ST oder ClpP2*-ST. Eine Co-Reinigung von Proteinen mit prozessiertem ClpP1, das ein N-terminales StrepTag-II trägt, war ebenfalls nicht möglich.
3. Aus den mit ClpP co-gereinigten Proteinen wurden 10 N-terminale und 10 C-terminale putative ClpC-Erkennungssequenzen abgeleitet. Durch Bestimmung der Halbwertszeit von Fusionsproteinen mit den 10 N-terminalen Sequenzmotiven konnten acht Motive bestimmt werden, die in Anwesenheit von ClpC einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Fusionsproteine hatten. Diese Motive könnten also Erkennungssequenzen von ClpC darstellen.

Abstract

Conditional degradation of proteins by ATP-dependent proteases is an important regulatory principle. Analyses on ClgR, the transcriptional regulator of genes involved in proteolysis and DNA repair, and GlnK, a P_{II}-type signal transduction regulatory protein of Nitrogen starvation, revealed that these proteins are substrates of the *Corynebacterium glutamicum* ClpCP-protease. Aim of this work was to identify further substrates of ClpCP and to determine how ClpC can recognise these substrates. The following results were achieved answering these questions:

1. Strains for the co-purification of substrates with inactive ClpP-derivatives harbouring a mutation of the catalytic active serine to glycine and a C-terminal StrepTag-II were successfully constructed and named ClpCP1^{TRAP} and ClpCP2^{TRAP}. StrepTactin affinity chromatography of extracts of ClpCP1^{TRAP} and ClpCP2^{TRAP} led to the co-purification of 61 proteins, of which 14 occurred at least in five of ten purifications of inactive ClpP1 and ClpP2. These putative substrates could be subdivided into different functional classes like translation, chaperones, amino acid metabolism and energy metabolism. Co-purification was also possible with ClpP derivatives lacking the Ser-Gly mutation suggesting an inactivation of these derivatives by the C-terminal StrepTag-II.
2. Control experiments were made to support the specificity of the co-purification for ClpP1 and ClpP2. Purification of the plasmid encoded E1-subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (OdhA) with a C-terminal StrepTag-II in the same genetic background as purification of ClpP1*-ST or ClpP2*-ST revealed no co-purification of other proteins. Co-purification of proteins with a processed ClpP1 derivative containing an N-terminal StrepTag-II was not possible, too.
3. Investigation on the termini of the co-purified proteins showed 10 N-terminal and 10 C-terminal putative recognition motives for ClpC. Determination of the half-life of protein fusions with the 10 N-terminal sequence motives showed that eight motives had a negative influence on the stability of the protein fusions. These motives might exhibit ClpC recognition sites.

2 Einleitung

2.1 Aufbau ATP-abhängiger Proteasen

Zellen schützen sich vor unkontrollierter Aggregation fehlgefalteter oder inaktiver Proteine durch Proteolyse. Dabei spielen ATP-abhängige Proteasen eine wichtige Rolle. In Eukaryoten erfolgt die Proteinqualitätskontrolle im Cytosol und im Zellkern vornehmlich durch das Proteasom. Das Proteasom setzt sich aus der 20S proteolytischen Komponente und dem 19S regulierenden Komplex zusammen (Abb. 2.1). Die proteolytische Komponente besteht aus je 14 Untereinheiten des α -Typs (zwei Homoheptamere) und des β -Typs (zwei Homoheptamere), während der regulatorische Komplex aus sechs ATPase- (Basis) und elf Nicht-ATPase-Untereinheiten (Deckel) aufgebaut ist. Zwei 19S und eine 20S Untereinheit bilden das 26S Proteasom. Es erkennt die Zielproteine über Ubiquitin (Ub), ein kleines globuläres Protein von ca. 8 kDa. Ubiquitin wird über das Ub-Aktivierungsenzym E1, das Ub-Trägerprotein E2 und die Ub-Ligase E3 über das C-terminale Glycin an die ϵ -Aminogruppe des Lysins eines Zielproteins angehängt. Weitere Ubiquitinmoleküle werden an das Lysin48 des verknüpften Ubiquitins angehängt (Bochtler et al., 1999; Voges et al., 1999).

Die ATP-abhängige Proteolyse erfolgt in Prokaryoten vornehmlich durch vier Proteasen (Jenal und Hengge-Aronis, 2003; Gottesmann, 2003; Zolkiewski, 2006). Die beiden Vertreter der Serinproteasen sind Clp („caseinolytic protease“, auch Protease Ti genannt) und Lon (Lon-Mutanten bilden „*long cells*“, auch Protease La genannt). Clp-Proteasen setzen sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammen (Abb. 2.1). Die ClpP-Peptidase bildet homoheptamere Ringe, die sich in Kopf-zu-Kopf-Orientierung zum proteolytischen Kern zusammensetzen. ClpP besitzt die für Serinproteasen typische katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat. Der proteolytische Kern besitzt axial kleine Poren und ist in der Lage, kleinere Peptide zu spalten. Für die Degradation vollständiger Proteine wird die Clp-ATPase benötigt. Clp-ATPasen gehören zur AAA+-Superfamilie („ATPase associated with assembly, operating and disassembly of protein complexes“, Dougan et al., 2002b) und bilden hexamere Ringe. Clp-ATPasen sind für die Substraterkennung, ATP-abhängige Entfaltung und Translokation in den proteolytischen Kern zuständig. Die Lon-Protease wird aus einem Homohexamer gebildet. Anders als die weiteren Vertreter der Serinproteasen besitzt Lon nur eine katalytische Diade aus Serin und Lysin (Hwang et al., 1987; Chung et al., 1996 und 1997; Chandu und Nandi, 2004). Die Threonin-Protease HslUV („heat shock locus genes **U** and **V**“, auch ClpYQ genannt) ist ähnlich der Clp-Protease aufgebaut. Wie bei

Clp agiert HslU als ATPase, während HslV den proteolytischen Kern bildet, der jedoch nur aus zwei Homohexameren besteht (Chuang et al., 1993). Die membrangebundene, Zink-abhängige Metalloprotease FtsH („filamentation temperature sensitive locus gene H“) ist als Homohexamer aktiv und kann neben kurzlebigen Proteinen auch missgefaltete Membranproteine abbauen (zusammengefasst in Ito und Akiyama, 2006). Lon und FtsH ist gemein, dass sie nur aus einer Untereinheit aufgebaut sind, deren unterschiedliche Domänen für Substratbindung, ATP-abhängige Entfaltung und Translokation in das proteolytische Zentrum zuständig sind, während dies bei Clp und HslUV unterschiedliche Untereinheiten übernehmen. In den Mitochondrien und Plastiden der Eukaryoten findet man ebenfalls Clp-Proteasen, während Untereinheiten des eukaryotischen Proteasoms sowohl in den *Archaea* als auch in den *Eubacteria* vorhanden sind (Nagy et al., 1998; Voges et al., 1999; Smith et al., 2006).

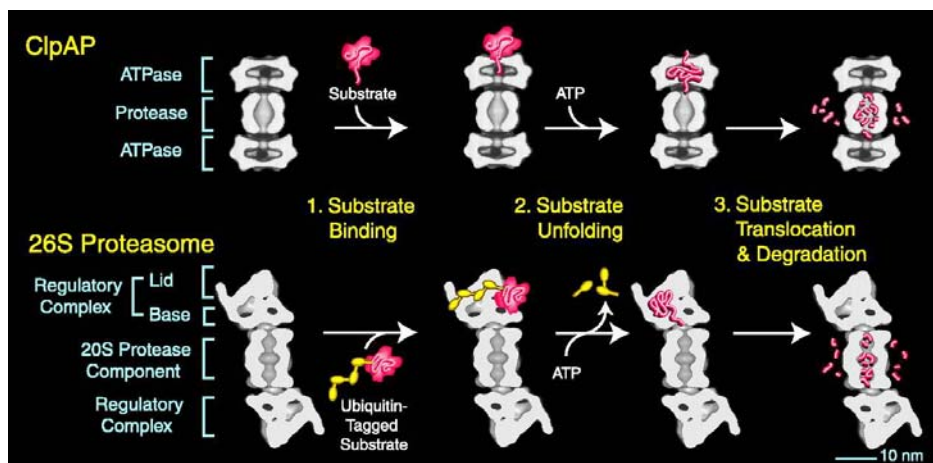


Abbildung 2.1: Modell der ATP-abhängigen Proteolyse durch ClpAP und das 26S-Proteasom (aus Wickner et al., 1999).

2.2 Aufbau und Domänenstruktur von Clp-Proteasen

Clp-Proteasen zeigen alle den prinzipiell gleichen Aufbau und Vertreter aus verschiedenen Organismen sind bereits strukturell aufgeklärt worden, darunter ClpP aus *Escherichia coli* (Wang et al., 1997), *Streptococcus pneumoniae* (Gribun et al., 2005), ClpP1 aus *Mycobacterium tuberculosis* (Ingvarsson et al., 2007) und mitochondriales ClpP des Menschen (Kang et al., 2004), ClpX aus *Helicobacter pylori* (Kim und Kim, 2003) sowie ClpA aus *E. coli* (Guo et al., 2002). Durch die Konzentration von 14 aktiven Zentren im Innern des proteolytischen Kerns kann die Clp-Protease höchst effizient Polypeptide spalten. Der Kern wird durch Clp-Peptidaseuntereinheiten (ClpP) aufgebaut

und ist im Durchmesser 51 Å groß, was die Aufnahme von Proteinen mit einer Masse bis ca. 50 kDa erlaubt. Die axialen Poren haben einen Durchmesser von ca. 10 Å. ClpP alleine hydrolysiert nur Oligopeptide aus bis zu 10 Aminosäuren mit einer Rate von 30 Hydrolysen pro Minute und aktivem Zentrum, wobei die Spaltung bevorzugt hinter Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette erfolgt (Thompson und Maurizi, 1994; Wang et al., 1997). Nach Sprangers et al. (2005) werden die proteolytischen Endprodukte nicht wie bisher angenommen über die distale Pore des Kerns abgegeben, sondern über dynamische Seitenporen, die durch Konformationsänderung des proteolytischen Kerns während der Hydrolyse an den Kontaktflächen der ClpP-Heptamere entstehen. Zur Degradation ganzer Proteine braucht die Clp-Protease eine weitere Untereinheit, die Clp-ATPase. Diese ATPasen werden der Clp/Hsp100-Proteinfamilie zugeordnet und zeichnen sich durch einen ähnlichen Aufbau aus. Sie sind nötig, um Substrate zu erkennen, zu binden, ATP-abhängig zu entfalten und in den proteolytischen Kern zu translozieren. Clp-ATPasen sind wie folgt aufgebaut: An eine N-terminale Region, die vermutlich zur Substraterkennung dient, schließen sich eine (Klasse II-ATPasen wie ClpX oder HslU/ClpY) oder zwei (Klasse I-ATPasen wie ClpA, ClpB, ClpC oder ClpE) ATPase-Domänen an (Hoskins et al., 2002b). In diesen ATPase-Domänen befinden sich die sog. Walker-Boxen A (GX₄GKT) und B (RX₆₋₈Ø₄D), die für die Nukleotidbindung verantwortlich sind (Schirmer et al., 1996). Die Clp-ATPasen oligomerisieren zu homohexameren Ringen und können in dieser Form bereits als isolierte Chaperone agieren. Um aber mit dem proteolytischen Kern zu interagieren, muss ein Sequenzmotiv vorliegen, das ClpP-Loop genannt wird und die Konsensussequenz [ILMPV]-G-[FL] besitzt (Kim et al., 2001). Die Komplexbildung von Clp-ATPase und ClpP erhöht die proteolytische Aktivität auf über 10.000 Spaltungen pro min und Tetradecamer (Grimaud et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Geschwindigkeit der Translokation von Substraten durch Clp-ATPasen bei 400 Aminosäuren pro Minute liegt (Martin et al., 2005; Kenniston et al., 2005). Messungen zum ATP-Verbrauch von Clp-Proteasen ergaben, dass pro translozierter Aminosäure ungefähr ein ATP verbraucht wird. Der Hauptteil der Energie wird aber durch die Entfaltung des Substrates verbraucht. So können je nach Stabilität 20 bis über 500 ATP zur vollen Entfaltung benötigt werden (Kenniston et al., 2003; Baker und Sauer, 2006). Somit wird deutlich, dass die Entfaltung der limitierende und energieaufwendigste Schritt bei der Degradation eines Proteins ist.

2.3 Funktion der Clp-Protease

Clp-Proteasen dienen der Zelle als posttranslationales Proteinqualitätskontrollsystem, um defekte oder aggregierte Proteine abzubauen. Daneben besitzt die Zelle ein weiteres Qualitätskontrollsystem, das Polypeptide beseitigt, die sich aus unvollständiger RNA gebildet haben: das Ribosomen-Rettungssystem (Gottesmann et al., 1998; Karzai et al., 2000). Die durch unvollständige mRNA blockierten Ribosomen werden mit Hilfe einer RNA (tmRNA), die sowohl als Alanin beladene tRNA als auch als mRNA kodierend für den *ssrA*-„Tag“ fungiert, wieder freigegeben. Die Bindung von tmRNA an die Ribosomen wird durch die Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu sowie das Protein SmpB („small protein B“, Karzai et al., 1999) vermittelt. Der *ssrA*-„Tag“ markiert die Polypeptidkette für die Degradation durch Clp-Proteasen und zeichnet sich durch ein C-terminales Ala-Ala-Motiv aus. Die tmRNA ist zwar ubiquitär verbreitet, doch ist der *ssrA*-„Tag“ wenig konserviert. Durch die zunehmende Sequenzierung von Genomen sind aber bereits einige Sequenzen verfügbar (<http://www.indiana.edu/~tmrna/>).

Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel ist der konditionale Abbau von CtsR durch ClpCP in *Bacillus subtilis*. CtsR ist ein Regulator der Hitzeschockgene und reprimiert diese sowie die Gene von ClpC, ClpE und ClpP unter Nicht-Hitzeschock-Bedingungen (Frees et al., 2007). Unter diesen Bedingungen liegen die für die Stabilität von CtsR wichtigen Proteine ClpC, McsA (Aktivatorprotein mit Zink-Finger-Domäne) und McsB (Tyrosinkinase) als Komplex (ohne CtsR) vor (Kirstein und Turgay, 2005; Kirstein et al., 2005). Bei Hitzestress akkumulieren denaturierte Proteine und konkurrieren mit McsA/McsB um die Bindung an ClpC (Kirstein und Turgay, 2005). Wenn McsA/McsB nicht als Komplex mit ClpC vorliegen, wird die Tyrosinkinase McsB McsA-abhängig aktiviert und phosphoryliert sich selbst. Dadurch erhöht sich die Affinität des McsAB-Komplexes für CtsR, was zur Bildung eines neuen Komplexes aus McsA, McsB und CtsR führt, wobei McsB die Proteine McsA und CtsR phosphoryliert. Dadurch kommt es zur Derepression der Hitzeschockgene. Phosphoryliertes CtsR wird schließlich durch ClpCP und ClpEP abgebaut (Kirstein et al., 2005; Miethke et al., 2006).

Dass nicht nur Clp-Proteasen an der konditionalen Proteolyse von Proteinen beteiligt sind, zeigt das Beispiel der Degradation des transmembranen Anti- σ^W -Faktors aus *B. subtilis*. Das σ^W -Regulon umfasst Gene, die unter Stressbedingungen wie pH-Stress, Osmostress oder als Antwort auf Antibiotika induziert werden (Schobel et al., 2004). Die Aktivität des Sigmafaktors wird durch konditionale Proteolyse des Antisigmafaktors RsiW reguliert. RsiW besitzt eine transmembrane Helix und bindet σ^W an der cytosolischen, N-terminalen Region. RsiW wird über eine dreifache proteolytische Kaskade abgebaut. Als Antwort auf einen externen Stimulus wird RsiW von YpdC

gespalten (Site-1-Spaltung). YpdC ist eine membranständige Protease mit fünf Transmembranhelices und einer extracytoplasmatischen proteolytischen Domäne. Durch die Spaltung wird RsiW zu einem Substrat für eine zweite Protease, YluC. YluC ist eine transmembrane Zink-Metalloprotease und spaltet RsiW innerhalb der Transmembranhelix des Antisigmafaktors (Site-2-Spaltung). Dies führt dazu, dass der Antisigmafaktor freigesetzt wird und am neuen C-terminus mindestens zwei Alanine zugänglich werden. Diese terminalen Alanine sind ein Signal für die dritte Degradation von RsiW durch ClpXP und/oder ClpEP, was gleichzeitig zur Freisetzung von σ^W führt (Schobel et al., 2004; Zellmeier et al., 2006; Heinrich und Wiegert, 2006). Diese dreistufige Spaltung ist auch in *E. coli* zu finden. Hier wird der Antisigmafaktor RseA zuerst von DegS, einer periplasmatischen Serin-Endoproteinase, an der periplasmatischen Seite gespalten und dann an der cytosolischen Seite von der RIP-Protease RseP („regulated intramembrane proteolysis“) gespalten. Dies erzeugt wiederum ein C-terminales Ala-Ala-Motiv, das von ClpXP erkannt wird (Flynn et al., 2004; Chaba et al., 2007).

2.4 Substraterkennung und Adaptoren von Clp-Proteasen

Das Markieren von Polypeptidketten während der unvollständigen Translation durch die tmRNA erzeugt ein sehr effizientes Proteolysesignal. Wie aber erkennen die Clp-Proteasen dieses Signal? Bei aggregierten oder fehlgefalteten Proteinen sind hydrophobe Bereiche exponiert, die durch Chaperone bzw. die ATPase-Untereinheit der Proteasen erkannt werden. Für diese Erkennung ist der Zugang der ATPase zu diesen exponierten Bereichen entscheidend; weitere Erkennungsmotive sind an den Termini der Substrate zu finden. Bereits eine N-terminale Aminosäure kann die Degradation eines Proteins beeinflussen. Diese N-Endregel („N-end rule“; Bachmair et al., 1986; Tobias et al., 1991) ist ein allgemeines Prinzip und auch in Eukaryoten zu finden (Mogk et al., 2007). Bei dieser Regel werden stabilisierende und destabilisierende Aminosäuren unterschieden, wobei Arginin oder Lysin an zweiter Stelle besonders destabilisierend sind (Varshavsky, 1996 und 2003).

Erstmals gelang es Flynn et al. (2003) das Substratspektrum der *E. coli* ClpXP-Protease zu bestimmen und durch Sequenzanalyse der Substrate fünf Sequenzmotive abzuleiten, die durch ClpX erkannt werden. Dabei wurden Substratfallenstämme konstruiert, die ein Fangen der Substrate *in vivo* erlaubten. Durch Einsatz eines inaktiven ClpP-Derivats, bei dem Serin-97 zu Alanin mutiert wurde, konnten Substrate im proteolytischen Kern gefangen und mit ClpP co-gereinigt werden. Insgesamt konnten 61 Proteine identifiziert werden, darunter Transkriptionsfaktoren, ribosomale Proteine oder

Enzyme des Zitronensäurezyklus (Aconitase, Malatsynthase). Aus den N- und C-terminalen Bereichen dieser Substrate wurden fünf Sequenzmotive abgeleitet, die wichtig für einen ClpX-abhängigen Abbau sind. Die drei N-terminalen Motive zeichnen sich vor allem durch hydrophobe Aminosäuren aus: N-Motiv 1 besitzt die Konsensussequenz polar-T/Ø-Ø-basisch-Ø, N-Motiv 2 die Konsensussequenz NH₂-M-basisch-Ø-Ø-Ø-X₅-Ø und N-Motiv 3 die Konsensussequenz Ø-X-polar-X-polar-basisch-polar. Die beiden C-terminalen Motive haben große Ähnlichkeit zu bereits bekannten ClpXP-Substraten. Das C-Motiv 1 mit LAA ist dem *ssrA*-„Tag“ ähnlich, während das C-Motiv 2 mit RRKKAI dem C-Terminus von MuA, der Mu-Transposase, gleicht. Nach Mutagenese der Konsensusmotive wurden die Substrate *in vivo* in Anwesenheit von ClpX stabilisiert, was die postulierte Rolle der Motive bei der Erkennung durch ClpX unterstützt. In Abwesenheit von ClpX wurden auch die Proteine mit den Wildtyp-Motiven stabilisiert. Das gleiche experimentelle System wurde von Neher et al. (2006) benutzt, um die Veränderungen des Substratspektrums von ClpXP nach DNA-Schädigung zu bestimmen. Es wurden Proteine mit ClpP co-gereinigt, die dem SOS-Regulon angehören, darunter die DNA-Reparaturproteine RecN und UvrA.

Es wird deutlich, dass Clp-ATPasen Sequenzmotive in Proteinen erkennen können, die diese als Substrate markieren. Aber nicht nur die Verfügbarkeit exponierter Sequenzmotive ist entscheidend für den Abbau. Es existieren sog. Modulatoren, die die Affinität der Clp-ATPasen zu ihren Substraten ändern können. ClpS ist ein solcher Modulator der ClpAP-Degradationsmaschinerie aus *E. coli*. Neben ClpXP ist ClpAP direkt an der Degradation von *ssrA*-markierten Polypeptidketten beteiligt. Durch Binden von ClpS an den N-terminus von ClpA wird einerseits der Abbau der *ssrA*-markierten Substrate erschwert, gleichzeitig aber auch die Affinität von ClpAP für aggregierte Proteine erhöht. ClpS moduliert somit die Substratspezifität von ClpAP (Dogan et al., 2002a). Der Einfluss von ClpS wird auch bei der „N-end rule“ diskutiert. Während nach Erbse et al. (2007) ClpS an „N-end rule“-Substrate direkt bindet und diese somit zur Degradation durch ClpAP markiert, wird von Wang et al. (2007) postuliert, dass ClpAP die N-Endregel-Substrate direkt erkennt, während ClpS lediglich die Affinität von ClpA zu den Substraten erhöht. Eine zu ClpS entgegengesetzte Wirkung hat SspB („stringent starvation protein B“), das die Affinität für *ssrA*-markierte Polypeptide zu ClpXP stark erhöht (Bolon et al., 2004; Flynn et al., 2004; Hersch et al., 2004). SspB bindet dabei an die sieben N-terminalen Aminosäuren des *ssrA*-„Tags“ (McGinness et al., 2006).

Ein weiterer Modulator ist der Antwortregulator RssB aus *E. coli*. Wie ClpS kann phosphoryliertes RssB die Affinität von σ^S , einem Sigmafaktor, der für die Transkription von Stationärphasegenen sowie Genen der Stressantwort zuständig ist, zu ClpXP drastisch erhöhen. Dadurch kommt es zu einem effizienten Abbau von σ^S unter

normalen Wachstumsbedingungen (Becker et al., 1999; Stüdemann et al., 2003). Die Stabilität von σ^S erhöht sich dramatisch unter Hunger- oder Stressbedingungen. Dafür ist IraP („inhibitor of RssB activity during phosphate starvation“) verantwortlich. Unter Phosphat-Mangelbedingungen wird IraP vermehrt gebildet und konkurriert mit σ^S um die Bindung an RssB, so dass weniger σ^S zur Degradation markiert wird. IraP wird demnach als Antiadaptor-Protein bezeichnet (Bougdoor et al., 2006).

Modulatoren von Clp-Proteasen findet man auch in Gram-positiven Mikroorganismen. Die Ausbildung genetischer Kompetenz in *B. subtilis* wird durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk gesteuert. Die Expression der Kompetenzgene unterliegt der Kontrolle des Transkriptionsfaktors ComK, der über das Adaptorprotein MecA der Degradation durch ClpCP zugeführt wird. Über ein „Quorum-Sensing“-System bestehend aus dem Zweikomponentensystem ComP-ComA und den extrazellulären Pheromonen ComQ und ComX wird die Synthese von ComS, ein sog. Antiadaptor, induziert (Turgay et al., 1997 und 1998; Ansaldi und Dubnau, 2004). ComS bindet an MecA und es kommt zur Stabilisierung von ComK - *B. subtilis* bildet daraufhin genetische Kompetenz aus. Ähnlich wie ClpS kann MecA aber auch die Affinität von ClpC zu aggregierten Proteinen erhöhen (Schlothauer et al., 2003; Kirstein et al., 2006).

2.5 ATP-abhängige Proteolyse in *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum wurde 1957 von Kinoshita et al. als L-Glutamatausscheidendes Bakterium aus Bodenproben isoliert. Es wird systematisch der Klasse der *Actinobacteria* zugeordnet, die Gram-positive Eubakterien mit hohem G+C-Gehalt zusammenfasst. Innerhalb dieser Klasse gehört *C. glutamicum* zur Ordnung der *Actinomycetales*, darin zur Unterordnung der *Corynebacterineae* und schließlich zur Familie der *Corynebacteriaceae*, zu der auch pathogene Arten wie *C. diphtheriae* angehören (Liebl, 1991; Stackebrandt et al., 1997). *C. glutamicum* selbst ist apathogen, unbeweglich, bildet keine Sporen und hat einen stäbchen- bis keulenförmigen Habitus. Es scheidet unter Biotinmangel L-Glutamat aus und ist deshalb von großem biotechnologischem Interesse (Abe et al., 1967). Basierend auf der Entschlüsselung des 3,3 Mb großen *C. glutamicum*-Genoms (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski et al., 2003), der Etablierung von Transkriptom- und Proteomanalysen (Wendisch, 2003; Schaffer et al., 2001) sowie der nahen phylogenetischen Verwandtschaft zu wichtigen pathogenen Spezies wie *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis* oder *M. leprae* fungiert *C. glutamicum* für eine Vielzahl von Fragestellungen als Modell-Organismus der Unterordnung *Corynebacterineae*.

In *C. glutamicum* spielt ATP-abhängige Proteolyse eine wichtige Rolle. Neben einem Gen (*cg2984*), das für die membrangebundene Metalloendopeptidase FtsH kodiert, findet man in *C. glutamicum* sieben offene Leserahmen, deren korrespondierende Genprodukte der Proteinfamilie Clp/Hsp100 zugeordnet werden können. Wie Tabelle 2.1 zeigt, sind neben den zwei Genen für ClpP-Peptidasen insgesamt fünf Gene als Clp-ATPasen annotiert. Das verstärkte Auftreten von Clp-ATPasen ist vermutlich auf das Fehlen wichtiger anderer ATP-abhängiger Proteasen wie Lon oder HslUV (ClpYQ) sowie Untereinheiten des Proteasoms (Nagy et al., 1998) zurückzuführen.

Tabelle 2.1: Übersicht über die Clp-Proteine von *C. glutamicum* (modifiziert nach Engels, 2004).

Gennummer	Annotation	Aminosäuresequenzidentität	Charakteristika
<i>cg1982</i>	ClpE	29 % zu <i>B. subtilis</i> ClpE	Clp-ATPase; 655 AS; 71,9 kDa; putativer ClpP-Loop: FGF ₅₃₇
<i>cg2009</i>	„ClpA“	28 % zu <i>E. coli</i> ClpA	Clp-ATPase; 595 AS; 66,3 kDa
<i>cg2620</i>	ClpX	60 % zu <i>E. coli</i> ClpX	Clp-ATPase; 426 AS; 46,9 kDa; Zn-Binde-domäne; putativer ClpP-Loop: LGF ₂₇₅
<i>cg2644</i>	ClpP2	53 % zu <i>E. coli</i> ClpP 51 % zu <i>B. subtilis</i> ClpP	ClpP-Peptidase; 208 AS; 23,0 kDa
<i>cg2645</i>	ClpP1	54 % zu <i>E. coli</i> ClpP 51 % zu <i>B. subtilis</i> ClpP	ClpP-Peptidase; 197 AS; 21,2 kDa
<i>cg2963</i>	ClpC	57 % zu <i>B. subtilis</i> ClpC	Clp-ATPase; 925 AS; 101,5 kDa; putativer ClpP-Loop: LGF ₇₀₀
<i>cg3079</i>	ClpB	55 % zu <i>E. coli</i> ClpB	Clp-ATPase; 852 AS; 93,2 kDa

Die beiden für ClpP-Peptidasen kodierenden Gene *cg2644* und *cg2645* (*clpP2* und *clpP1*) sind in einem bicistronischen Operon angeordnet. Die Genprodukte zeigen eine Sequenzidentität von 48 % und besitzen die für proteolytische Untereinheiten charakteristische katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat. Das von *cg2963* kodierte Protein ClpC zeigt 57 % Sequenzidentität zu ClpC aus *B. subtilis* und man findet das für die Interaktion mit ClpP nötige Sequenzmotiv LGF (ClpP-Loop). Daneben zeigen ClpC-Proteine zwei sog. Clp_N-Domänen, die vermutlich für die Substraterkennung oder Adapterbindung verantwortlich sind und auch bei *C. glutamicum* ClpC zu finden sind. Das von *cg2620* kodierte ClpX-Protein ist zu 60 % mit ClpX aus *E. coli* identisch und zeigt neben dem ClpP-Loop LGF einen Zinkfinger vom C4-Typ, der als Dimerisierungsdomäne fungiert und für die Adapterbindung verantwortlich ist (Thibault et al., 2006). Daneben findet man auch den RKH-Loop, der an der Eingangspore des ClpX-Homohexamers zu finden ist und höchstwahrscheinlich in die Substraterkennung

involviert ist. Diese Sequenzmotive sind hochkonserviert und typisch für ClpX-ATPasen (Wojtyra et al., 2003; Farrell, et al., 2007). Das von *cg1982* kodierte ClpE-Protein besitzt 29 % Sequenzidentität zu *B. subtilis* ClpE. Der typische ClpP-Loop ist nur als FGF zu finden und weicht aufgrund des ersten Phenylalanins von dem allgemeinen Konsensusmotiv nach Kim et al. (2001) ab. Da das Motiv aber insgesamt einen hydrophoben Charakter aufweist, ist eine Interaktion mit ClpP nicht auszuschließen. Weiterhin fehlt die für andere ClpE-Proteine typische Zink-Bindedomäne im N-Terminus (Derré et al., 1999b; Ingmer et al., 1999). Dagegen findet man innerhalb der AAA+-Domänen von *C. glutamicum* ClpE die für alle Clp-ATPasen typischen, von Glycin-Resten flankierten Tyrosin-Reste (Konsensussequenz GYVG für die zweite AAA+-Domäne). Es wird vermutet, dass diese sog. Kanalschleifen essentiell für die Translokation von entfalteten Substraten ist (Hinnerwisch et al, 2005a; Zolkiewski, 2006). Bei dem von *cg2009* kodierten Protein ist eine Annotation schwieriger. Zwar besitzt Cg2009 zwei AAA+-Domänen und zeigt eine Sequenzidentität von 28 % zu *E. coli* ClpA, jedoch fehlt die in anderen ClpA-Proteinen vorkommende Clp_N-Domäne. Des Weiteren ist kein klarer ClpP-Loop zu erkennen. Die Sequenz KGF kann vermutlich nicht als ClpP-Loop fungieren, da laut Konsensussequenz eine hydrophobe Aminosäure an der ersten Position benötigt bzw. bevorzugt ist. Es lassen sich in Cg2009 im Gegensatz zu ClpC, ClpX und ClpE auch keine Kanalschleifen identifizieren. Generell findet man in Gram-positiven Bakterien ClpC, während in Gram-negativen Bakterien ClpA vorkommt. Eine Annotation von Cg2009 als funktionelles ClpA-Homolog ist auch aus diesem Grund zweifelhaft. Das von *cg3079* kodierte Protein ClpB zeigt eine Sequenzidentität von 55 % zu ClpB aus *E. coli*. ClpB aus anderen Organismen ist gut charakterisiert und man kennt neben der Kristallstruktur und biochemischer Charakterisierung bereits erste Substrate dieses Chaperons, was vornehmlich mit GrpE und DnaKJ interagiert (Mogk et al., 2003a und 2003b; Schliecker et al., 2004). ClpB bildet wie alle Clp-ATPasen Homohexamere, kann jedoch aufgrund des fehlenden ClpP-Loops nicht mit ClpP interagieren. Somit könnten die drei Clp-ATPasen ClpC, ClpE und ClpX mit ClpP1 und ClpP2 interagieren und Clp-Proteasen bilden. Deutet aber die Existenz zweier ClpP-Peptidasen auf eine unterschiedliche Funktion hin? Das Auftreten von mehreren ClpP-Peptidasen ist vor allem in Actinomyceten, Cyanobakterien und Pflanzen zu beobachten. Für ClpP-Untereinheiten aus diesen Organismen werden Mischkomplexe aus unterschiedlichen ClpP-Proteinen postuliert. Die unterschiedlichen proteolytischen Kerne sollen nur mit einem distinkten Clp-ATPase-Partner assoziieren (Viala und Mazodier, 2002; Stanne et al., 2007). Dennoch gibt es keine eindeutigen experimentellen Hinweise darauf, dass funktionelle Mischkomplexe aus verschiedenen ClpP-Untereinheiten gebildet werden können.

Wie durch Engels et al. (2004 und 2005) beschrieben, wird die Expression der *clp*-Gene in *C. glutamicum* durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk kontrolliert. Die Transkription von *clpC* und des *clpP1P2*-Operons wird durch ClgR („*clp* gene regulator“) aktiviert. ClgR hat eine Masse von 11,3 kDa und besitzt eine HTH_XRE-Domäne („helix-turn-helix“-Domäne der XRE-Proteinfamilie), die für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Das ClgR-Gen wird transkriptionell durch HspR und durch die ECF-Sigmafaktoren σ^E und/oder σ^H kontrolliert. ClgR selber reguliert neben *clpC* und dem *clpP1P2*-Operon weitere Gene, nämlich *ptrB* (putative Endopeptidase), *hflX* (annotiert als GTP-bindendes Protein), *recR* (DNA-Reparatur) sowie Gene für hypothetische Proteine (*cg0297* und *cg0892*). Dabei bindet ClgR als Aktivator an das Konsensusmotiv WNNWCGCYNANRGCGWWS. ClgR ist selbst ein Substrat der ClpCP-Protease, da es nur in Abwesenheit von ClpC oder ClpP1/ClpP2 stabilisiert wird. Unter Hitzestress erfolgt die Aktivierung der *clp*-Gene ClgR-unabhängig durch σ^E und/oder σ^H (Engels et al., 2004; Schweitzer, 2004). Unter welchen Bedingungen ClgR stabilisiert wird, ist noch unklar. Aufgrund der bisherigen Versuche führen weder Hitze-, Osmo-, UV- oder oxidativer Stress noch DNA-Schädigung durch Mitomycin C zu einer Stabilisierung von ClgR (Engels et al., 2005; Engels, 2004; Steffen Schaffer, persönliche Mitteilung).

Neben ClgR ist ein weiteres konditionales Substrat der ClpCP-Protease aus *C. glutamicum* bekannt, das bei der Stickstoffmangelantwort eine zentrale Rolle spielt. GlnK, ein P_{II} -Typ-Signaltransduktionsprotein, wird unter niedrigen Stickstoffkonzentrationen vermehrt gebildet. Es lagert sich zu Homotrimeren zusammen und wird durch die Adenylyltransferase GlnD adenyliert. Dieses adenylierte GlnK bindet an AmtR, den globalen Repressor der Stickstoffmangelgene. AmtR ist dadurch nicht mehr aktiv und es kommt zur Transkription der Stickstoffmangelgene. Bei einem erneuten Anstieg der Stickstoffkonzentration wird das adenylierte GlnK durch GlnD wieder deadenyliert und GlnK kann in dieser Form nicht mehr mit AmtR interagieren. Wahrscheinlich interagiert deadenyliertes GlnK mit AmtB, einer Ammoniumpermease und hemmt deren Aktivität. Durch die Anlagerung an die Membran kommt es möglicherweise zu einer ersten Proteolyse von GlnK durch FtsH, gefolgt von einer fast vollständigen Degradation von GlnK durch ClpCP und ClpXP. In Abwesenheit von FtsH, ClpC, ClpX oder ClpP1 bzw. ClpP2 wird GlnK stabilisiert (Ströscher et al., 2004).

ClgR-Proteine findet man in allen *Actinobacteria* mit Ausnahme von *Mycobacterium leprae* (zusammengefasst in Ventura et al., 2006). In Bifidobakterien aktiviert ClgR (50 % Sequenzidentität zu ClgR aus *C. glutamicum*) ebenfalls *clpC* und *clpP1P2*, benötigt hier aber einen Co-Faktor, der unter Hitzestress gebildet wird. In *Streptomyces*-Spezies aktiviert ClgR (50 % Sequenzidentität zu ClgR aus *C. glutamicum*) die Transkription von *clpC1*, *clpP1P2*, *lon* und *clgR* selbst, bindet an die

Konsensussequenz GTTCGC-N₅-GCG und scheint über ein C-terminales Ala-Ala-Motiv ClpP1- bzw. ClpP2-abhängig degradiert zu werden (Bellier und Mazodier, 2004; Bellier et al., 2006). PopR aus *Streptomyces lividans* (54 % Sequenzidentität zu ClgR aus *C. glutamicum*) fungiert als Transkriptionsaktivator des *clpP3P4*-Operons, bindet an die Konsensussequenz TCTGCC-N₃-GGCAGA und wird vermutlich ebenfalls aufgrund eines C-terminalen Ala-Ala-Motivs ClpP1- und ClpP2- bzw. auch ClpP3- und ClpP4-abhängig degradiert (Viala, et al., 2000; Viala und Mazodier, 2002).

Durch einen Proteomvergleich von Wildtyp und $\Delta ftsH$ -Mutante wurde zum ersten Mal das Substratspektrum einer ATP-abhängigen Protease aus *C. glutamicum* systematisch untersucht (Lüdtke et al., 2007). Dabei konnten 10 potentielle Substrate ermittelt werden, die in Abwesenheit von FtsH akkumulieren: Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase (Cg0445, Cg0446, Cg0447), Glutamat-bindendes Protein (Cg2137), Homocysteinmethyltransferase (Cg1290), Biotin-Carboxylase/Biotin-Carboxyltransportprotein (Cg0802), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Cg1791), Malatsynthase (Cg2559), Isocitratlyase (Cg2560) und ein Protein unbekannter Funktion (Cg2263). Ob diese Proteine Substrate von FtsH darstellen oder durch Sekundäreffekte stabilisiert werden, muss noch geklärt werden.

2.6 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das Substratspektrum der ClpCP-Protease aus *C. glutamicum* analysiert werden, und zwar mit Hilfe von Substratfallenstämmen, die katalytisch inaktive ClpP-Proteine enthalten. In den damit gebildeten ClpCP-Komplexen sollten die Substratproteine im proteolytischen Kern gefangen bleiben und mit den ClpP-Untereinheiten co-gereinigt werden können. Nach Auftrennung der co-gereinigten Substrate über 2D-Gelelektrophorese sollte ihre Identität durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmt werden. Da die Arbeiten zur *E. coli* ClpXP-Protease gezeigt hatten, dass sich die mit der Clp-ATPase interagierenden Sequenzen an den Termini der Substrate befinden, sollten durch Vergleich der Termini der identifizierten ClpCP-Substrate ebenfalls Erkennungssequenzen abgeleitet werden. Anschließend sollte die Relevanz der abgeleiteten Erkennungsmotive experimentell getestet werden, und zwar durch Fusion mit einem Testprotein, das vermutlich kein ClpCP-Substrat darstellt. Die Stabilität dieses Fusionsproteins sollte dann in Stämmen mit und ohne ClpC anhand von Western-Blot-Analysen bestimmt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Sigma-Aldrich Chemie (Seelze), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (München) und Difco Laboratories (Detroit, USA) verwendet. Die Chemikalien entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Biochemikalien und Enzyme mit den jeweiligen Puffern wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) oder Operon (Köln) synthetisiert. Materialien anderer Hersteller sind gesondert aufgeführt.

3.2 Stammlösungen

2 mg/ml	Anhydrotetracyclin (in DMF, sterilfiltriert)
10 mg/ml	Chloramphenicol (in 70 % (v/v) Ethanol, sterilfiltriert)
25 und 50 mg/ml	Kanamycin (sterilfiltriert)
25 mg/ml	Rifampicin (in Methanol, sterilfiltriert)
10 mg/ml	Tetracyclin (in 70 % (v/v) Ethanol, sterilfiltriert)
50 % (w/v)	Glukose-Monohydrat (autoklaviert)
10 x PBS	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄ , bei Verdünnung auf 1 x PBS pH kontrollieren (~ pH 7,3)
10 % (w/v) SDS	doppelt kristallisiert und autoklaviert
6 x SDS-Ladepuffer	10 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,175 % (w/v) Bromphenolblau, 350 mM Tris, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
10 x TE	100 mM Tris, 10 mM Na ₂ EDTA, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
50 x TAE	2 M Tris, 1 M Na-Acetat, 50 mM Na ₂ EDTA, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
0,9 % (w/v)	NaCl (Saline, autoklaviert)

3.3 Bakterienstämme und Plasmide

3.3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie ihre Charakteristika und Herkunft sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* mit den dazugehörigen Charakteristika sowie Referenzen.

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1</i> ; Stamm für Klonierungen	Hanahan, 1995
BB1553	Cam ^R , MC4100 <i>ΔdnaK::cat sidB1</i>	Tomoyasu et al., 2001
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp-Stamm	Abe et al., 1967
13032 <i>P_{tetA}-clpP1P2</i>	Derivat von ATCC 13032, Austausch des natürlichen <i>clpP1P2</i> -Promotors gegen den <i>tetA</i> -Promotor des Transposons Tn10	Strösser et al., 2004
13032 <i>ΔsmpB P_{tetA}-clpP1P2</i>	Derivat von 13032 <i>P_{tetA}-clpP1P2</i> mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>smpB</i>	Diese Arbeit
13032 <i>ΔsmpB ΔclpE P_{tetA}-clpP1P2</i>	Derivat von 13032 <i>ΔsmpB P_{tetA}-clpP1P2</i> mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clpE</i>	Diese Arbeit
13032 <i>ΔsmpB ΔclpE ΔclpX P_{tetA}-clpP1P2</i>	Derivat von 13032 <i>ΔsmpB ΔclpE P_{tetA}-clpP1P2</i> mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clpX</i>	Diese Arbeit
13032 <i>ΔsmpB ΔclpC ΔclpE P_{tetA}-clpP1P2</i>	Derivat von 13032 <i>ΔsmpB ΔclpE P_{tetA}-clpP1P2</i> mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clpC</i>	Diese Arbeit
13032 <i>ΔclpC</i>	Derivat von 13032 mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clpC</i>	Engels et al., 2004
13032 <i>ΔclpC ΔclgR</i>	Derivat von 13032 <i>ΔclpC</i> mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>clgR</i>	Engels et al., 2004
13032 <i>ΔphoR</i>	Derivat von 13032 mit einer <i>in-frame</i> -Deletion von <i>phoR</i>	Sarah Schaaf

3.3.2 Plasmide

In Tabelle 3.2 sind alle in der Arbeit verwendeten oder neu konstruierten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 3.2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit den dazugehörigen Charakteristika sowie deren Referenz

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pAN6- <i>odhA</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat kodierend für das <i>C. glutamicum</i> OdhA-Protein mit C-terminalem StrepTag-II	Axel Niebisch
pEKEx1- <i>clgR</i> -C	Kan ^R , pEKEx1-Derivat mit einem 520 bp EcoRI-Sall-Fragment kodierend für ein ClgR-Derivat mit C-terminalem StrepTag-II	Engels, 2004
pEKEx2	Kan ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> -Shuttle-Vektor für die regulierte Gen-expression (P_{tac} , <i>lacI</i> ^R , pBL1 <i>oriV_{C.g.}</i> , pUC18 <i>oriV_{E.c.}</i>); MCS im Vergleich zum pEKEx1 invertiert	Eikmanns et al., 1991
pEKEx2- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 756 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für das <i>C. glutamicum</i> PhoR-Protein	Diese Arbeit
pEKEx2-N1- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 748 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 1-Sequenz MAKLIAF	Diese Arbeit
pEKEx2-N2- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 745 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 2-Sequenz MTEQEL	Diese Arbeit
pEKEx2-N3- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 760 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 3-Sequenz MVTYTTLLDKP	Diese Arbeit
pEKEx2-N4- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 748 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 4-Sequenz MAANNVN	Diese Arbeit
pEKEx2-N5- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 748 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 5-Sequenz MKLITAI	Diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 3.2

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pEKEx2-N7- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 745 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 7-Sequenz MFERDI	Diese Arbeit
pEKEx2-N8- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 748 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 8-Sequenz MATIREL	Diese Arbeit
pEKEx2-N9- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 748 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv9-Sequenz MEDMRIA	Diese Arbeit
pEKEx2-N10- <i>phoR</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 748 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein PhoR-Derivat mit einer N-terminalen Motiv 10-Sequenz MSTSTIR	Diese Arbeit
pEKEx2-NStrep- <i>clpP1</i>	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 628 bp SbfI-KpnI-Fragment kodierend für ein prozessiertes ClpP1-Derivat mit N-terminalem StrepTag-II	Diese Arbeit
pJC1-P _{gap} - <i>tetR</i>	Kan ^R , pJC1-Derivat mit dem Promotor der Gens der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (<i>cg1791</i>) vor dem Gen des Tet-Repressors <i>tetR</i> aus Tn10	Strösser et al., 2004
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R , mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Vektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	Schäfer et al., 1994
pK19 <i>mobsacB</i> -Δ <i>clpC</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 913 bp XbaI-XmaI-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>clpC</i> flankierenden Bereiche umfasst	Engels et al., 2004
pK19 <i>mobsacB</i> -Δ <i>clpE</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 899 bp XbaI-XmaI-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>clpE</i> flankierenden Bereiche umfasst	Steffen Schaffer
pK19 <i>mobsacB</i> -Δ <i>clpX</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 735 bp XbaI-XmaI-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>clpX</i> flankierenden Bereiche umfasst	Strösser et al., 2004

Fortsetzung Tab.3.2

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pK19 <i>mobsacB</i> - Δ <i>smpB</i>	Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit einem 1084 bp XbaI-XmaI-Crossover-PCR-Fragment, das die <i>smpB</i> flankierenden Bereiche umfasst	Diese Arbeit
pXMJ19- <i>clpP1</i> -ST	Cam ^R , pXMJ19-Derivat kodierend für ein ClpP1-Derivat mit einem C-terminalen StrepTag-II	Carsten Ludwig, 2002
pXMJ19- <i>clpP1</i> *-ST	Cam ^R , pXMJ19-Derivat kodierend für ein ClpP1-Derivat mit einem Austausch des katalytisch aktiven Serins 96 gegen Glycin und einem C-terminalen StrepTag-II	Diese Arbeit
pXMJ19- <i>clpP2</i> -ST	Cam ^R , pXMJ19-Derivat kodierend für ein ClpP2-Derivat mit einem C-terminalen StrepTag-II	Carsten Ludwig, 2002
pXMJ19- <i>clpP2</i> *-ST	Cam ^R , pXMJ19-Derivat kodierend für ein ClpP2-Derivat mit einem Austausch des katalytisch aktiven Serins 108 gegen Glycin und einem C-terminalen StrepTag-II	Diese Arbeit
pXMJ19- <i>odhA</i> -ST	Cam ^R ; pXMJ19-Derivat kodierend für ein OdhA-Derivat mit C-terminalem StrepTag-II	Diese Arbeit

3.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind unter Angabe der jeweiligen Sequenz und der Charakteristika in Tabelle 3.3 angegeben.

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen, die mit Hilfe der Oligonukleotide eingeführt wurden, sind unterstrichen und das entsprechende Enzym ist in der letzten Spalte aufgeführt. Zueinander komplementäre Sequenzen sind kursiv hervorgehoben.

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
Delta <i>clpC</i> -out-fw	CCA CAA CGA GCG GGA TGG TTG	
Delta <i>clpC</i> -out-rv	GAC ATG ATG ACC TCC TCC GCA GC	
Delta <i>clpE</i> -out-fw	GAA GAA AGC TAC CGC AAC TCT G	

Fortsetzung Tab. 3.3

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
DeltaclpX-out-fw	ACA GGT AAA GCG CTA AGA TGG AAC	
DeltaclpX-out-rv	CCG GTG ATA ACT CCT GCC AAC	
DeltasmpB-1	TAT ATA <u>TCT AGA</u> GCG ATC TTC CTC AAG TAA GCA ACG	XbaI
DeltasmpB-2	<u>CCC ATC</u> CAC TAA ACT TAA ACA CTT TTT CTT CTT GGC CAT AGT CTT TC	
DeltasmpB-3	<u>TGT TTA</u> AGT TTA GTG GAT GGG CGT GAG CTC GGC CGT CGC ATT	
DeltasmpB-4	TAT ATA <u>CCC GGG</u> GCC TTC ACC GGC ACG CTT CCC	XmaI
DeltasmpB-out-fw	GCG TTC CAC GTC CGA CTT GAA	
DeltasmpB-out-rv	GAG ACT TCT CGG CGC TTA TTG	
EX-clpP1-S96G-fw	GGC ATG GGC CTG GCA <u>GCC GGC</u> ATG GGC CAG TTC C	NaeI
EX-clpP1-S96G-rv	GGA ACT GGC CCA <u>TGC CGG</u> CTG CCA GGC CCA TGC C	NaeI
EX-clpP2-S108G-fw	CTG CCT TGG TCA GGC <u>AGC CGG</u> CGC AGC CGC AGT TC	NaeI
EX-clpP2-S108G-rv	GAA CTG CGG CTG <u>CGC CGG</u> CTG CCT GAC CAA GGC AG	NaeI
NStrep-clpP1-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGT GGA GCC ACC CGC AGT TCG AAA AAG CCG CAG CCC AGG GTG GGC CTG GT	SbfI
NStrep-clpP1-rv	TAT <u>AGG TAC</u> CCT AGT TGC TGA TTG GGC CTT CAG C	KpnI
OE-N1-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGG CAA AGC TCA TTG CTT TTG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N2-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGA CTG AAC AGG AAC TGG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N3-phoR-fw	<u>TAC CTG</u> CAG GAA GGA GAT ATA GAT ATG GTT ACT TAT ACA ACC CTT CTA GAC AAG CCG GAC AAC CAG TCT GAC GGA CAA AT	SbfI
OE-N4-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGG CAG CCA ACA ATG TCA ACG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N5-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGA AAC TCA TCA CCG CAA TTG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N6-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGA TTG GAG CAC CAC CCG ACA TGG GCA ATG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N7-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGT TTG AAA GGG ATA TCG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N8-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGG CAA CAA TTC GTG AAT TGG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N9-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGG AAG ACA TGC GAA TTG CTG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-N10-phoR-fw	TAT ACC <u>TGC AGG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGA GCA CGT CCA CCA TCA GGG ACA ACC AGT CTG ACG GAC AAA T	SbfI
OE-odhA-ST-fw	TAT <u>ATC TAG</u> ACA CCT ACG CCC GCA TGT GGC ATT	XbaI
OE-odhA-ST-rv	TAT ACC <u>CGG GTT</u> ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC AAG CGC TAG CCT CGA AAG CCT CGT CGA TAA GC	XmaI
OE-phoR-fw	CCG CGG <u>CCT GCA</u> GGT AAT CAT TCC GCT AAT GGA CAC CAA	SbfI
OE-phoR-rv	TAT ATA <u>GGT ACC</u> TTA GCT ACG TGG GGT GCG CAG AAC	KpnI

Fortsetzung Tab. 3.3

Name	Sequenz (5' → 3')	Restriktions- endonuklease
pEKEx2-for	CGG CGT TTC ACT TCT GAG TTC GGC	
pEKEx2-rev	GAT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC	
pXMJ19-for	CTG TTG ACA ATT AAT CAT CGG CTC G	
pXMJ19-rev	GCG TTC TGA TTT AAT CTG TAT CAG G	
Seq-odhA-1	ATC TCC CTG GAA ATC CCA ACC	
Seq-odhA-2	GGT GCT GTG TCC GGT GAA TTC	
Seq-odhA-3	CTG ATG GAC TCC GCC ATC GAC	
Seq-odhA-4	GCC AGG TTG ATG GTT TCT GGC	
Seq-odhA-5	GCC ACA CGT GGG TGG TAG TTG	
Seq-odhA-6	AGT GGA CGC TTC AGG TCG GAC	

3.5 Nährmedien

Alle Medien wurden mit dH₂O angesetzt und, wenn nicht anders vermerkt, 15-20 min bei 121 °C autoklaviert.

BHI-Medium	37 g/l Brain Heart Infusion (Difco Laboratories, Detroit, USA)
BHIS-Medium	37 g/l Brain Heart Infusion (Difco Laboratories, Detroit, USA), 91 g/l Sorbitol (separat autoklaviert)
LB-Medium:	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 580 mg/l NaCl, 186 mg/ml KCl, pH 6,8-7, nach dem Autoklavieren zu 100 ml Medium 1 ml einer 2 M Magnesiumsalzlösung (1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O und 1 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O, sterilfiltriert) und 1 ml einer 2 M Glukose-lösung (separat autoklaviert) zugeben.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar-Agar (Difco, USA) zugesetzt. Zur selektiven Kultivierung von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen wurden die Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60 °C mit den in Tabelle 3.4 angegebenen Antibiotikakonzentrationen versetzt.

Tabelle 3.4: Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Anhydrotetracyclin	-	200 ng/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml	10 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	25 µg/ml

3.6 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien

3.6.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde routinemäßig LB-Medium oder BHI-Medium verwendet. 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, der Stamm BB1553 aufgrund der *dnaK*-Insertionsmutation nur bei 30 °C. Die Kultivierungen zur Plasmid-Isolierung erfolgten üblicherweise in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium, die für 15-20 h mit 170 Upm geschüttelt wurden, oder in Schüttelkolben mit 100 ml LB-Medium, die für 15-20 h bei 37 °C bei 120 Upm geschüttelt wurden.

3.6.2 Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen

C. glutamicum wurde standardmäßig in 500-ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen kultiviert, die entweder 100 ml LB-Medium mit 4 % (w/v) Glukose (=222 mM) oder 100 ml BHI-Medium enthielten und bei 30 °C und 150 Upm inkubiert wurden. Zum Animpfen der Vorkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten verwendet, die nicht älter als 4 Tage waren. Die Vorkultivierung erfolgte zunächst über Nacht in 25 ml LB-Medium mit 4 % (w/v) Glukose oder 25 ml BHI-Medium, bevor die 100-ml-Hauptkultur zu einer OD₆₀₀ von 0,5 oder 1 inokuliert wurde.

3.6.3 Stammhaltung von Bakterien

Zur Stammhaltung wurden die Bakterienstämme in Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium und 5 % (w/v) Glukose für 16 h bei 30 °C (*C. glutamicum*) bzw. 37 °C (*E. coli*) und 170 Upm kultiviert. Die Zellen wurden 5 min bei 4332 g zentrifugiert, in 2 ml LB-Medium

resuspendiert und mit 2 ml 99,9 % (v/v) Glycerin versetzt. Je ein 1,5-ml-Aliquot wurde bei -20 °C und bei -75 °C gelagert.

3.6.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der scheinbaren optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) mit einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, München) 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 verdünnt.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Isolierung von DNA

3.7.1.1 Plasmid-Isolierung

Ausgehend von 5 ml Übernachtskultur erfolgte die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im kleinen Maßstab mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits (Qiagen, Hilden), das auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-Kits (ausgehend von 100 ml Übernachtskultur) nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser eluiert bzw. gelöst und direkt für Restriktionsanalysen, Transformationen oder zur DNA-Sequenzierung eingesetzt.

3.7.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurde eine 5 ml LB-Übernachtskultur für 5 min bei 17300 g zentrifugiert, das Zellpellet in 400 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM Na_2EDTA , 1,2 % (v/v) Triton X-100, 20 mg/ml Lysozym (frisch zugesetzt)) resuspendiert und die Suspension 1 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung von Proteinen wurde dann 80 µl 10 % (w/v) SDS und 25 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE) zugegeben und 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; pH 7,5-8,0;

Roth, Karlsruhe) und Mischen wurden die Phasen durch 5 min Zentrifugation bei 17300 *g* getrennt, die obere wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml eiskaltem abs. Ethanol versetzt, gemischt und 10 min mit 17300 *g* bei 4 °C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, das Ethanol vollständig abgenommen, die DNA luftgetrocknet und in 250 µl EB-Puffer (Qiagen, Hilden, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gelöst. Zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der chromosomalen DNA-Lösung wurde die Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt (siehe 3.7.3).

3.7.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QIAEX II-Gel Extraction-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.7.2 Reinigung und Konzentration von DNA

3.7.2.1 Reinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte von Nukleotiden und Oligonukleotiden zu reinigen, wurde das PCR-Purification-Kit oder das MinElute PCR-Purification Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA wurde mit EB-Puffer (Qiagen, Hilden) eluiert.

3.7.2.2 Konzentration von DNA-Lösungen mit Mikrokonzentratoren

Zur Konzentration von DNA-Lösungen und zum Entsalzen von Plasmid-Lösungen nach der Minipräparation, die für eine Elektroporation (siehe 3.9.4) bestimmt waren, wurden Microcon® Mikrokonzentratoren YM-30 von Millipore (Schwalbach) verwendet. Das Konzentrieren erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Dazu wurde ein Nanodrop® ND-1000 Spektralphotometer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurde mit folgenden Umrechnungsfaktoren gearbeitet (Sambrook et al., 1989): Eine

doppelsträngige DNA-Lösung mit einer $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 ng/μl, einzelsträngige DNA- oder RNA-Lösungen mit einer $OD_{260} = 1$ entsprechen einer Konzentration von 40 ng/μl bzw. 33 ng/μl. Die Reinheit der DNA wurde anhand der Quotienten OD_{260}/OD_{280} bzw. OD_{260}/OD_{230} bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen oder Polysacchariden liegt der Wert unter 1,8.

3.8 Rekombinante DNA-Techniken

3.8.1 Restriktion

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen (Roche Diagnostics, Mannheim bzw. New England Biolabs, Schwalbach) wurde nach den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Ansätze (100 μl für präparative Arbeiten, 20 μl für analytische Arbeiten) enthielten in der Regel 1-10 μg DNA und 5-30 U des gewünschten Enzyms und wurden 2 Stunden oder über Nacht bei der erforderlichen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mit $\frac{1}{5}$ Volumen Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM Na_2EDTA , 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.8.4) unterzogen.

3.8.2 5'-Dephosphorylierung von linearer Plasmid-DNA

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 der 5'-Enden wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase („Shrimp alkaline phosphatase“, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

3.8.3 Ligation

Für Ligationen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers genutzt. Dabei wurden der Vektor in einer Konzentration von 10

bis 20 ng/μl und das Insert im drei- bis fünffachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt.

3.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten nach deren Größe erfolgte durch Elektrophorese in Agarose-Gelen. Lineare DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts ist und abhängig von der Agarosekonzentration des Gels und der elektrischen Feldstärke ist. Agarosekonzentrationen von 1 und 2 % (w/v) erlauben eine effiziente Auftrennung von DNA-Molekülen in einem Größenbereich von 0,2 bis 10 kb. Durch Vergleich mit einem Standard kann die Größe der DNA-Fragmente im Gel bestimmt werden. Es wurden Elektrophoresekammern und Stromversorgungsgeräte (PowerPAC-300) der Firma Biorad (München) verwendet. Zur Herstellung der Agaroselösung wurde Ultra-Pure-Agarosepulver (Invitrogen, Karlsruhe) in 1 x TAE-Puffer kurz in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Agarose in die Gelapparatur gegossen und ein Kamm zur Bildung von Geldaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt bis das Gel vollständig bedeckt war. Anschließend wurde der Kamm entfernt und die mit $\frac{1}{5}$ Volumen Ladepuffer (0,2% (w/v) Bromphenolblau, 100 mM Na₂EDTA, 34,8% (v/v) Glycerin) gemischten DNA-Proben in die Taschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von ca. 8 V/cm. Als Standard diente entweder GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus für einen Bereich von 100-3000 bp oder GeneRuler™ 1 kb DNA ladder für einen Bereich von 250-10000 bp (beide Fermentas, St. Leon-Rot). Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Färbung der DNA durch eine 15- bis 60-minütige Inkubation der Agarose-Gele in einer Lösung des interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (0,5 mg/l). Anschließend wurde das Gel kurz in dH₂O gewaschen und unter UV-Licht mit einem ImageMaster VDS-System (GE Healthcare, München) photographiert.

3.9 Klonierungsexperimente

3.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Die Fähigkeit zur Aufnahme von freier DNA aus dem Medium erhalten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen durch eine Rubidiumchlorid-Behandlung. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (1985): Einige 2-3 mm große Kolonien des *E. coli*-Stammes DH5 α wurden von einer frischen SOC-Platte in 1 ml SOC resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,5 bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Nach Abkühlung der Zellen auf Eis (10-15 min) wurden diese für 15 min bei 3509 g und 4 °C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden vorsichtig in $\frac{1}{3}$ Kulturvolumen eiskalter RF1-Lösung (12 g/l RbCl, 9,9 g/l MnCl₂, 1,5 g/l CaCl₂, 2,9 g/l Kaliumacetat, 150 g/l Glycerin, pH 5,8, mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in $\frac{1}{12,5}$ Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung (2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l RbCl, 11 g/l CaCl₂, 150 g/l Glycerin, pH 6,8, mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 100- μ l-Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.9.2 Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Zur Präparation elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurden 25 ml LB-Medium mit 2 % (w/v) Glukose supplementiert, mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 130 Upm inkubiert. Für die Hauptkultur wurden die Komponenten für 200 ml LB-Medium in einen 500 ml Schikanekolben eingewogen, in 160 ml dH₂O gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 800 mg Isonicotinsäure-Hydrazid, 5 g Glycin und 0,2 ml Tween 80 in 40 ml dH₂O gelöst und sterilfiltriert dazugegeben. Die Hauptkultur wurde so inokuliert, dass sie eine Start-OD₆₀₀ von 0,3 besaß. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 (ca. 28 h) wurde die Kultur bei 18 °C und 150 Upm inkubiert, dann 30 min auf Eis abgekühlt, zwischendurch regelmäßig geschwenkt und 10 min bei 2773 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem 10 %-igen (v/v) Glycerin resuspendiert und 10 min bei 3826 g und 4 °C zentrifugiert. Es folgten noch zwei weitere Waschschrte mit 40 ml eiskaltem 10 %-igen (v/v) Glycerin, wobei die relative Erdbeschleunigung auf 4642 g und schließlich auf

5525 g erhöht wurde. Danach wurden die Zellen in 2 ml 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und zu je 100 µl in eiskalte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.9.3 Transformation Rubidiumchlorid-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für Transformationen von *E. coli* wurden die bei -70 °C gelagerten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 0,5 bis 1 µl der Plasmid-Lösung oder 2 bis 5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 100 µl Zellsuspension gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 90 s bei 42 °C im Wasserbad, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Dann wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C bei 800 Upm im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden Aliquots auf LB-Platten, die das geeignete Antibiotikum enthielten, ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.9.4 Elektroporation elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Für Transformationen von *C. glutamicum* wurden die bei -70 °C gelagerten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurden 0,5 bis 20 µg Plasmid-DNA mit den aufgetauten Zellen vermischt, in eine eisgekühlte, sterilisierte Elektroporationsküvette (Sterilisation der Elektroporationsküvetten erfolgte durch 12stündige Inkubation in 70 %igem (v/v) Ethanol und anschließende Belichtung unter UV-Licht für weitere 12 Stunden) gegeben und sofort in einem Gene Pulser™ mit Pulscontroller und Capacitance Extender (Biorad Laboratories GmbH, München) einem Strompuls ausgesetzt. Für den Strompuls wurden folgende Einstellungen gewählt: Spannung 2,5 kV; Kapazität 25 µF; Widerstand 600 Ω. Die Zeitkonstanten sollten hierbei zwischen 10 und 14 ms liegen. Nach dem Puls wurde sofort 0,5 ml auf 46 °C vorgewärmtes SOC-Medium in die Küvette gegeben, die Zellsuspension in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 6 min bei 46 °C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Der Transformationsansatz wurde 60 min bei 30 °C und 800 Upm im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Anschließend wurden 250 µl Aliquots auf BHIS-Platten, die das geeignete Antibiotikum enthielten, ausplattiert und die Platten über Nacht bei 30 °C inkubiert.

3.9.5 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Definierte DNA-Fragmente wurden mittels der Polymerasekettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR, Mullis und Faloona, 1987) amplifiziert. Bei der PCR wird mit Hilfe zweier Oligonukleotide, die das zu amplifizierende DNA-Fragment auf der Matrize eingrenzen, und einer hitzestabilen DNA-Polymerase das betreffende DNA-Fragment dupliziert. Durch die Wiederholungen des Zyklus, der aus Denaturierung der DNA, dem Anlagern der Oligonukleotide („Primer-Anlagerung“) und der DNA-Kettenverlängerung („Primer-Elongation“) besteht, kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Durch Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase können viele solcher Zyklen durchlaufen werden, ohne dass nach jedem Denaturierungsschritt die DNA-Polymerase neu zugesetzt werden muss (Tindall und Kunkel, 1988). Die PCR wurde in einem Thermo-Cycler (Primus 25 bzw. 96 plus von MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Reaktionsansätze (siehe unten) wurden in einem Mikroreaktionsgefäß (0,2 ml mit Deckel, MWG-Biotech, Ebersberg) angesetzt. Als Anlagerungstemperatur wurde die Temperatur gewählt, die 5 °C unter dem niedrigsten T_m -Wert der Oligonukleotide lag. Der T_m -Wert ($T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$) wurde durch die Nukleotid-Zusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt. Dabei wurden nur die Nukleotide der Oligonukleotide in die Berechnung mit einbezogen, die bereits im ersten Zyklus mit der Matrizen-DNA hybridisierten. Der Zeitraum der DNA-Kettenverlängerung wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert, wobei routinemäßig 1 min pro 1000 Basen für die Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) und 1 min pro 500 bp für das DNA-Polymerasen-Gemisch des Expand High Fidelity PCR Systems (Roche, Mannheim) berechnet wurde. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) oder der Firma Operon (Köln) bezogen.

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	0,1-1 µg
dNTP-Mix	0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligonukleotid vorwärts	40 pmol
Oligonukleotid rückwärts	40 pmol
10 x Puffer mit 15 mM MgCl ₂	10 µl
DNA-Polymerase	10 U
dH ₂ O (steril)	ad 100 µl

Das Standard-Protokoll zur Amplifikation sah wie folgt aus:

Denaturierung der DNA	5 min	95 °C	1x
Denaturierung der DNA	30 sec	95 °C	} 30 x
Primer-Anlagerung	30 sec	$T_m - 5\text{ °C}$	
Primer-Elongation	1 min pro 1 kb	72 °C	
Lagerung	∞	4 °C	

3.9.6 Kolonie-PCR

Bei diesem Verfahren wurden Zellen einzelner Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze von der Platte abgenommen und direkt dem PCR-Ansatz als Matrize zugesetzt. Durch eine initiale Inkubation von 10 min bei 95 °C wurden die Zellen lysiert und so die zu analysierende DNA freigesetzt.

Reaktionsansatz für Kolonien-PCR:

dNTP-Mix	0,2	mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Oligonukleotid vorwärts	10	pmol
Oligonukleotid rückwärts	10	pmol
10 x Puffer mit 15 mM MgCl ₂	2,5	µl
Taq-Polymerase	2,5	U
dH ₂ O (steril)	ad 25	µl

Das Standard-Protokoll zur Amplifikation sah wie folgt aus:

Zellyse und Denaturierung der DNA	10 min	95 °C	1 x
Denaturierung der DNA	30 sec	95 °C	} 30 x
Primer-Anlagerung	30 sec	$T_m - 5\text{ °C}$	
Primer-Elongation	1 min pro 1 kb	72 °C	
Lagerung	∞	4 °C	

3.9.7 Konstruktion von Deletionsmutanten

C. glutamicum-Deletionsmutanten wurden nach Niebisch und Bott (2001) in Anlehnung an die von Link et al. (1997) beschriebene Methode mit dem Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer et al., 1994) konstruiert. Zur Deletion von *smpB* wurden in einer ersten PCR

zwei etwa 500 bp große Fragmente, die den 5'- und den 3'-flankierenden Bereich des *smpB*-Gens enthalten, mit den Oligonukleotiden DeltasmpB-1 und DeltasmpB-2 bzw. DeltasmpB-3 und DeltasmpB-4 amplifiziert. Die Primer DeltasmpB-1 und DeltasmpB-4 wurden für die Klonierung in das Plasmid pK19*mobsacB* mit 5'-terminalen Restriktionsschnittstellen ergänzt. Die Oligonukleotide DeltasmpB-2 und DeltasmpB-3 besitzen am 5'-Ende eine 21 bp lange komplementäre Sequenz. In einer weiteren „*overlap extension*“-PCR mit den Oligonukleotiden DeltasmpB-1 und DeltasmpB-4 sowie den beiden ~500 bp großen Fragmenten der ersten PCR als Matrize konnten die komplementären Sequenzen hybridisieren und verlängert werden. Die so erhaltenen Fusionsprodukte (~1 kb) wurden mit XmaI und XbaI gespalten, gereinigt und in den entsprechend geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* kloniert. Nach Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts wurden fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation in *C. glutamicum* transferiert und auf BHIS-Nährböden mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Der Vektor pK19*mobsacB* wird in *C. glutamicum* nicht repliziert, daher sollte bei kanamycinresistenten Klonen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert worden sein. Zur Selektion auf ein zweites Rekombinationsereignis wurden kanamycinresistente Klone zunächst über Nacht in 5 ml BHI-Medium mit 2 % Glukose und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und danach 6 h in 5 ml CGXII-Medium mit 0,5 % Glukose aber ohne N- und P-Quelle inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl einer 1:100-, 1:500 und 1:1000-Verdünnung der Kulturen auf BHI-Nährböden mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des pK19*mobsacB*-Plasmids kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose in ihre Monosaccharide Fruktose und Glukose spaltet und Fruktose zu oligomerem Levan umsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose lethal für *C. glutamicum* ist (Jäger et al., 1992). Daher sollte bei saccharoseresistenten 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 saccharoseresistent als auch kanamycinsensitiv waren, wurden durch Kolonien-PCR mit den Oligonukleotiden DeltasmpB-out-fw und DeltasmpB-out-rv analysiert. Die Deletion anderer Gene erfolgte nach dem gleichen Verfahren.

3.9.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese von *clpP1* und *clpP2* wurde mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene® (La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Mutation wurden zwei komplementäre Oligonukleotide ausgewählt,

die im zentralen Bereich die gewünschte Mutation enthielten und außerdem eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle besaßen, die eine Unterscheidung von Ausgangsplasmid und mutiertem Plasmid mittels Restriktionsanalyse ermöglichen sollte. Für die Mutation von *clpP1* wurden die Oligonukleotide Ex-clpP1-S96G-fw und Ex-clpP1-S96G-rv und für die Mutation von *clpP2* wurden die Oligonukleotide Ex-clpP2-S108G-fw und Ex-clpP2-S108G-rv verwendet (siehe Tabelle 3.3).

Für die Mutagenesereaktion wurden folgende Ansätze hergestellt:

Mutagenesereaktion

5 µl 10 x Reaktionspuffer	
x µl Plasmid	(5-50ng)
x µl Primer-“forward”	(125 ng)
x µl Primer-“reverse”	(125 ng)
1 µl dNTP-Mix	(10 mM, jedes 2,5 mM)
1 µl <i>Pfu-Turbo</i> DNA-Polymerase	(2,5 U/µl)
ad 50 µl dH ₂ O	

Die Mutagenesereaktion wurde im Thermo-Cycler (Primus 25, MWG Biotech, Ebersberg) gemäß folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung der DNA	30 s	95°C	1 x
Denaturierung der DNA	30 s	95°C	} 16 x
Primer-Anlagerung	60 s	55°C	
Primer-Elongation (2 min/kb)	16 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*-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 16 Zyklen erhält man so ein Verhältnis 16:1 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) je Reaktionsansatz hinzugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. *E. coli*[®] XL1-Blue superkompetente Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) wurden mit 1 µl des DpnI-geschnittenen Mutageneseansatzes transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf selektive LB-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgten eine Plasmidisolierung aus mehreren Klonen und eine Analyse mit dem Restriktionsenzym NaeI, für das eine neue Schnittstelle eingefügt worden war. Eines der mutierten Plasmide wurde dann einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen.

3.9.9 DNA-Sequenzanalyse

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde das „BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt), das „DyeEx 2.0-Kit“ (Qiagen, Hilden) sowie ein ABI PRISM[®] 3100 Avant-Kapillarsequenziergerät (Applied Biosystems, Darmstadt) 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 2 Sequences“ (Tatusova und Madden, 1999) durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Clone Manager 7“ für Windows XP (Version 7.03, Scientific & Educational Software, Cary, USA).

3.10 Biochemische Methoden

3.10.1 Zellaufschluss von *C. glutamicum* mit Glasperlen

Die aus einer Flüssigkultur gewonnenen Zellen (siehe 3.6.2) wurden zum Zellaufschluss mit einem Kulturvolumen TE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min bei 4332 g). Die gewaschenen Zellen wurde in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und mit 40 µl eines Proteaseinhibitor-Mixes (100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 100 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP), in wasserfreiem Ethanol) und mit 100 µl einer

RNase A/DNase I-Lösung (0,25 mg/ml RNase A, 1 mg/ml DNase I, in 50 mM MgCl_2) versetzt. Zu der Zellsuspension wurden 1 g Zirkonium/Silica-Perlen ($\varnothing = 0,1$ mm, Roth, Karlsruhe) gegeben. Der mechanische Aufschluss erfolgte 4 mal 30 s in einem Amalgamator (Silamat, Vivadent, Ellwangen). Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 17600 g, 4 °C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (90 min bei 180000 g, 4 °C); der Überstand wurde abgenommen und zur Proteinbestimmung eingesetzt. Die Lagerung der cytosolischen Proteinfraktion erfolgte bei -20 °C.

3.10.2 Zellaufschluss mit einer French-Press-Zelle

Für den Zellaufschluss wurden *E. coli*- bzw. *C. glutamicum*-Zellen einer 100-ml-Kultur zentrifugiert (10 min bei 5500 g), mit einem Kulturvolumen Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Na_2EDTA) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min bei 5500 g). Anschließend wurde das Zellpellet in ca. 10 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und 100 μl Proteaseinhibitor-Mix (100 mM PMSF und 100 mM DFP in wasserfreiem Ethanol) sowie eine Spatelspitze DNase I hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch fünfmalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO® Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei einem Druck von 108 MPa (*E. coli*) bzw. bei einem Druck von 172 MPa (*C. glutamicum*). Anschließend wurden intakte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min bei 5525 g, 4 °C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (90 min bei 180000 g, 4 °C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Für die Proteinreinigung wurde der Überstand der Ultrazentrifugation eingesetzt.

3.10.3 Reinigung von Proteinen mit StrepTag-II

Proteine mit einem StrepTag-II (Sequenz: WSHPQFEK) wurden durch Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose gereinigt (Skerra und Schmidt, 2000). Die cytosolische Proteinfraktion wurde zunächst zur Absättigung biotinylierter Proteine mit 2 μl (*E. coli*) bzw. 10 μl (*C. glutamicum*) Avidin-Lösung (5 mg/ml, aus Hühnereiweiß, Sigma-Aldrich, Seelze) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Säule mit StrepTactin-Sepharose (2 ml Bettvolumen; IBA, Göttingen) gegeben, die zuvor mit 5 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Na_2EDTA , und 500 mM NaCl äquilibriert worden war. Nach Waschen mit 5 x 10 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Na_2EDTA , 500 mM NaCl wurde spezifisch gebundenes

Protein mit 8 x 1 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Na₂EDTA, 500 mM NaCl, 15 mM Desthiobiotin (Sigma-Aldrich, Seelze), eluiert. Die Säule wurde durch fünfmaliges Waschen mit 10 ml 100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Na₂EDTA, 500 mM NaCl, 1 mM 4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure (HABA) und zweimaliges Waschen mit je 8 ml dieses Puffers ohne HABA regeneriert und bei 4°C gelagert.

3.10.4 Entfernung von ClpP-ST aus dem Eluat der StrepTactin-Affinitätschromatographie

Um ClpP-ST aus dem Eluat der StrepTactin-Affinitätschromatographie von ClpP-ST abzureichern, wurden die vereinigten Eluatfraktionen mit Denaturierungspuffer (9 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM Na₂EDTA, 500 mM NaCl) in einem Verhältnis von 10:1 von Denaturierungspuffer zu Eluat versetzt und über Nacht bei 4 °C sowie anschließend 1 h bei RT inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die homoheptameren ClpP-Komplexe zu denaturieren und die co-gereinigten Proteine aus dem ClpP-ST-Komplex freizusetzen. Um nun das mengenmäßig dominante ClpP-ST-Protein zu entfernen, wurde das Denaturierungsgemisch konzentriert und entsalzt (siehe 3.10.5) und anschließend nochmals auf eine StrepTactin-Säule gegeben. Dadurch wird ein Großteil von ClpP-ST gebunden, während sich die co-gereinigten Proteine im Durchlauf befinden. Dieser Durchlauf wurde anschließend mittels 2D-PAGE und MALDI-ToF-Massenspektrometrie untersucht.

3.10.5 Konzentration von Proteinen

Die Konzentrierung und Entsalzung von Proteinen wurde mit Hilfe von Vivaspin-Mikrokonzentratoren (Vivascience AG, Hannover) mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa (ClgR) oder 10 kDa (ClpP) durch mehrmaliges Waschen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.10.6 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce (Rockford, USA). Das Prinzip des BCA-Protein-Assays beruht auf der Reduktion von zweiwertigen Cu-Ionen zu einwertigen Cu-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Durch die anschließende Chelatbildung von zwei Molekülen BCA (Bicinchoninsäure) mit einem Cu⁺-Ion wird ein blau-violetter Komplex gebildet, der

stark bei 562 nm absorbiert. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches linear zur Proteinkonzentration. Sie wurde mit einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer von GE Healthcare (München) verfolgt. Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wurde aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) eine Verdünnungsreihe (von 5 µg/ml bis 2 mg/ml) hergestellt und je 50 µl der verschiedenen Verdünnungen mit 1 ml Arbeitsreagenz versetzt, das durch Mischen von BCA-Reagenz A mit dem BCA-Reagenz B (50:1) hergestellt worden war. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption bei 562 nm gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Die Proteinkonzentration jeder Proteinprobe wurde aus zwei verschiedenen Verdünnungen in jeweils zweifacher Ausführung bestimmt.

3.10.7 N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen

Um den N-Terminus von ClgR zu bestimmen wurde ClgR mit einem C-terminalen StrepTag-II plasmidkodiert in *C. glutamicum* $\Delta clpC$ $\Delta clgR$ und *E. coli* BB1553 überproduziert, über StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt, konzentriert und durch die Firma 4baselab (Reutlingen) einer N-terminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau unterzogen.

3.10.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrer Masse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970; Schagger und von Jagow, 1987) in vertikalen Gelkammern (MiniProtean-II-Apparatur, BioRad, München) durchgeführt. Es wurden 10 bis 15 %-ige Trenngele und 4 %-ige Sammelgele genutzt. Die Proben wurden mit $\frac{1}{5}$ Volumen sechsfach konzentriertem Ladebuffer (350 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 6 % β -Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin) gemischt und 10 min bei 96 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein™ Standard (Biorad, München) verwendet. Die Trennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (25 mA pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V.

3.10.9 Western-Blot

Zum Nachweis von Proteinen mit polyklonalen Antikörpern wurden die mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond C

Extra, Bindekapazität 80-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, GE Healthcare, München oder Protran®, Bindekapazität 75-110 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Whatman, Dassel) in „semi-dry“ Technik transferiert. Die auf Gelgröße zugeschnittene Membran wurde 5 min und das SDS-Gel 15 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol; pH uneingestellt bei ca. 8,3) äquilibriert. Der Western-Blot-Aufbau erfolgte nach der „Sandwich“-Technik. Zwischen zwei Lagen von mit Towbin-Puffer angefeuchtetem Whatman-Papier wurden die Membran und das Gel gelegt. Mit der Membranseite zur Anode wurde das Sandwich auf eine Trans-Blot Semi-dry Transfer-Cell (Biorad, München) gelegt. Der Transfer erfolgte für 30 min bei maximal 8,6 mA/cm² (15 V-Limitierung) pro Gel. Bei zwei oder mehr zu blottenden Gelen wurde die Volt-Limitierung auf 20 V erhöht. Danach wurde die Membran in PBS mit 5 % (w/v) Magermilch 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und fünf mal 5 min mit 50 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die gewaschene Membran mit den aus Kaninchen gewonnenen Antikörpern gegen PhoR (Anti-PhoR SA32 1:10000 verdünnt in 20 ml PBS mit 0,5 % (w/v) BSA) ca. 2 h unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran erneut drei mal 5 min mit 50 ml PBS gewaschen. Der zweite, aus der Ziege gewonnene Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG-AP, Sigma-Aldrich, Seelze), der spezifisch die nicht-variable Region von Kaninchen-IgG erkennt und zu Detektionszwecken an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, wurde dann in 20 ml PBS mit 0,5 % (w/v) BSA) 1:10000 verdünnt und die Membran ca. 1 h unter Schütteln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 min in PBS gewaschen und in 20 ml AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) äquilibriert. Die Farbdetektion erfolgte für 30 min mit 7,5 mg NBT (Nitroblautetrazolium) und 5 mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) in 25 ml AP-Puffer. Zum Stoppen der Farbreaktion wurde die Membran mehrmals kurz mit dH₂O gewaschen und unter Lichtausschluss getrocknet.

3.10.10 Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen

Um die Halbwertszeit von PhoR und verschiedenen Derivaten zu bestimmen, wurden die Stämme *C. glutamicum* ΔphoR bzw. $\Delta\text{c/pC}$ mit den jeweiligen Plasmiden über Nacht in BHI-Medium mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (ΔphoR -Stämme) bzw. in BHI-Medium mit 2 % Glukose und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin ($\Delta\text{c/pC}$ -Stämme) bei 30 °C und 170 Upm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur im gleichen Medium zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (ΔphoR -Stämme) bzw. zu einer OD₆₀₀ von 1 ($\Delta\text{c/pC}$ -Stämme) angeimpft. Die Synthese von plasmidkodiertem PhoR bzw. den PhoR-Derivaten wurde bei einer OD₆₀₀ von 3-4 mit 1 mM IPTG induziert. Nach einer Stunde wurde eine 1-ml-Probe entnommen, zentrifugiert (1 min bei 17300 g) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend

wurde sowohl die Transkription mit 250 µg/ml Rifampicin als auch die Translation mit 100 µg/ml Tetracyclin gehemmt. Bis 70 min nach Zugabe der Hemmstoffe wurde im 10-min-Takt eine 1-ml-Probe entnommen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 ml TE gewaschen (10 min bei 17300 g und 4 °C) und in 200 µl TE resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde bestimmt und darauf basierend 100 µl-Proben für die SDS-PAGE hergestellt, die alle die gleiche Menge an Zellen enthielten (OD₆₀₀ = 20). Dazu wurde das benötigte Volumen aus der 200-µl-Zellsuspension in TE-Puffer abgenommen, 7 min bei 17300 g zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 3.10.8) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte in einem Reaktionsgefäßschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 1400 Upm und 96 °C für 15 min. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 17300 g zentrifugiert und je 20 µl des Überstandes (entspricht Zellen aus 1 ml Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,4) mittels einer SDS-PAGE getrennt und einer Western-Blot-Analyse mit Anti-PhoR-Antikörpern unterzogen. Die Intensitäten der im Western-Blot auftretenden PhoR-Banden wurden mit Hilfe der AIDA-Software Version 2.41 (Raytest GmbH, Straubenhardt) ausgewertet. Die Bestimmung der Halbwertszeit erfolgte durch exponentielle Regression der Intensitäten gegen die Zeit mit Hilfe der Excel-Software (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

3.10.11 Färbung von Proteinen in SDS-Gelen mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau

Für die Detektion der Proteine wurden die SDS-Gele mit kolloidalem Coomassie (Nachweisgrenze: 50-200 ng pro Bande) gefärbt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die SDS-Gele dreimal ca. 15 min mit dH₂O gewaschen, mind. 1 h in ca. 20 ml GelCode® Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, USA) gefärbt und dann überschüssige Färbelösung durch Waschen in dH₂O (mind. 1 h) entfernt.

3.10.12 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen

Zum Nachweis geringerer Proteinmengen (Nachweisgrenze: 0,1-1 ng) wurde die Silberfärbung genutzt (Blum et al., 1987). Hierfür wurden die Gele mindestens 30 min in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig und 500 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro Liter) inkubiert und dann 2 x 10 min in 30 % (v/v) Ethanol und einmal 10 min mit H₂O dest. gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung (0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) und anschließend 3 x 20 s Waschen in dH₂O. Als nächstes wurde das Gel 20 min in frisch angesetzter Silbernitratlösung (0,2 % (w/v) AgNO₃, 75 µl 37 % (v/v)

Formaldehyd pro 100 ml) inkubiert und wieder 3 x 20 s mit dH₂O gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 3 % (w/v) Na₂CO₃, 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat und 500 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro Liter. Nach ausreichender Färbung wurden die Gele 2 x kurz mit Wasser gespült und dann 10 min in Stop-Lösung (50 mM Na₂EDTA) geschüttelt.

3.10.13 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) werden Proteine aufgrund zweier voneinander unabhängiger Eigenschaften getrennt. Die erste Dimension trennt die Proteine wegen der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (pI), die zweite Dimension aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts (Schaffer et al., 2001). Alle Materialien und Geräte stammten von GE Healthcare (München). Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 300 µg der Proteine mit 9 Volumen Aceton über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die gefällten Proteine zentrifugiert (10 min bei 17600 g und 4 °C) und getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte durch Zugabe von 350 µl Solubilisierungspuffer (9 M Harnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 1 % (w/v) DTT, 1 % (w/v) Pharmalyte 3-10 NL) und kräftiges Schütteln (1400 Upm in einem Thermomixer Comfort 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Proteinlösung luftblasenfrei zwischen die beiden Elektroden der Keramikschiffchen pipettiert, die für den entsprechenden pH-Bereich ausgewählten Fertiggelstreifen (18 cm Immobiline DryStrip, pH 4-7) ebenfalls luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten aufgelegt und mit 2 ml Immobiline DryStrip Cover Fluid überschichtet. Für die isoelektrische Fokussierung in einem IPGphor IEF System wurden folgende Parameter verwendet: 5 h 30 V, 5 h 60 V, 1 h 200V, 1 h 500 V, 1 h 2000 V, linearer Gradient innerhalb 30 min auf 8000 V, 22,5 h 8000 V bis ca. 200 kVh. Danach wurden die IEF-Gelstreifen entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die zweite Dimension äquilibriert. Dazu wurden die IEF-Gelstreifen mit der Gelseite nach oben in eine Plexiglaswanne gelegt, mit 10 ml Äquilibrierungslösung A (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 185 mM DTT (im Ultraschallbad gelöst) und 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v)) überschichtet und 20 min geschüttelt. Danach wurden die IEF-Gelstreifen ebenfalls 20 min in 10 ml Äquilibrierungslösung B (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 216 mM Iodacetamid (im Ultraschallbad gelöst) und 100 µl Bromphenolblau-Lösung (0,25 % (w/v)) gelegt und geschüttelt. Anschließend wurden die Gelstreifen kurz mit dH₂O gespült und für die zweite Dimension verwendet. Die SDS-Gelelektrophorese in der zweiten Dimension erfolgte in Horizontal-Elektrophoresekammern (Multiphor II). Die auf 15 °C temperierten Kühlplatten wurden

mit 2 ml Immobiline DryStrip Cover Fluid vollständig benetzt, die Fertig-Gradientengele (ExcelGel XL SDS 12-14 %) entsprechend der Polarität auf die Kühlplatten gelegt und vorhandene Luftblasen zwischen Gel und Platte herausgestrichen. Nach dem Entfernen der Schutzfolie wurden die Anoden- und Kathodenpufferstreifen (ExcelGel SDS Buffer Strips) blasenfrei an den äußeren Begrenzungen der Gele platziert. Die äquilibrierten Gelstreifen wurden mit der Gelseite nach unten ca. 2 mm unterhalb des Kathodengelstreifens gelegt und die Luftblasen zwischen Fertiggel und Gelstreifen entfernt. Auf die gleiche Höhe wie der Gelstreifen wurde ein feuchtes Filterpapier gelegt und mit 10 µl Protein-Größenstandard (Precision Plus Protein™ Standard, Biorad, München) versetzt. Um eine effiziente Elektrophorese zu erhalten, wurden die Elektrodenhalter so positioniert, dass sich die Elektroden genau über der Mitte der Gelstreifen befanden. Es folgte der Vorlauf mit 20 mA pro Gel bei 100 V für 45 min. Danach wurden IEF-Gelstreifen und Filterplättchen vom Fertiggel entfernt und der Hauptlauf mit 40 mA pro Gel bei 800 V für 160 min gestartet. Nach dem Hauptlauf wurden die Pufferstreifen entfernt und die Proteine entweder mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250 oder mit Silber gefärbt. Für die Coomassie-Färbung 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 Brilliant Blau G-250 in dH₂O) versetzt, die Färbeschalen mit Parafilm luftdicht verschlossen und über Nacht weiter geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Gele 3 mal 20 min mit dH₂O gewaschen, oberflächlich anhaftender Farbstoff durch kurzes Waschen (1 min) mit 30 % (v/v) Methanol entfernt, die Gele nochmals 15 min mit dH₂O gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Silberfärbung erfolgte wie in 3.10.8 beschrieben.

3.10.14 MALDI-ToF Massenspektrometrie

Für Peptidmassen-, „Fingerprint“-Analysen wurden Gelstückchen aus Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten. Während Coomassie-gefärbte Gelstückchen durch die Inkubation in Ammoniumbicarbonat und Acetonitril entfärbt werden, mussten Silber-gefärbte Gelstückchen mit Hilfe der Destainer A- und B-Lösungen des „ProteoSilver™ Plus Silver Stain-Kits“ (Sigma-Aldrich, Seelze) nach Angaben des Herstellers entfärbt werden. Die Proteine wurden nach Fountoulakis und Langen (1997) im Gel tryptisch verdaut. 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 4 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/µl Trypsin (Promega, Mannheim) rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 6 µl 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei 37 °C

verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 12 µl Wasser, 15 min Inkubation bei RT, Zugabe von 10 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und nochmals 10 min Inkubation bei RT eluiert. Anschließend wurden die Peptide mittels einer Mikrochromatographiesäule „ZipTip® C₁₈ standard bed“ (Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers gereinigt und konzentriert, mit 3 µl gesättigter α-Cyano-4-hydroxymizsäure in 50 % (v/v) Acetonitril/0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure eluiert und auf die Probenplatte aufgetragen. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der Calibration Mixtures 1 und 2 des „Sequazyme Peptide Mass Standard Kits“ (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Darmstadt) 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, Darmstadt) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Suche in einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen mit Hilfe des MS-Fit-Programms (Clauser et al., 1999) genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 „Fangen“ von Clp-Protease-Substraten *in vivo*

Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zur *E. coli* ClpXP-Protease zeigten, reichern sich Proteine, die ein ClpX-abhängiges Degradationssignal tragen, im proteolytischen Kern der Protease an, wenn ClpP chemisch oder genetisch (durch Austausch des katalytisch aktiven Serins gegen Cystein) inaktiviert wurde (Ortega et al., 2000 und 2002). Flynn et al. (2003) nutzten diesen Umstand zum „Fangen“ von ClpXP-Substraten *in vivo*. Dabei konstruierten sie einen sog. Substratfallenstamm, in dem das Gen für die alternative Clp-ATPase *clpA* und das Gen der Clp-Peptidase *clpP* deletiert sowie das „Ribosomen-Rettungssystem“ durch Deletion von *smpB* inaktiviert wurde. Ein plasmidkodiertes, inaktives ClpP-Derivat mit einem C-terminalem Reinigungs-„Tag“ (ClpP_{in}-Tag) wurde in diesem Stamm produziert, ClpP_{in} zusammen mit seinen putativen Substraten über Affinitätschromatographie gereinigt und die Identität der Substrate bestimmt (Abbildung 4.1).

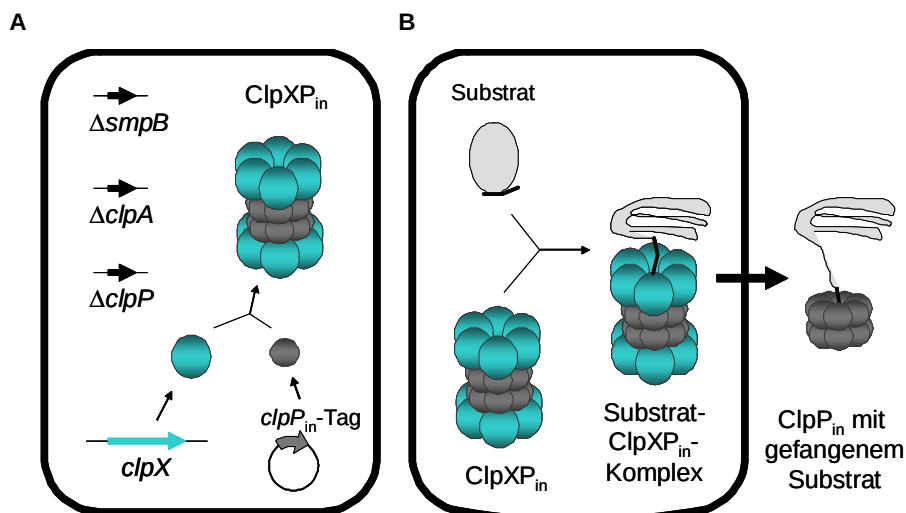


Abbildung 4.1: Modell des Fangens von Substraten der *E. coli* ClpXP-Protease *in vivo*. (A) Aufbau der Substratfalle und genetischer Hintergrund. (B) Prinzip des Fangens *in vivo*. Ein zum Abbau markiertes Substrat wird durch ClpX erkannt, entfaltet und in den proteolytischen Kern transloziert, wo es aufgrund der Inaktivierung von ClpP nicht abgebaut wird.

Dieses Prinzip soll nun für die ClpCP-Protease aus *C. glutamicum* angewendet und etabliert werden.

4.1.1 Konstruktion der Substratfallenstämme

Wie aus früheren Studien bekannt ist (Strösser et al., 2004), sind die Gene für die alternativen ClpP-Peptidasen *clpP1* und *clpP2* essentiell in *C. glutamicum* und können nicht deletiert werden. Es wurde ein Stamm konstruiert, bei dem die Expression des *clpP1P2*-Operons durch den Tetracyclin-Repressor (TetR) kontrolliert wird. Der native *clpP1P2*-Promotor wurde durch den *tetA*-Promotor des Transposons Tn10 ersetzt, was die Bindung von plasmidkodiertem TetR erlaubt. In Gegenwart von Anhydrotetracyclin (ATC), einem nicht bakteriostatisch wirkenden Derivat von Tetracyclin, ist der Repressor durch Bindung von ATC inaktiv. In Abwesenheit von ATC bindet der Repressor an den *tetA*-Promotor und hemmt die Expression von *clpP1P2*. Dieses Kontroll-System sollte auch für die Konstruktion der Substratfallenstämme von ClpCP1 und ClpCP2 angewendet werden. Daher wurde der Stamm mit dem *clpP1P2*-Promotoraustausch (*C. glutamicum* P_{tetA}-*clpP1P2*) als Ausgangsstamm für die weiteren gentechnischen Arbeiten zur Konstruktion der Substratfallenstämme benutzt. Als erster Schritt sollte das Ribosomen-Rettungssystem inaktiviert werden. Die Deletion des *ssrA*-Gens, das die tmRNA kodiert, wäre dazu der naheliegendste Ansatz. Allerdings war in vorangegangenen Versuchen eine solche Deletion in *C. glutamicum* nicht gelungen (Steffen Schaffer, persönliche Mitteilung). Außerdem zeigten *ssrA*-Deletionsstämme von *E. coli* oder *B. subtilis* starke Beeinträchtigungen im Vergleich zum Wildtyp wie z. B. eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika oder Hitze (Karzai et al., 1999; Wiegert und Schumann, 2001). Weitere Untersuchungen des Ribosomen-Rettungssystems in *E. coli* zeigten, dass zwei Proteine essentiell für die Bindung der tmRNA an die A-Seite des Ribosoms sind. Neben dem Elongationsfaktor EF-Tu wird das SmpB-Protein benötigt (für eine Zusammenfassung siehe Withey und Friedman, 2003). SmpB-Proteine sind innerhalb der *Eubacteria* hochkonserviert (Karzai et al., 1999). Ein Gen, dessen Produkt für ein SmpB-homologes Protein kodiert, ist auch in *C. glutamicum* vorhanden (*cg0916*, Abbildung 4.2). Untersuchungen zu SmpB-Homologen aus *B. subtilis* (Wiegert und Schumann, 2001; 54 % Sequenzidentität zu Cg0916;) und *Streptomyces lividans* (Braud et al., 2005; 54 % Sequenzidentität zu Cg0916) zeigen, dass SmpB die gleiche Funktion auch in Gram-positiven Bakterien ausübt.

Cgl	1	MAKKKKKVDENNSVLATNRKARHDYHITIDTWEAGVVLGGTEIKSLREGKVSLSVDSFATID
Mtu	1	VSKSSR---GGRQIVASNRKARHNYSTIEVEAGVALOGTEVKSLREGQASLADSFATID
Sco	1	MAKEKG-----RKLIAQNKKARHDYQITLDTYEAGLVLGGTEVKSLRQGRASLADGCFVQID
Blo	42	MPKETG-----EKLTIVONKKARHDYATIEDKYEAGLALGGTEVKSLREGRASLSEAFISID
Bsu	1	MPKGGG-----KVLSONKKANHDYFIEETYEITGIVLQGTETKSTRAGRVNLKDSFAKIE
Eco	1	MTKKKAHK-PGSATIALNKKARHEYFIEEEFEAGLALOGWEVKSLRASKANISDSYVLLR

Cgl	61	N-GEVWLQHLHIPOYSMG-SWTNHTPKRTRKLLLRNEIDSLMGKVRDGNRTLVPKLKLYL
Mtu	58	D-GEVWLRNAHIPEYRHG-SWTNHEPRNRKLLLRQIDTLVGKIREGNFALVPLSLYF
Sco	56	G-HEAWLHNHVPYSGG-TWTNHSARRKRKLLLRVEIDKLESKSQETGHTIVPLALYF
Blo	97	RRGEVWLEGANIPEYLNG-TWNNHAPKRKRKLLLRLOITKLARGTEAKGYTIVPLSLYF
Bsu	55	R-GEVFLHNMHSPYEGG-NRYNHDPLRTRKLLMHRKEINKLTGLTKKGYSLVPLKLYL
Eco	60	D-GEAFELFGANITPMAVASTHVVCDFTRTRKLLLNQREIDSLYGRVNRGYTIVALSLYL

Cgl	119	KNGRVKLELGLAQGGKQDYDKRODIKRRTEEREVTRELGRIKGINA
Mtu	116	AEGVKVELALARGKQARDKRODMAREVLRRELGRRAKGMT-
Sco	114	KDGRKVEIALARGKKEYDKROILREKQDRREARTISAIKRQRA
Blo	156	KDGRVKAETIALARGKKEFDKROALREEQDKREALRAMRYANMRH--
Bsu	113	KNGFAKVLGLGKGGKKNYDKREDLKRDAKRETERAFRDSQKGF--
Eco	119	KNWCKVKIGVAKGKKOHDKRSIKEREWQVQKARIIMNAHR----
		**

Abbildung 4.2: Sequenzalignment der SmpB-Proteine aus *Corynebacterium glutamicum* (Cgl), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu), *Streptomyces coelicolor* (Sco), *Bifidobacterium longum* (Blo), *Bacillus subtilis* (Bsu) und *Escherichia coli* (Eco). Die einzelnen Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) verglichen. Mit * sind konservierte Aminosäuren markiert, die für die Bindung der tmRNA an SmpB essentiell sind (Dulebohn et al., 2006).

4.1.1.1 Deletion der Gene *smpB*, *clpE* und *clpX* in dem Stamm *C. glutamicum* P_{tetA-clpP1P2}

Um das Ribosomen-Rettungssystem in *C. glutamicum* zu inaktivieren, wurde zunächst eine „in frame“-Deletion des *smpB*-Gens in *C. glutamicum* P_{tetA-clpP1P2} mittels des Plasmids pK19mobsacB-Δ*smpB* (Abbildung 7.13) durchgeführt und der Stamm *C. glutamicum* Δ*smpB* P_{tetA-clpP1P2} konstruiert. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es in *C. glutamicum* drei Clp-ATPasen, die mit den ClpP-Peptidasen interagieren können, ClpC, ClpE und ClpX. Um nun selektiv Substrate der ClpCP1- bzw. ClpCP2-Protease zu identifizieren, müssen die Gene der beiden anderen Clp-ATPasen deletiert werden. Dazu wurde zunächst im Stamm *C. glutamicum* Δ*smpB* P_{tetA-clpP1P2} das *clpE*-Gen „in frame“ deletiert, so dass der Stamm *C. glutamicum* Δ*smpB* Δ*clpE* P_{tetA-clpP1P2} entstand. In diesem Stamm wurde als nächstes das *clpX*-Gen „in frame“ deletiert (*C. glutamicum* Δ*smpB* Δ*clpE* Δ*clpX* P_{tetA-clpP1P2}). Die drei chromosomalen Deletionen wurden durch Kolonie-PCR überprüft. Mit den Oligonukleotiden DeltasmpB-out-fw/DeltasmpB-out-rv ergab sich für den Wildtyp ein Fragment von 1600 bp und für die Deletionsmutante ein Fragment von 1183 bp (Abbildung 4.3A). Die Deletion von *clpE* wurde mit den Oligonukleotiden DeltaclpE-out-fw/DeltaclpE-out-rv überprüft. Für die

Wildtyp-Situation wurde ein Fragment von 2843 bp erhalten, für den Deletionsstamm ein Fragment von 955 bp (Abbildung 4.3B). Bei Deletion von *clpX* wurde mit den Oligonukleotiden DeltacpX-out-fw/-rv bei der Wildtyp-Situation ein Fragment von 1401 bp generiert, während bei Deletion ein Fragment von 775 bp entstand (Abbildung 4.3C). Der Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* enthält also alle gewünschten Deletionen.

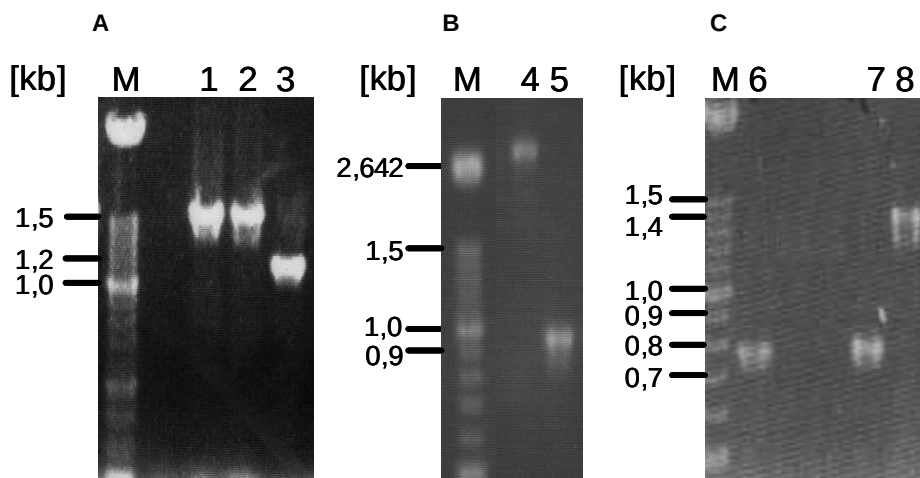


Abbildung 4.3: Kolonie-PCR zur Kontrolle der Deletion von *smpB* (A), *clpE* (B) und *clpX* (C). Saccharoseresistente und kanamycinsensitive Klone wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden DeltasmpB-out-fw/DeltasmpB-out-rv (A), mit den Oligonukleotiden DeltacpE-out-fw/DeltacpE-out-rv (B) sowie mit den Oligonukleotiden DeltacpX-out-fw/-rv (C) analysiert. Die Klone in den Spuren 1, 2, 4 und 8 zeigen die für den Wildtyp erwarteten Fragmentgrößen, die Klone 3, 5, 6 und 7 die für eine erfolgreiche Deletion erwarteten Fragmentgrößen. Mit M ist der Restriktionslängenstandard XIV (Roche Diagnostics, Mannheim) bezeichnet.

4.1.1.2 Gerichtete Mutagenese von *clpP1* und *clpP2*

Carsten Ludwig (2002) konnte in seiner Diplomarbeit bereits die Plasmide pXMJ19-*clpP1*-ST und pXMJ19-*clpP2*-ST zur Überproduktion und Affinitätsreinigung von ClpP1 und ClpP2 mittels eines C-terminalen StrepTag-II konstruieren. Diese beiden Plasmide wurden benutzt, um durch gerichtete Mutagenese die Codons für das katalytisch aktive Serin (Ser96 bei ClpP1 und Ser108 bei ClpP2) gegen ein Glycin-Codon auszutauschen. Dieser Austausch inaktiviert die proteolytischen Untereinheiten und sollte die Co-Reinigung von Substraten ermöglichen. Die Plasmide wurden als Matrize verwendet und die Mutationen durch die Oligonukleotidpaare EX-clpP1-S96G-fw/EX-clpP1-S96G-rv bzw. EX-clpP2-S108G-fw/EX-clpP2-S108G-rv eingeführt. Durch den Austausch wurde

eine zweite NaeI-Restriktionsschnittstelle in jedes der beiden Plasmide eingeführt. Der Erfolg des Austausches wurde durch Restriktion der neu konstruierten Plasmide pXMJ19-*clpP1**-ST (Abbildung 7.14) und pXMJ19-*clpP2**-ST (Abbildung 7.15) kontrolliert (Abbildung 4.4). Dabei ergaben sich Fragmente der Größen 3989 bp und 3281 bp für pXMJ19-*clpP1**-ST (Spur 2, Abbildung 4.4) bzw. 3986 bp und 3295 bp für pXMJ19-*clpP2**-ST (Spuren 5-8, Abbildung 4.4). Neben diesen Fragmenten waren in den Spuren 4-8 ein weiteres Fragment von ca. 7 kb zu erkennen. Dabei könnte es sich um unvollständig gespaltenes, mutiertes Plasmid handeln (für Spur 4: 7267 bp und für die Spuren 5-8: 7281 bp). In den Spuren 1 und 3 erkennt man ein Fragment gleicher Größe. Aufgrund der fehlenden Spaltprodukte von 3989 bp und 3281 bp, die man bei vollständiger Restriktion von pXMJ19-*clpP1**-ST mit NaeI erwarten würde, handelt es sich dabei vermutlich um einfach gespaltenes unmutiertes Plasmid pXMJ19-*clpP1*-ST. Weiterhin ist ein Fragment von ca. 12 kb in den Spuren 1 und 3 erkennbar, deren Herkunft unklar ist. Die durch Restriktion mit NaeI positiv getesteten Plasmide wurden abschließend durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pXMJ19-for und pXMJ19-rev bestätigt.

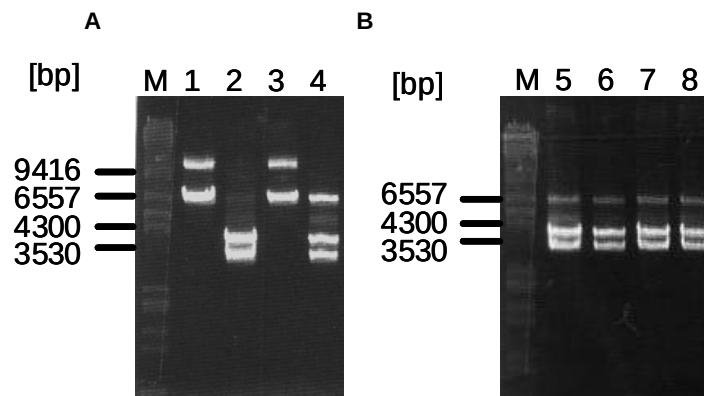


Abbildung 4.4: Restriktion von pXMJ19-*clpP1**-ST (A) und pXMJ19-*clpP2**-ST (B) mit NaeI zur Kontrolle des Serin96-Glycin- bzw. Serin108-Glycin-Austausches durch gerichtete Mutagenese. Nur die Spur 2 zeigt die beiden erwarteten Fragmente der gewünschten Größen. In Spur 4 ist zusätzlich zu den erwarteten Fragmenten ein drittes Fragment zu erkennen, das vermutlich aus unvollständiger Spaltung von pXMJ19-*clpP1**-ST stammt. Die Spuren 1 und 3 zeigen wahrscheinlich unmutiertes Plasmid pXMJ19-*clpP1*-ST sowie eine weitere Bande unbestimmter Herkunft. In den Spuren 5-8 sind die zwei erwarteten Fragmente des mutierten Plasmids pXMJ19-*clpP2**-ST sowie ein drittes Fragment, das vermutlich aus unvollständiger Spaltung stammt, zu sehen. Mit M ist das Restriktionslängenstandard-Gemisch II und III (Roche Diagnostics, Mannheim) bezeichnet.

4.1.1.3 Konstruktion von ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP}

Nachdem die Plasmide pXMJ19-*clpP1**-ST und pXMJ19-*clpP2**-ST erfolgreich konstruiert werden konnten, wurde der Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* mit diesen Plasmiden transformiert. Die neuen Stämme *C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* pXMJ19-*clpP1**-ST und *C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* pXMJ19-*clpP2**-ST tragen somit Plasmide zur Synthese eines inaktiven ClpP-Derivats mit einem C-terminalem StrepTag-II. Da die Expression des chromosomalen *clpP1P2*-Operons durch TetR kontrolliert werden soll, wurden die beiden Stämme mit dem Plasmid pJC1- P_{gap} -*tetR* (Strösser et al., 2004) transformiert. Es trägt das *tetR*-Gen unter der Kontrolle des starken, konstitutiven Promotors des *gap*-Gens (*cg1791* = Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die daraus resultierenden Substratfallenstämme wurden ClpCP1^{TRAP} (*C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* pXMJ19-*clpP1**-ST pJC1- P_{gap} -*tetR*) und ClpCP2^{TRAP} (*C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* pXMJ19-*clpP2**-ST pJC1- P_{gap} -*tetR*) genannt. Um zu überprüfen, ob diese Stämme alle Deletionen und das mutierte Plasmid trugen, wurden kanamycin- und chloramphenicolresistente Klone einer Kolonie-PCR unterzogen. Neben der Überprüfung der drei Deletionen wurde mit den Oligonukleotiden pXMJ19-for und pXMJ19-rev auf die Anwesenheit des pXMJ19-Plasmides getestet. Dabei ergeben sich Fragmente von 869 bp für pXMJ19-*clpP1**-ST und von 880 bp für pXMJ19-*clpP2**-ST (Abbildung 4.5). Somit konnten die beiden Substratfallenstämme ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} erfolgreich konstruiert werden.

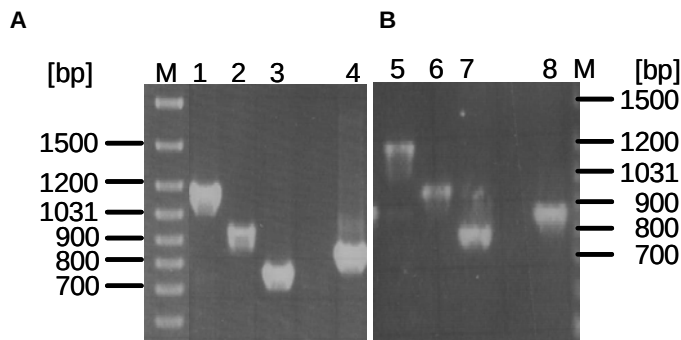
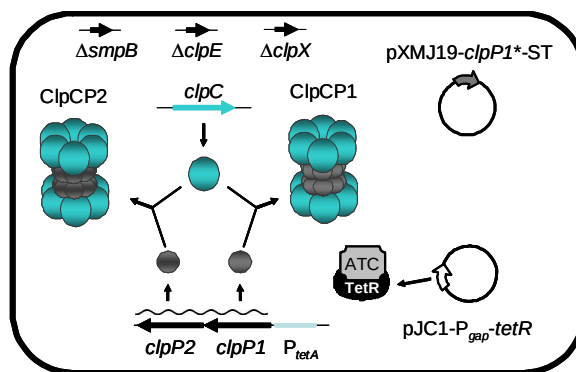


Abbildung 4.5: Kolonie-PCR zur Kontrolle der Substratfallenstämme ClpCP1^{TRAP} (A) und ClpCP2^{TRAP} (B). Die Spuren 1 und 5 zeigen das für die *smpB*-Deletion erwartete Fragment, die Spuren 2 und 6 das für die *clpE*-Deletion erwartete Fragment und die Spuren 3 und 7 das für die *clpX*-Deletion erwartete Fragment. Die Spur 4 zeigt das erwartete Fragment des Plasmids pXMJ19-*clpP1**-ST und die Spur 8 das erwartete Fragment des Plasmids pXMJ19-*clpP2**-ST. Mit M ist der Restriktionslängenstandard GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot) bezeichnet.

4.1.2 Co-Reinigung von Substraten mit ClpP

Die beiden Stämme zur Co-Reinigung von Substraten der ClpCP1- und ClpCP2-Protease konnten erfolgreich konstruiert werden. Es sollte nun getestet werden, ob die Stämme tatsächlich geeignet sind, Substrate von ClpCP co-zureinigen. Dazu sollte das zur Bestimmung des *E. coli* ClpXP-Substratspektrums gewählte experimentelle Vorgehen an *C. glutamicum* angepasst werden (Abbildung 4.6).

A



B

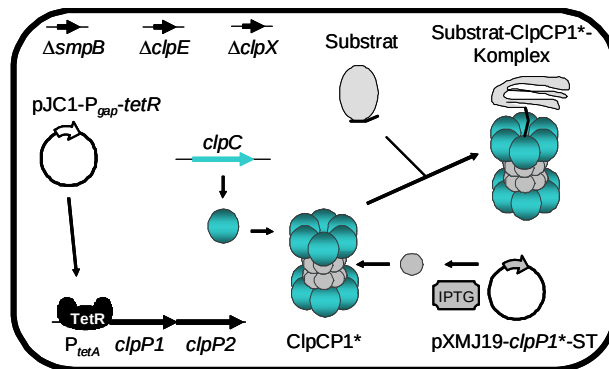


Abbildung 4.6: Modell der Vorgehensweise zum Fangen von Substraten der *C. glutamicum* ClpCP1-Protease *in vivo*. (A) In Anwesenheit von Anhydrotetracyclin (ATC) wird TetR an der Repression des chromosomalen *clpP1P2*-Operons gehindert. Es wird Wildtyp-ClpP1 und Wildtyp-ClpP2 gebildet. Diese lagern sich mit ClpC zu den aktiven ClpCP-Proteasen zusammen (B) In Abwesenheit von ATC bindet TetR an den *tetA*-Promotor und reprimiert das chromosomale *clpP1P2*-Operon. Gleichzeitig wird mit IPTG die Expression von *clpP1*-ST* induziert. Inaktives ClpP1 mit einem C-terminalem StrepTag-II lagert sich mit ClpC zur inaktiven ClpCP1*-Protease zusammen. Diese kann Substrate noch erkennen, entfalten und in den ClpP-Kern translozieren. Dort können sie aber aufgrund der Inaktivierung nicht mehr degradiert werden und bleiben gefangen.

Um ein Wachstum der Substratfallenstämmen zu gewährleisten, muss das chromosomale *clpP1P2*-Operon zunächst exprimiert werden. Es steht unter der Kontrolle des plasmidkodierten Tet-Repressors, dessen Strukturgen in *pJC1-P_{gap}-tetR* durch den starken *gap*-Promotor konstitutiv exprimiert wird. Damit TetR nicht an den *tetA*-Promotor vor *clpP1P2* bindet und die Transkription des essentiellen *clpP1P2*-Operons hemmt, muss dem Medium ATC zugesetzt werden. TetR bindet ATC mit einer Dissoziationskonstante K_D von 10^{-9} M. Somit wird natives ClpP1 und ClpP2 gebildet und sowohl die ClpCP1- als auch die ClpCP2-Protease können in aktiver Form assembliert werden. Aufgrund der Deletion von *clpE* und *clpX* können keine weiteren ClpP-Komplexe gebildet werden. Weiterhin kann die Zelle aufgrund der *smfB*-Deletion durch defekte mRNA inaktivierte Ribosomen nicht mehr retten (Abbildung 4.6A). Sollen nun ClpC-Substrate „gefangen“ und eine Co-Reinigung mit inaktivem ClpP* ermöglicht werden, wird ATC aus dem Medium entfernt und TetR bindet an den *tetA*-Promotor. Dadurch wird die Transkription des chromosomalen *clpP1P2*-Operons reprimiert; es kann kein ClpP1 bzw. ClpP2 gebildet werden. Gleichzeitig wird die Synthese der plasmidkodierten, inaktiven ClpP-Derivate (*pXMJ19-clpP1*-ST* bzw. *pXMJ19-clpP2*-ST*) mit IPTG induziert. Durch die fehlende Neusynthese aktiver ClpP-Proteine werden vermehrt inaktive ClpCP*-Protease-Komplexe (ClpCP*) gebildet (siehe Abbildung 4.6B).

Untersuchungen zur konditionalen *clpP*-Mutante (*C. glutamicum* *P_{tetA}-clpP1P2* *pJC1-P_{gap}-tetR*) zeigten (Engels, 2004), dass diese auf LB-Medium mit 4 % Glukose und 200 ng/ml ATC bis zu einer OD_{600} von 40 nach 24 h wachsen kann. In Abwesenheit von ATC erreicht der Stamm nur eine OD_{600} von 20 nach 24 h, bedingt durch die TetR-vermittelte Repression des chromosomalen *clpP1P2*-Operons und die dadurch verursachte Hemmung der Neusynthese von ClpP1 und ClpP2. Das gleiche Wachstumsverhalten wurde auch für die Substratfallenstämmen ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} erwartet. Um dies zu überprüfen, wurden die beiden Stämme in LB-Medium mit 4 % Glukose und 200 ng/ml ATC vorkultiviert. Zum Animpfen der Hauptkultur wurden die Zellen zweimal mit 0,9 % NaCl gewaschen auf eine OD_{600} von 1 sowohl mit als auch ohne ATC angeimpft. Entgegen der Erwartung zeigten beide Stämme in Abwesenheit von ATC ein vergleichbares Wachstum wie in Anwesenheit von ATC und erreichten nach 24 h eine OD_{600} von ca. 40. Ausgehend von dieser Kultur wurde eine weitere Hauptkultur mit einer OD_{600} von 1 auf LB-Medium mit 4 % Glukose angeimpft. Wiederum erreichte die Hauptkultur eine OD_{600} von ca. 40 nach 24 h. Eine Wachstumslimitierung durch die postulierte Abnahme der zellulären ClpP1- und ClpP2-Konzentration war nicht zu beobachten. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden. Die Anwesenheit von aktiven ClpP-Proteinen könnte zwar einen negativen Einfluss auf die Co-Reinigung von Substraten mit den inaktiven ClpP-

Proteinen haben, da letztere aber plasmidkodiert angeboten werden, sollten mehrheitlich inaktive ClpCP-Komplexe gebildet werden.

Für die Co-Reinigung wurden die Stämme ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} in LB-Medium mit 4 % Glukose und ATC vorkultiviert, die Zellen anschließend zweimal in 0,9 % NaCl gewaschen und die Hauptkultivierung in LB-Medium mit 4 % Glukose ohne ATC durchgeführt. Durch Zugabe von IPTG bei einer OD₆₀₀ von ca. 3 wurde die Synthese von inaktivem ClpP*-ST induziert (Abbildung 4.7) und die Zellen nach weiteren 4 Stunden geerntet.

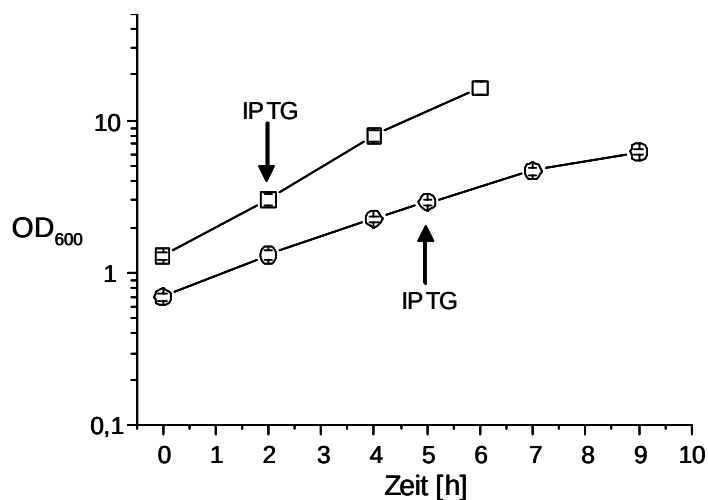


Abbildung 4.7: Wachstum von *C. glutamicum* ClpCP1^{TRAP} (□) und ClpCP2^{TRAP} (○) auf LB-Medium mit 4 % Glukose. Die Kurven zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen. Die Standardabweichungen sind innerhalb der Symbole eingezeichnet.

Die Reinigung von ClpP1*-ST und ClpP2*-ST erfolgte durch StrepTactin-Affinitätschromatographie mit einem Säulenbettvolumen von 1 ml. Um die Stringenz der Co-Reinigung zu erhöhen, wurde die Salzkonzentration des Waschpuffers (100 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM NA₂EDTA, 150 mM NaCl) von 150 mM auf 500 mM NaCl erhöht. Die mit Desthiobiotin eluierten Proteine wurden mittels Vivaspin-Mikrokonzentratoren konzentriert, anschließend über zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt und silbergefärbt. Es war zu beobachten, dass viele Proteine mit ClpP1*-ST bzw. ClpP2*-ST co-gereinigt wurden, ClpP* selbst dagegen stark vertreten war. Erste Identifizierungsversuche mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie zeigten, dass ClpP1 gereinigt wurde. Weiterhin war ClpP1 auch in Proteinpunkten (Proteinspots) anderer Größe und/oder isoelektrischem Punkt (pI) nachweisbar (Abbildung 4.8).

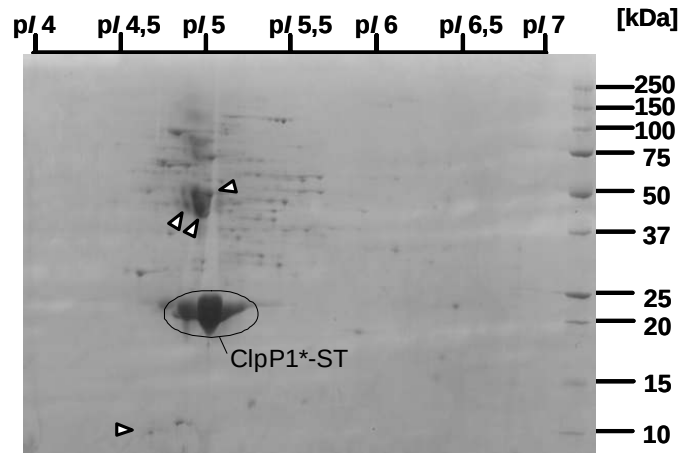


Abbildung 4.8: Reinigung von ClpP1*-ST aus dem Stamm ClpCP1^{TRAP}. Die konzentrierten Proteine aus den Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie wurden in der ersten Dimension über einen pH-Gradienten von 4-7 und in der zweiten Dimension über einen SDS-Polyacrylamidgel (12-14 %) getrennt. Das Gel wurde anschließend mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Pfeile zeigen an, wo ClpP1*-ST zusätzlich identifiziert werden konnte. Als Molekulargewichtsstandard wurde Precision Plus (Biorad, München) verwendet.

Um diesem Phänomen zu entgehen, wurde die konzentrierte Substrat-ClpP*-ST-Komplex-Lösung mit Guanidiniumhydrochlorid denaturiert. Dies sollte den proteolytischen Kern denaturieren und die gefangenen Substrate freisetzen. Mittels einer zweiten StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde ClpP*-ST an die Säule gebunden, während die Substrate im Durchfluss enthalten waren (Abbildung 4.9).

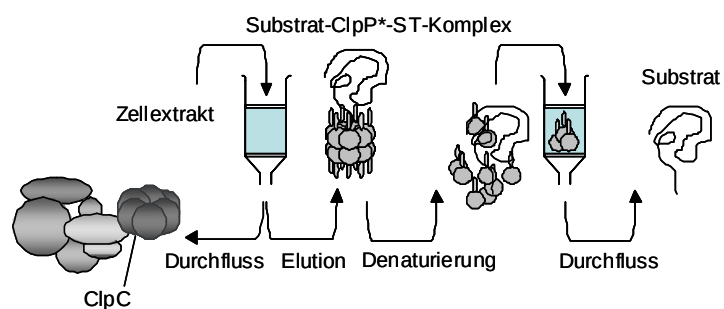


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der Reinigung des Substrat-ClpP*-ST-Komplex und zur Entfernung von ClpP*-ST aus der Proteinlösung. Die Elutionsfraktion einer ersten Affinitätsreinigung enthielt eine Substrat-ClpP*-ST-Komplex-Lösung. Diese in der Lösung enthaltenen Substrat-ClpP*-ST-Komplexe wurden denaturiert, was zur Trennung von ClpP*-ST und den Substraten führte. Mittels einer zweiten StrepTactin-Affinitätschromatographie wurde ClpP*-ST an die Säule gebunden; der Durchfluss enthält die Substrate.

Die Entfernung von ClpP*-ST aus dem Eluat wirkte sich positiv auf die zweidimensionale Gelelektrophorese aus, da das Gel nicht mehr mit ClpP*-ST überladen war und dadurch auch eine wesentlich größere Menge an Substratprotein pro Gel getrennt werden konnte (Abbildung 4.10). Eine Co-Reinigung von potentiellen Substraten mit den inaktiven proteolytischen Untereinheiten der *C. glutamicum* ClpCP-Protease war somit möglich.

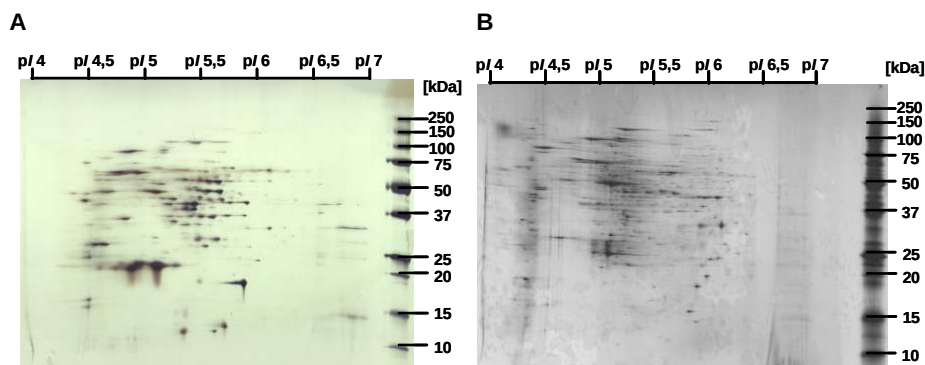


Abbildung 4.10: Co-Reinigung von putativen ClpC-Substratproteinen mit ClpP1*-ST (A) und ClpP2*-ST (B) aus den Stämmen ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP}. Die denaturierten Proteine aus der Durchflussfraktion der zweiten StrepTactin-Säule (siehe Abb. 4.9) wurden in der ersten Dimension über einen pH-Gradienten von 4-7 und in der zweiten Dimension über einen SDS-Polyacrylamidgel (12-14 %) getrennt. Die Gele wurden anschließend silbergefärbt. Als Molekulargewichtsstandard wurde Precision Plus (Biorad, München) verwendet.

4.1.3 Kontrollen zur Spezifität der Co-Reinigung

4.1.3.1 Versuche zur Konstruktion eines Stammes mit Deletionen von *clpC*, *clpE* und *clpX*

Um nachzuweisen, dass die mit ClpP1*-ST und ClpP2*-ST co-gereinigten Proteine tatsächlich Substrate von ClpCP1 bzw. ClpCP2 darstellen, sollte in den beiden Substratfallenstämmen das *clpC*-Gen deletiert und die Reinigung dann wiederholt werden. Alle Versuche, den Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE \Delta clpX P_{tetA-clpP1P2}$ mit dem Plasmid pK19mobsacB- $\Delta clpC$ (Engels et al., 2004) zu transformieren, blieben jedoch erfolglos. Die Ursache dafür ist unklar, da zumindest der erste homologe Rekombinationsschritt möglich sein sollte. Auch mit dem Ziel einer Analyse des Substratspektrums der ClpXP-Protease wurde das *clpC*-Gen im Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE P_{tetA-clpP1P2}$ erfolgreich deletiert. Der neue Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpC \Delta clpE P_{tetA-clpP1P2}$ wurde zur Deletion von *clpX* mit dem Plasmid pK19mobsacB-

$\Delta clpX$ transformiert. Es wurden im ersten Schritt zwar kanamycin-resistente Klone erhalten, nach Selektion auf den zweiten Rekombinationsschritt zeigten aber 21 von 32 getesteten, saccharoseresistenten und kanamycinsensitiven Klonen die Wildtypsituation. Bei den restlichen 11 Klonen wurde kein PCR-Produkt erhalten. Dies ist vermutlich auf einen nicht funktionierenden Zellaufschluss zurückzuführen. Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass es nicht möglich ist, alle drei mit ClpP interagierenden Clp-ATPasen gleichzeitig zu deletieren (konditionale Lethalität).

4.1.3.2 Versuche zur Reinigung von aktivem ClpP1 und ClpP2

Die Co-Reinigung der Proteine mit ClpP1*-ST und ClpP2*-ST sollte durch die Inaktivität der ClpP-Derivate aufgrund des Ser→Gly-Austausches im katalytischen Zentrum ermöglicht werden. Dementsprechend sollte eine Co-Reinigung mit aktiven ClpP-Proteinen nicht möglich sein, da die Substratproteine in diesem Fall schnell degradiert würden. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE \Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* zunächst mit den Plasmiden pXMJ19-*clpP1*-ST bzw. pXMJ19-*clpP2*-ST und anschließend mit dem Plasmid pJC1- P_{gap} -*tetR* transformiert. Die daraus resultierenden Stämme wurden als ClpCP1^{CONTROL} (*C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE \Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* pXMJ19-*clpP1*-ST pJC1- P_{gap} -*tetR*) und ClpCP2^{CONTROL} (*C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE \Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* pXMJ19-*clpP2*-ST pJC1- P_{gap} -*tetR*) bezeichnet. Um zu überprüfen, ob diese Stämme die drei Deletionen und das jeweilige pXMJ19-Plasmid trugen, wurden kanamycin- und chloramphenicolresistente Klone einer Kolonie-PCR unterzogen (Abbildung 4.11). Dabei wurden in allen Fällen DNA-Fragmente der erwarteten Größe erhalten (1183 bp für $\Delta smpB$, 955 bp für $\Delta clpE$, 775 bp für $\Delta clpX$, 869 bp für pXMJ19-*clpP1*-ST bzw. 880 bp für pXMJ19-*clpP2*-ST (vgl. Abschnitt 4.1.1 und Abbildung 4.5).

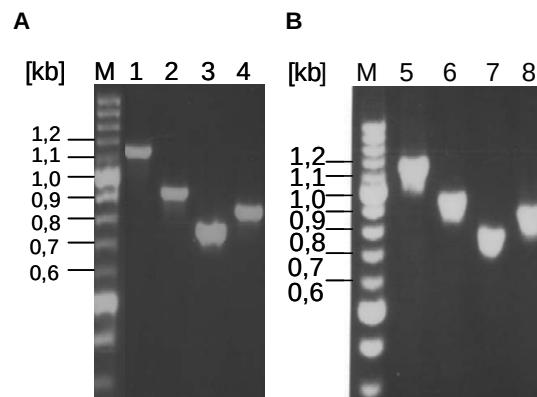


Abbildung 4.11: Kolonie-PCR zur Kontrolle der Stämme ClpCP1^{CONTROL} (A) und ClpCP2^{CONTROL} (B). Die Spuren 1 und 5 zeigen das für die *smpB*-Deletion erwartete Fragment, die Spuren 2 und 6 das für die *clpE*-Deletion erwartete Fragment und die Spuren 3 und 7 das für die *clpX*-Deletion erwartete Fragment. Die Spuren 4 und 8 zeigen das erwartete Fragment des Plasmids pXMJ19-*clpP1*-ST (A) bzw. pXMJ19-*clpP2*-ST (B). Mit M ist der Restriktionslängenstandard GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot) bezeichnet.

Zur Reinigung von ClpP1-ST bzw. ClpP2-ST aus den Kontrollstämmen ClpCP1^{CONTROL} bzw. ClpCP2^{CONTROL} wurden diese wie die Substratfallenstämmen auf LB-Medium mit 4 % Glukose kultiviert. Durch Zugabe von IPTG bei einer OD₆₀₀ von ca. 3 wurde die Synthese von ClpP-ST induziert und die Zellen nach weiteren 4 Stunden geerntet (Abbildung 4.12).

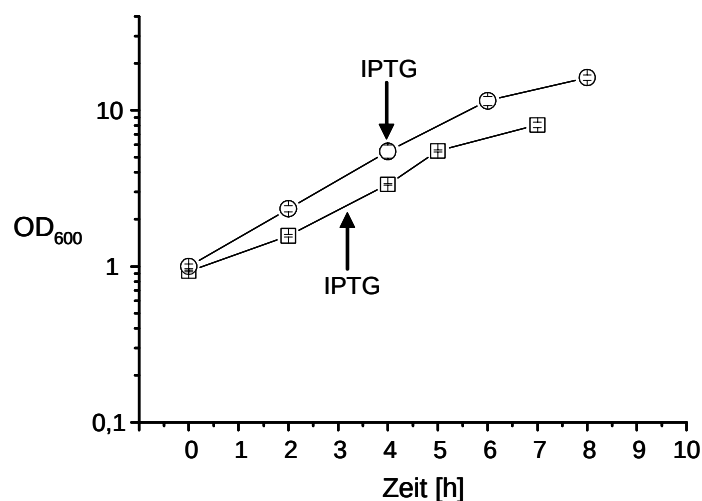


Abbildung 4.12: Wachstum von *C. glutamicum* ClpCP1^{CONTROL} (□) und ClpCP2^{CONTROL} (○) auf LB-Medium mit 4 % Glukose. Die Kurven zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen. Die Standardabweichungen sind innerhalb der Symbole eingezeichnet.

Die ClpP-Proteine wurden durch StrepTactin-Affinitätschromatographie isoliert. Die Desthiobiotin-Eluatfraktionen wurden wiederum gereinigt, konzentriert, denaturiert und und erneut auf eine Streptactin-Säule aufgetragen (siehe Abb. 4.9). Der Durchfluss wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt und die Proteine silbergefärbt. Überraschenderweise wurden auch mit ClpP1-ST und ClpP2-ST sehr viele andere Proteine co-gereinigt (Abbildung 4.13).

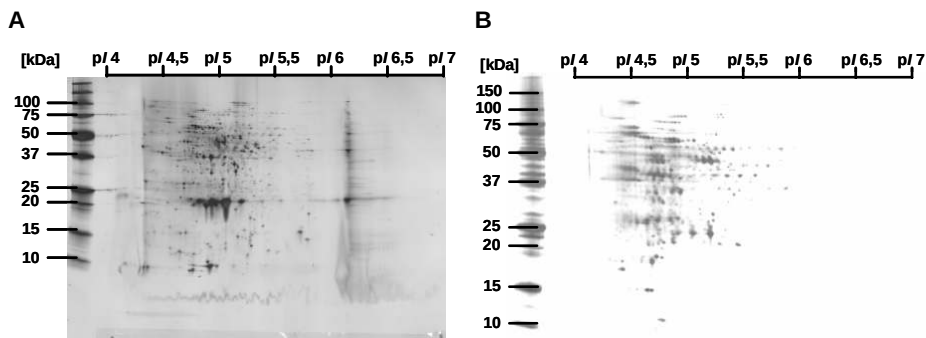


Abbildung 4.13: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen, die bei Streptactin-Affinitätschromatographie zusammen mit ClpP1-ST (A) bzw. ClpP2-ST (B) eluiert wurden, ausgehend von den Stämmen ClpCP1^{CONTROL} und ClpCP2^{CONTROL}. Die Proteine wurden in der ersten Dimension über einen pH-Gradienten von 4-7 und in der zweiten Dimension über ein SDS-Polyacrylamidgel (12-14%) getrennt. Die Gele wurden anschließend silbergefärbt. Als Molekulargewichtsstandard wurde Precision Plus (Biorad, München) verwendet.

Dieses Ergebnis kann auf verschiedene Weise interpretiert werden:

- (I) die Derivate ClpP1-ST und ClpP2-ST sind auch ohne den Ser→Gly-Austausch inaktiv, und zwar aufgrund des C-terminalen StrepTags
- (II) die Co-Reinigung ist spezifisch, kann aber auch mit aktivem ClpP erfolgen
- (III) die Co-Reinigung ist völlig unspezifisch und daher unabhängig von der Aktivität von ClpP

Um den Hypothesen (I) und (II) nachzugehen, wurde ein ClpP1-Derivat mit einem N-terminalen StrepTag-II konstruiert und bezüglich Co-Reinigung getestet. Um Hypothese (III) nachzugehen, wurde anstelle von ClpP ein willkürliches anderes Protein mit StrepTag-II aus dem gleichen Stammhintergrund gereinigt wie die ClpP-ST-Derivate.

4.1.3.3 Reinigung von ClpP1 mit einem N-terminalen StrepTag-II

Aus anderen Organismen ist bekannt, dass ClpP durch N-terminale Prozessierung aktiviert wird (für ClpP aus *E. coli* siehe Maurizi et al., 1990a und 1990b; für ClpP aus *B. subtilis* siehe Brötz-Oesterhelt et al., 2005). Für ClpP1 und ClpP2 aus *C. glutamicum* konnten ebenfalls Hinweise auf eine N-terminale Prozessierung erhalten werden. Ein Vergleich des Massenspektrums einer Proteinlösung von ClpP1-ST bzw. ClpP2-ST zeigte jeweils zwei unterschiedliche Massen für die beiden Proteine. Diese Differenz könnte durch eine Abspaltung N-terminaler Aminosäuren (Prozessierung) erklärt werden. Bei ClpP1 werden vermutlich die ersten sechs Aminosäuren (MSDIRMAAQ~ClpP1), bei ClpP2 vermutlich die ersten zehn Aminosäuren (MSNGFQMPTSRV~ClpP2) abgespalten (Steffen Schaffer, unpublizierte Ergebnisse). Vorversuche hatten ergeben, dass ClpP-Proteine mit einem N-terminalen His-„Tag“ vor dem Startmethionin nicht gereinigt werden können, vermutlich aufgrund der proteolytischen Prozessierung. Daher wurde alternativ ein ClpP1-Derivat konstruiert, das den StrepTag-II unmittelbar vor der postulierten Prozessierungsstelle trägt, zusammen mit einem Startmethionin: MWSHPQFEKAAQ~ClpP1 (ClpP1-NStrep). Dazu wurde mit den Oligonukleotiden Nstrep-clpP1-fw und Nstrep-clpP1-rv sowie chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* als Matrize ein 642 bp großes *clpP1*-Fragment mittels PCR hergestellt, mit SbfI und KpnI gespalten und in den Vektor pEKEx2 kloniert. Das resultierende Plasmid pEKEx2-Nstrep-*clpP1* (Abbildung 7.12) wurde durch Restriktion mit EcoRV und Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pEKEx2-for und pEKEx2-rev kontrolliert. Bei der Restriktion mit EcoRV sollten Fragmente von 7107 bp und 1654 bp entstehen (Abbildung 4.14).

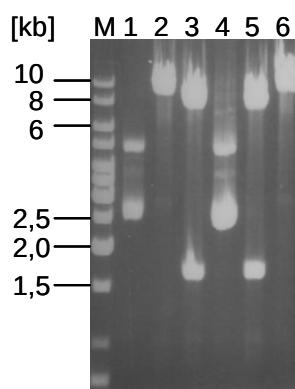


Abbildung 4.14: Restriktion von pEKEx2-NStrep-*clpP1*-Kandidaten mit EcoRV. Die Plasmide in den Spuren 3 und 5 zeigen die erwarteten Fragmentgrößen. Mit M ist der Restriktionslängenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) bezeichnet.

Der Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* wurde mit dem Plasmid pEKEx2-NStrep-*clpP1* transformiert und kanamycinresistente Klone wurden über Kolonie-PCR kontrolliert. Dabei wurde die Anwesenheit von pEKEx2-NStrep-*clpP1* mit den Oligonukleotiden pEKEx2-for und pEKEx2-rev überprüft und der neue Stamm wurde ClpCP^{P1-TEST} genannt. ClpCP^{P1-TEST} wurde in LB-Medium mit 4 % Glukose kultiviert. Das Protein ClpP1-NStrep wurde über StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt und die einzelnen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4.15).

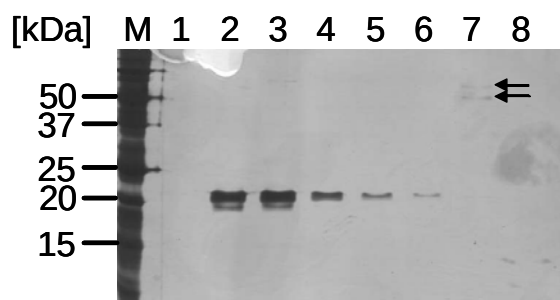


Abbildung 4.15: SDS-PAGE der Eluatfraktionen 1 - 8 aus der Affinitätsreinigung von ClpP1-NStrep aus dem Stamm ClpCP^{P1-TEST} mittels Streptactin-Sepharose. Das Gel wurde silbergefärbt. Mit M ist der Molekulargewichtsstandard Precision Plus (Biorad, München) bezeichnet. Die Pfeile weisen auf zwei zusätzliche Banden der Elutionsfraktion 7 hin.

ClpP1-NStrep hat eine berechnete Masse von 21,7 kDa. Eine dominante Bande dieser Größe ist auch in der Abbildung 4.15 zu sehen. Weiterhin tritt in den Elutionsfraktionen 2 und 3 eine weitere Proteinbande mit etwas geringerer Masse auf, bei der es sich vermutlich um ein verkürztes ClpP1-NStrep-Derivat handelt. Mit Ausnahme von zwei schwachen Banden in der Elutionsfraktion 7 wurden keine weiteren Proteine co-gereinigt. Unter der Annahme, dass ClpP1-NStrep proteolytisch aktive ClpCP1-Komplexe ausbilden kann, unterstützt dieses Ergebnis die Annahme, dass eine Co-Reinigung nur mit inaktiven ClpP-Derivaten möglich ist und dass demzufolge ein C-terminaler StrepTag-II zu inaktiven ClpP-Derivaten führt. Falls ClpP1-NStrep allerdings nicht in der Lage ist, proteolytisch aktive ClpCP-Komplexe zu bilden, kann aus diesem Experiment keine Schlussfolgerung bezüglich der Aktivität von ClpP-ST und der Co-Reinigung gezogen werden.

4.1.3.4 Reinigung der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase

Um der Hypothese nachzugehen, dass die Co-Reinigung von Proteine mit ClpP1*-ST, ClpP1-ST, ClpP2*-ST und ClpP2-St völlig unspezifisch ist, sollte anstelle eines ClpP-ST-Derivats ein anderes Protein mit einem C-terminalen StrepTag-II aus dem gleichem Stammhintergrund gereinigt werden. Dazu wurde das OdhA-Protein ausgewählt, die E1-Untereinheit des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes. Dieses Schlüsselenzym des Zitronensäurezyklus katalysiert die irreversible Umwandlung von α -Ketoglutarat, Coenzym A und NAD^+ zu Succinyl-CoA, CO_2 und $\text{NADH}+\text{H}^+$. In *C. glutamicum* besteht der Komplex aus der E1-Untereinheit (α -Ketoglutarat-Dehydrogenase), der E2-Untereinheit (Transsuccinylase, SucA) und der E3-Untereinheit (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, LpdA). Außerdem enthält der Komplex auch noch die E1-Untereinheit (Pyruvat-Dehydrogenase, AceE) des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (Niebisch et al., 2006). Weiterhin bindet das Inhibitorprotein OdhI im nicht-phosphorylierten Zustand an das OdhA-Protein (Niebisch et al., 2006). Für die Expression im Stammhintergrund der Substratfallenstämme (*C. glutamicum* ΔsmpB ΔclpE ΔclpX $P_{\text{tetA}}\text{-clpP1P2}$) wurde das *odhA*-Gen mit den Oligonukleotiden OE-*odhA*-ST-fw und OE-*odhA*-ST-rv amplifiziert und dabei mit einem C-terminalen StrepTag-II versehen. Nach Restriktion mit XbaI und XmaI wurde das PCR-Fragment in den Vektor pXMJ19 kloniert. Das rekombinante Plasmid pXMJ19-*odhA*-ST (Abbildung 7.16) wurde zunächst durch Restriktion mit XbaI und XmaI identifiziert (dabei entstanden Fragmente von 6590 bp und 3877 bp) und anschließend durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pXMJ19-for, pXMJ19-rev, Seq-*odhA*-1, Seq-*odhA*-2, Seq-*odhA*-3, Seq-*odhA*-4, Seq-*odhA*-5 und Seq-*odhA*-6 kontrolliert. Das Plasmid pXMJ19-*odhA*-ST wurde in *C. glutamicum* ΔsmpB ΔclpE ΔclpX $P_{\text{tetA}}\text{-clpP1P2}$ transferiert, dieser Stamm anschließend wieder mit pJC1- $P_{\text{gap}}\text{-tetR}$ transformiert und Stamm ClpCP^{TEST} genannt. Kanamycin- und chloramphenicolresistente Transformanden wurden mittels Kolonie-PCR bezüglich der Deletionen von *smpB*, *clpE* und *clpX* sowie der Anwesenheit von pXMJ19-*odhA*-ST (mit den Oligonukleotiden pXMJ19-for und pXMJ19-rev) überprüft. Analog zu den vorherigen Reinigungen wurde der neue Stamm ClpCP^{TEST} auf LB-Medium mit 4 % Glukose kultiviert. Trotz Induktion der *odhA*-ST-Expression mit 1 mM oder 3 mM IPTG konnte bei SDS-PAGE von Zellextrakten keine Überproduktion von OdhA-ST nachgewiesen werden. Ebenso war es nicht möglich, OdhA-ST durch Streptactin-Affinitätschromatographie aus diesen Zellen zu reinigen. Die Ursache für dieses negative Ergebnis ist unbekannt. Möglicherweise könnte ein Repressor an den Promotor binden und die Transkription von *odhA*-ST verhindern.

Als Alternative zu dem Plasmid pXMJ19-*odhA*-ST wurde das Plasmid pAN6-*odhA*-ST (Axel Niebisch) für die Überproduktion und Reinigung von OdhA-ST verwendet.

Es trägt das *odhA*-Gen mit einer 3'-terminalen StrepTag-II-kodierenden Sequenz unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Der Vektor pAN6 ist ein Derivat von pEKEx2. Der Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB$ $\Delta clpE$ $\Delta clpX$ P_{tetA} -*clpP1P2* wurde mit pAN6-*odhA*-ST transformiert und kanamycinresistente Transformanten einer Kolonie-PCR unterzogen. Dabei wurden die Deletionen von *smpB*, *clpE*, *clpX* sowie die Anwesenheit von *clpC* (mit den Oligonukleotiden Delta-clpC-out-fw und Delta-clpC-out-rw) und pAN6-*odhA* (mit den Oligonukleotiden pEKEx2-for und pEKEx2-rev) überprüft. Es wurden Fragmente der Größen 1183 bp ($\Delta smpB$), 955 bp ($\Delta clpE$), 775 bp ($\Delta clpX$), 3659 bp (*clpC*) und 4037 bp (pAN6-*odhA*) erhalten (Abbildung 4.16). Der neue Stamm wurde ClpCP^{ODHA} genannt.

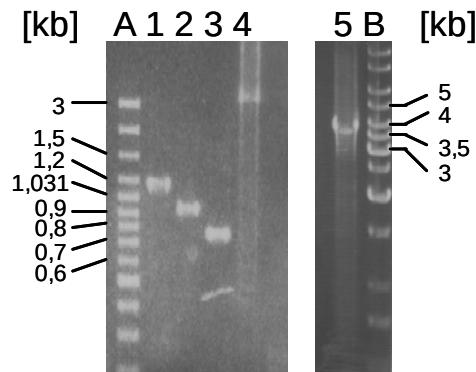


Abbildung 4.16: Kolonie-PCR von ClpCP^{ODHA}. Die Spuren 1 – 3 zeigen die zu erwartenden Fragmente bei Deletion von *smpB*, *clpE* und *clpX*. Spur 4 zeigt das Fragment für das *clpC*-Gen und Spur 5 zeigt das Fragment des pAN6-*odhA*-Plasmids. Mit A ist der Restriktionslängenstandard GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Plus und mit B der Restriktionslängenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (beide Fermentas, St. Leon-Rot) bezeichnet.

Analog zu den vorherigen Versuchen wurde der Stamm ClpCP^{ODHA} auf LB-Medium mit 4 % Glukose und 50 µg/ml Kanamycin kultiviert. Eine Repression des *clpP1P2*-Operons mittels pJC1-*P_{gap}-tetR* war nicht möglich, da pAN6 und pJC1 den gleichen Selektionsmarker (Kan^R) enthalten. OdhA-ST wurde über StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigt, die Elutionsfraktionen konzentriert und durch SDS-PAGE analysiert. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurde parallel ClpP1*-ST aus dem Stamm ClpCP1^{TRAP} gereinigt und die Elutionsfraktionen ebenfalls über SDS-PAGE untersucht (Abbildung 4.17).

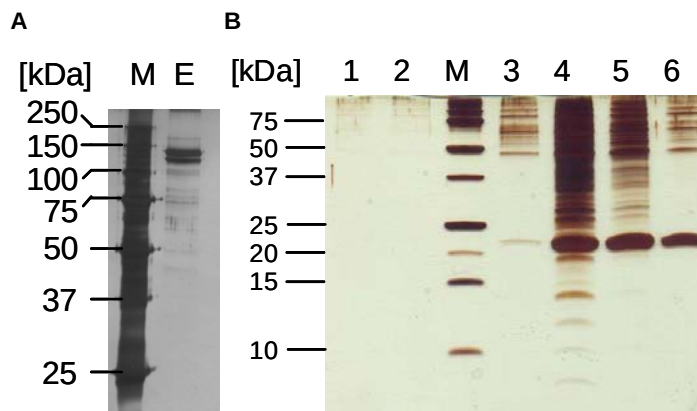


Abbildung 4.17: Streptactin-Affinitätsreinigung von OdhA-ST aus dem Stamm ClpCP^{ODHA} (A) und von ClpP1*-ST aus dem Stamm ClpCP1^{TRAP} (B). Die Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE getrennt und silbergefärbt. Die Spur E enthält ein Aliquot der vereinigten und konzentrierten OdhA-ST-Eluatfraktionen. Die Spuren 1 - 6 enthalten Aliquots der einzelnen Elutionsfraktionen von ClpP1*-ST. Mit M ist der Molekulargewichtsstandard Precision Plus (Biorad, München) bezeichnet.

Wie Abbildung 4.17 zeigt, konnte OdhA-ST gereinigt werden. Neben der erwarteten Bande von ca. 140 kDa, die gut zur berechneten Masse von OdhA-ST von 139,96 kDa passt, gibt es eine etwas kleinere Bande mit ungefähr gleicher Färbungsintensität, bei der es sich möglicherweise um ein Prozessierungsprodukt von OdhA handelt. Neben der Doppelbande zeigten sich zwar noch weitere Banden mit kleinerer apparenter Masse, die jedoch im Vergleich zu der OdhA-Bande nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind. Bei diesen Banden könnte es sich um Abbauprodukte von OdhA-ST handeln. Bedingt durch die sehr hohe Salzkonzentration des hier verwendeten Puffers (500 mM NaCl) und das Fehlen von Glycerin, das für die Isolation des intakten α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes notwendig ist, war eine Co-Reinigung der E2 und E3-Untereinheiten, der E1-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes sowie von OdhI nicht zu beobachten (Niebisch et al. 2006). Bei der Reinigung von ClpP1*-ST wurde in drei der Elutatfraktionen eine dominante Bande von ca. 23 kDa identifiziert, die nicht ganz mit der berechneten Masse für ClpP1*-ST von 21,12 kDa übereinstimmt. Möglicherweise könnte hier die N-terminale Prozessierung von ClpP1*-ST eine Rolle spielen. Daneben finden sich aber zahlreiche weitere Proteinbanden unterschiedlichster Masse und unterschiedlichster Intensität. Dieses Resultat unterstützt die Annahme, dass die mit den ClpP-ST-Derivaten isolierten Proteine spezifisch und nicht unspezifisch co-gereinigt wurden.

4.2 Identifizierung von potentiellen Substraten der ClpCP-Protease

Die unter 4.1 beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteine, die mit ClpP1*-ST, ClpP1-ST, ClpP2*-ST und ClpP2-ST aus den Substratfallenstämmen co-gereinigt wurden, Substrate der ClpC-ATPase sein könnten. Die Identität dieser co-gereinigten Proteine sollte mit Hilfe ihres Peptidmassen-Fingerabdrucks bestimmt werden. Dazu wurden die Proteine aus dem 2D-Gel ausgeschnitten, entfärbt, im Gel mit Trypsin verdaut, und die Masse der dabei entstandenen tryptischen Peptide durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmt. Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich dieser experimentell bestimmten Massen mit einer Datenbank, welche die Massen der tryptischen Peptide aller vom *C. glutamicum*-Genom kodierten Proteine enthält. Dazu wurde das Programm MS-Fit verwendet (Clauser et al., 1999). Die Co-Reinigung und Identifizierung von Proteinen im 2D-Gel wurde dreimal für ClpP1*-ST und dreimal für ClpP1-ST ausgehend von unabhängigen Kulturen durchgeführt. In der Abbildung 4.18 ist ein repräsentatives Gel der Proteine gezeigt, die mit ClpP1*-ST co-gereinigt wurden.

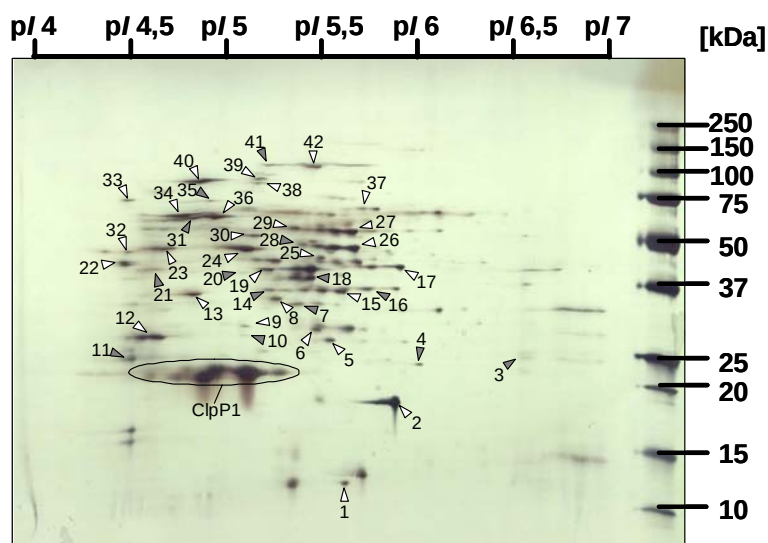


Abbildung 4.18: Repräsentatives silbergefärbtes 2D-Gel der Proteine, die durch StrepTactin-Affinitätschromatographie mit ClpP1*-ST aus dem Substratfallenstamm ClpCP1^{TRAP} co-gereinigt wurden. Die Nummern beziehen sich auf Proteine, deren Identität mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmt werden konnte und die in Tabelle 4.1 aufgelistet sind. Weiße Pfeile markieren Proteine, die in diesem 2D-Gel identifiziert wurden, graue Pfeile geben die mögliche Position der Proteine an, die in den anderen fünf Experimenten identifiziert wurden.

Weiße Pfeile zeigen die Proteine an, die im repräsentativen Gel identifiziert werden konnten, graue Pfeile geben die mögliche Position von Proteinen an, die in den anderen fünf Versuchen identifiziert wurden. Die Nummern weisen auf Proteinspots hin, deren Identität bestimmt werden konnte. Tabelle 4.1 enthält eine Zusammenstellung aller mit ClpP1*-ST oder ClpP1-ST co-gereinigten Proteine, deren Identität bestimmt werden konnte.

Tabelle 4.1: Proteine, die durch StrepTactin-Affinitätschromatographie mit ClpP1*-ST bzw. ClpP1-ST co-gereinigt und nach Trennung im 2D-Gel anhand ihres „Peptidmassenfingerprints“ identifiziert wurden. Die Nummerierung bezieht sich auf die entsprechend markierten Proteine in der Abbildung 4.18. Die Häufigkeit gibt an, wie oft das Protein in insgesamt sechs unabhängigen Versuchen aus den Stämmen ClpCP1^{TRAP} und ClpCP1^{CONTROL} mit ClpP1*-ST bzw. ClpP1-ST co-gereinigt wurde. Die Daten der Tabelle beziehen sich auf die jeweils beste Identifizierung des entsprechenden Proteins. Die Spalten MM_{Ex.} und pI_{Ex.} geben die experimentell bestimmten und die Spalten MM_{theo.} und pI_{theo.} die berechneten molekularen Massen und isoelektrischen Punkte an. Ein Stern verweist auf Proteine, die nicht im repräsentativen Versuch identifiziert werden konnten. Eine genaue Auflistung der bestimmten Peptide ist im Anhang unter 7.1 zu finden.

Nummer	Daten-bank	Funktion	MM _{Ex.} [kDa]	pI _{Ex.}	MM _{theo.} [kDa]	pI _{theo.}	Peptide	Sequenz-abdeckung	Häufigkeit
1	Cg3308	Ribosomales Protein S6	12	5,5	10,9	6,29	5	52 %	2
2	Cg0572	Ribosomales Protein L10	18	5,75	18,0	5,63	9	66 %	3
3*	Cg0610	Ribosomales Protein L5	23	6,5	21,8	6,63	9	46 %	1
4*	Cg3155	Desoxycytidintriphosphat-deaminase	23	6,0	20,7	5,56	6	33 %	1
5	Cg1365	F ₀ F ₁ ATP-Synthase, δ-UE	26	5,5	28,9	5,37	8	33 %	2
6	Cg0867	Ribosomen-assoziiertes Protein Y	28	5,4	24,6	5,41	11	45 %	3
7*	Cg1783	Glycin/D-Aminosäure-Oxidase	33	5,45	31,0	5,22	7	43 %	1
8	Cg3255	UspA, generelles Stressprotein	35	5,25	32,2	5,03	5	22 %	2
9	Cg1762	SufC, FeS-Cluster-Maturase	30	5,1	27,6	4,96	7	32 %	5
10*	Cg2091	Polyphosphat-Glukokinase	28	5,1	26,7	4,97	7	36 %	2
11*	Cg1789	Triosephosphat-Isomerase	25	4,5	27,2	4,80	7	27 %	1
12	Cg2958	Putative Dehydrogenase	27	4,2	27,1	4,62	5	39 %	3
13	Cg2833	Cysteinsynthase	35	4,8	33,5	4,75	14	70 %	3
14*	Cg3068	Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase	37	5,35	37,2	5,04	6	31 %	2
15	Cg2222	Ribosomales Protein S2	35	5,55	30,1	5,35	11	39 %	3
16*	Cg1409	6-Phosphofruktokinase	35	5,7	37,1	5,47	9	34 %	1

Fortsetzung Tabelle 4.1

Nummer	Daten-bank	Funktion	MM _{Ex.} [kDa]	pI _{Ex.}	MM _{theo.} [kDa]	pI _{theo.}	Peptide	Sequenz-abdeckung	Häufigkeit
17	Cg2708	putativer ABC-Typ-Transporter, ATPase-Domäne	43	5,85	40,3	5,53	10	36 %	2
18*	Cg3092	hypothetisches Protein	40	5,25	42,4	5,10	3	15 %	1
19	Cg2141	RecA	42	5,2	40,2	4,95	4	21 %	1
20*	Cg1367	F ₀ F ₁ ATP-Synthase, γ -UE	40	5,1	35,7	4,99	5	24 %	1
21*	Cg1784	Ornithincyclodeaminase	40	4,85	41,0	4,71	9	30 %	1
22	Cg0655	DNA-abhängige RNA-Polymerase, α -UE	44	4,5	36,7	4,50	9	35 %	2
23	Cg1111	Enolase	48	4,7	44,9	4,65	8	32 %	6
24a	Cg0587	Elongationsfaktor EF-Tu	48	5,1	43,9	4,92	17	54 %	6
24b	Cg1586	Argininosuccinat-Synthase	48	5,1	44,1	4,95	11	42 %	2
25	Cg0949	Citratsynthase	45	5,45	48,9	5,19	14	53 %	3
26	Cg1133	Serin-Hydroxymethyl-transferase	48	5,6-5,7	46,5	5,42	19	46 %	3
27	Cg2291	Pyruvatkinase	55	5,6-5,7	51,6	5,43	14	40 %	3
28*	Cg2192	Malat-Chinon-Oxidoreduktase	50	5,4	54,8	5,18	10	28 %	1
29	Cg2499	Glycyl-tRNA-Synthetase	57	5,3	53,0	5,28	8	30 %	2
30	Cg1145	Fumarase	52	5,15	49,8	5,06	11	35 %	3
31a*	Cg1420	Amidotransferase für Asp-tRNA und Glu-tRNA, β -UE	60	4,75-4,9	54,5	4,76	6	15 %	1
31b*	Cg0693	GroEL1	60	4,75-4,9	45,3	4,77	23	85 %	3
32	Cg0783	hypothetisches Protein	46	4,5	45,4	4,52	12	45 %	2
33	Cg3100	DnaK	75	4,5	66,3	4,55	11	34 %	3
34a	Cg3011	GroEL2	62	4,75	57,4	4,75	15	39 %	4
34b*	Cg1017	Methionyl-tRNA-Synthetase	62	4,75	67,6	4,82	4	11 %	1
35*	Cg3198	Glycerinkinase	68	5,0	56,1	4,82	5	18 %	1
36	Cg1366	F ₀ F ₁ ATP-Synthase, α -UE	60	4,9	58,8	4,86	12	46 %	6
37	Cg1606	CTP-Synthase	70	5,7	60,6	5,48	11	30 %	2
38	Cg2166	Polyribonukleotid-nukleotidyltransferase	85	5,2	81,3	5,04	9	17 %	1
39	Cg3079	ClpB	90	5,2	93,2	5,00	29	42 %	2
40	Cg0583	Elongationsfaktor EF-G	87	4,83	77,9	4,81	20	49 %	6
41*	Cg2963	ClpC	100	5,25	101,5	5,02	17	24 %	4
42	Cg2466	Pyruvatdehydrogenase, E1-UE	100	5,45	102,8	5,26	32	52 %	3

Analog zur Identifizierung der mit ClpP1*-ST bzw. ClpP1-ST co-gereinigten Proteine wurde die Co-Reinigung zweimal mit ClpP2*-ST bzw. zweimal mit ClpP2-ST ausgehend von unabhängigen Kulturen durchgeführt. Abbildung 4.19 zeigt ein repräsentatives 2D-Gel der mit ClpP2*-ST co-gereinigten Proteine. Wiederum zeigen weiße Pfeile die Proteine an, die im repräsentativen Gel identifiziert werden konnten, graue Pfeile geben die mögliche Position von Proteinen an, die in den anderen drei Versuchen identifiziert wurden. Die Nummern weisen auf Proteinspots hin, deren Identität bestimmt werden konnte. Tabelle 4.2 enthält eine Zusammenstellung aller mit ClpP2*-ST oder ClpP2-ST co-gereinigten und identifizierten Proteine.

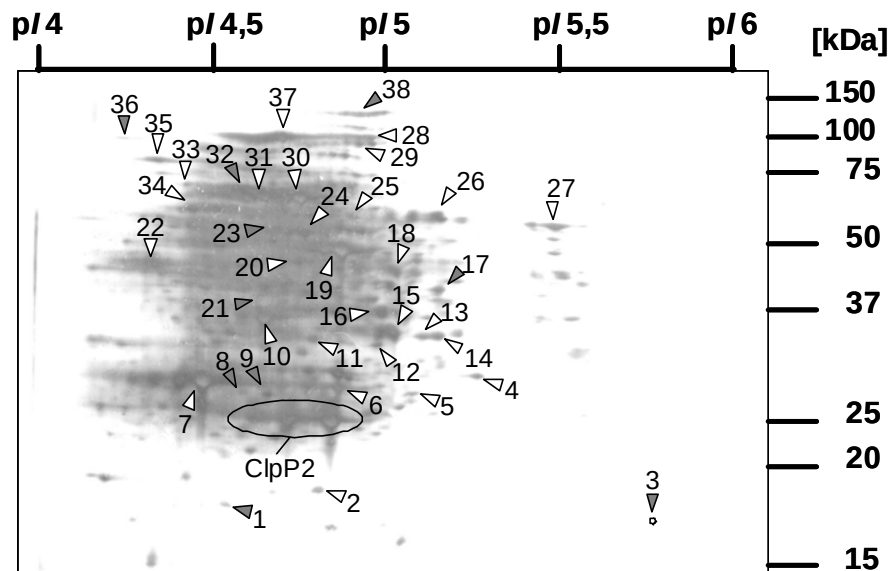


Abbildung 4.19: Repräsentatives silbergefärbtes 2D-Gel der Proteine, die durch StrepTactin-Affinitätschromatographie mit ClpP2*-ST aus dem Substratfallenstamm ClpCP2^{TRAP} co-gereinigt wurden. Die Nummern beziehen sich auf Proteine, deren Identität mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmt werden konnte und die in Tabelle 4.2 aufgelistet sind. Weiße Pfeile markieren Proteine, die in diesem 2D-Gel identifiziert wurden, graue Pfeile geben die mögliche Position der Proteine an, die in den anderen drei Experimenten identifiziert wurden. Proteinspot Nummer 3 wurde graphisch hinzugefügt.

Tabelle 4.2: Proteine, die durch StrepTactin-Affinitätschromatographie mit ClpP2*-ST bzw. ClpP2-ST co-gereinigt und nach Trennung im 2D-Gel anhand ihres „Peptidmassenfingerprints“ identifiziert wurden. Die Nummerierung bezieht sich auf die entsprechend markierten Proteine in der Abbildung 4.19. Die Häufigkeit gibt an, wie oft das Protein in insgesamt vier unabhängigen Versuchen aus den Stämmen ClpCP2^{TRAP} und ClpCP2^{CONTROL} mit ClpP2*-ST bzw. ClpP2-ST co-gereinigt wurde. Die Daten der Tabelle beziehen sich auf die jeweils beste Identifizierung des entsprechenden Proteins. Die Spalten MM_{Ex.} und pI_{Ex.} geben die experimentell bestimmten und die Spalten MM_{theo.} und pI_{theo.} die berechneten molekularen Massen und isoelektrischen Punkte an. Ein Stern verweist auf Proteine, die nicht im repräsentativen Versuch identifiziert werden konnten. Eine Raute zeigt Proteine an, die ebenfalls mit ClpP1*-ST bzw. ClpP1-ST co-gereinigt und mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie identifiziert wurden (vgl. Tabelle 4.1). Eine genaue Auflistung der bestimmten Peptide ist im Anhang unter 7.2 zu finden.

Nummer	Daten-bank	Funktion	MM _{Ex.} [kDa]	pI _{Ex.}	MM _{theo.} [kDa]	pI _{theo.}	Peptide	Sequenz-abdeckung	Häufigkeit
1*	Cg3327	Dps („DNA protection during starvation“)	19	4,7	18,4	4,69	5	44 %	1
2	Cg2692	Thioesterase	18	4,8	17,4	4,98	9	55 %	1
3*	Cg0572 [#]	Ribosomales Protein L10	18	5,7	18,0	5,63	3	28 %	1
4	Cg0867 [#]	Ribosomen-assoziiertes Protein Y	28	5,25	24,6	5,41	6	32 %	2
5	Cg1762 [#]	SufC, FeS-Cluster-Maturase	25	5,1	27,6	4,96	6	40 %	4
6	Cg2091 [#]	Polyphosphat-Glukokinase	25	4,82	26,7	4,97	4	33 %	1
7	Cg2958 [#]	Putative Dehydrogenase	26	4,5	27,1	4,62	7	43 %	2
8*	Cg3409	Phosphomethyl-pyrimidinkinase	28	4,6	28,1	4,62	3	18 %	1
9*	Cg2902	Putative Hydrolase	28	4,8	29,7	4,80	3	15 %	1
10	Cg2833 [#]	Cysteinsynthase	34	4,6	33,5	4,75	12	58 %	2
11	Cg2342	„short chain“ Dehydrogenase	31	4,8	31,2	4,89	6	37 %	1
12	Cg1338	Homoserinkinase	29	4,98	32,6	5,05	5	19 %	1
13	Cg1698	ATP-Phosphoribosyl-transferase	31	5,1	30,2	5,16	4	27 %	1
14	Cg1283	Shikimat-5-Dehydrogenase	31	5,15	28,9	5,14	5	31 %	1
15	Cg3255 [#]	UspA, generelles Stressprotein	33	5,0	32,2	5,03	3	25 %	1
16	Cg3068 [#]	Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase	35	5,0	37,2	5,04	3	15 %	1
17*	Cg2141 [#]	RecA	40	5,1	40,2	4,95	3	13 %	2
18	Cg1157	Fruktose-1,6-bisphosphatase	43	5,0	35,4	5,09	6	17 %	1
19	Cg0587 [#]	Elongationsfaktor EF-Tu	45	4,85	43,9	4,92	16	55 %	4
20	Cg1814	Carbamoylphosphat-Synthase, kleine Kette	43	4,75	42,1	4,87	7	31 %	1

Fortsetzung Tabelle 4.2

Nummer	Daten-bank	Funktion	MM _{Ex.} [kDa]	pI _{Ex.}	MM _{theo.} [kDa]	pI _{theo.}	Peptide	Sequenz-abdeckung	Häufigkeit
21a*	Cg0387	Zn-abhängige Alkoholdehydrogenase	37	4,75	38,9	4,79	3	12 %	1
21b*	Cg3323	Myoinositol-1-phosphat-Synthase	40	4,75	39,2	4,72	11	43 %	1
22	Cg0655 [#]	DNA-abhängige RNA-Polymerase, α -UE	49	4,4	36,7	4,50	4	19 %	1
23*	Cg1420 [#]	Amidotransferase für Asp-tRNA und /Glu-tRNA, β -UE	60	4,8	54,5	4,76	7	23 %	1
24	Cg2368	UDP-N-acetylmuramat-Alanin-Ligase	50	4,75	51,1	4,97	6	24 %	1
25	Cg1145 [#]	Fumarase	55	4,9	49,8	5,06	8	26 %	1
26	Cg2192 [#]	Malat-Chinon-Oxidoreduktase	55	5,2	54,8	5,18	8	19 %	1
27	Cg2291 [#]	Pyruvatkinase	50	5,5	51,6	5,43	9	25 %	3
28	Cg3079 [#]	ClpB	90	4,95	93,2	5,00	8	16 %	2
29	Cg2559	Malatsynthase	85	4,9	82,4	5,00	5	7 %	1
30a	Cg1366 [#]	F ₀ F ₁ ATP-Synthase, α -UE	65	4,75	58,8	4,86	11	39 %	2
30b*	Cg3011 [#]	GroEL2	65	4,75	57,4	4,75	7	17 %	2
31	Cg0693 [#]	GroEL1	65	4,65	45,3	4,77	4	20 %	2
32*	Cg3198 [#]	Glycerinkinase	62	4,85	56,1	4,82	3	13 %	1
33	Cg2366	FtsZ, Zellteilungsprotein	70	4,45	47,2	4,71	9	37 %	2
34	Cg1111 [#]	Enolase	60	4,45	44,9	4,65	8	34 %	3
35	Cg3100 [#]	DnaK	80	4,8	66,3	4,55	13	31 %	3
36*	Cg1737	Aconitase	120	4,5	102,2	4,53	4	6 %	1
37	Cg0583 [#]	Elongationsfaktor EF-G	95	4,1-4,5	77,9	4,81	15	32 %	3
38*	Cg2963 [#]	ClpC	100	5,0	101,5	5,02	15	24 %	3

Es konnten insgesamt 61 Proteine identifiziert werden, wovon 45 Proteine mit ClpP1*-ST bzw. ClpP1-ST und 40 Proteine mit ClpP2*-ST bzw. ClpP2-ST co-gereinigt wurden. Dabei wurden auch solche Proteine berücksichtigt, bei denen die Identifizierung auf nur drei Peptiden beruhte. 24 der 61 Proteine wurden mit beiden proteolytischen Untereinheiten co-gereinigt. Obwohl eine wiederholte Identifizierung bestimmter Proteine in unabhängigen Experimenten natürlich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es sich dabei tatsächlich um ein ClpC-Substrat handelt, wurden in den Tabellen 4.1 und 4.2 auch jene Proteine berücksichtigt, die nur in einem Experiment identifiziert wurden. Die Nicht-Identifizierung in den anderen Experimenten bedeutet nicht notwendigerweise,

dass das Protein nicht co-gereinigt wurde. Aufgrund der erhöhten Schwierigkeit der Identifizierung von Proteinen aus silbergefärbten Gelen kann es auch sein, dass das Protein co-gereinigt wurde, aber eine Identifizierung nicht möglich war.

4.3 Ableitung und Überprüfung von Erkennungsmotiven

Unter der Annahme, dass es sich bei den 61 mit ClpP co-gereinigten Proteinen um Substrate der ClpCP-Protease handelt, stellte sich die Frage, welche Sequenzbereiche für die Erkennung der Proteine durch ClpC wichtig sind. Wie vorangegangene Untersuchungen zeigten (Flynn et al., 2003), sind die Erkennungssequenzen der ClpX-ATPase von *E. coli* an den Termini der Substrate lokalisiert. Deshalb sollen durch Sequenzvergleiche der N- bzw. C-Termini der co-gereinigten Substrate potentielle Motive abgeleitet und deren Relevanz für eine ClpC-abhängige Degradation überprüft werden.

4.3.1 Ableitung der Sequenzmotive

Die Aminosäuresequenzen der co-gereinigten Proteine wurden aus der Bioinformatik-Suite ERGO entnommen und mittels ClustalW (Thompson et al., 1994) Sequenzalignments der 20 N-terminalen sowie der 20 C-terminalen Aminosäurereste erstellt. Da die N-terminalen Sequenzen alle ein Methionin aufwiesen, wurden die Sequenzen anhand ihrer ersten drei Aminosäuren angeordnet. Für die C-terminalen Sequenzen war keine Strukturierung erkennbar. Eine Ableitung von Sequenzmotiven war daher mit dieser Methode nicht möglich. Deshalb wurde ein alternativer Weg gewählt, bei dem die Sequenzen der N- und C-Termini nicht hinsichtlich der Identität der Aminosäuren analysiert wurde, sondern hinsichtlich der chemischen Eigenschaften ihrer Seitenkette. Dazu wurden fünf Kategorien eingeführt, die jeweils durch eine andere Farbe gekennzeichnet wurden:

- (I) **blau**: Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette (F, W und Y);
- (II) **gelb**: Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette (A, G, I, L, P und V);
- (III) **orange**: Aminosäuren mit polarer, positiv geladener Seitenkette (H, K und R);
- (IV) **grün**: Aminosäuren mit polarer, negativ geladener Seitenkette (D und E);
- (V) **pink**: Aminosäuren mit polarer, ungeladener Seitenkette (C, M, N, Q, S und T).

Durch Verschieben der Sequenzen untereinander konnten Gruppen mit einem vergleichbaren Farbmuster gebildet werden, die dann als Motive definiert wurden. Als Beispiel ist die Zuordnung für das Motiv N3 in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Bestimmung des Motivs N3 aus den N-terminalen Aminosäuren der co-gereinigten Proteine. Die gemeinsamen Aminosäuren des Motivs N3 sind im Kasten zu erkennen.

Datenbank-nummer	Funktion	N-terminale Aminosäuresequenz																			
Cg1814	Carbamoylphosphat-Synthase, kleine Kette	M	S	K	D	T	T	T	Y	Q	G	V	T	E	I	G	S				
Cg3079	ClpB					M	S	S	F	N	P	T	T	K	T	N	E				
Cg2708	hypothetischer ABC-typ Transporter (ATPase)		M	A		T	V	T	F	K	D	A	S	L	S	Y	P				
Cg3409	Phosphomethylpyrimidin-Kinase					M	V	N	Y	A	F	V	I	A	G	S	E				
Cg1283	Shikimat-5-Dehydrogenase					M	V	N	Y	V	D	R	E	T	T	L	C				
Cg3327	Dps					M	A	N	Y	T	V	P	G	I	N	E	N				
Cg1784	Ornithincyclodeaminase		M			T	A	T	Y	T	T	E	T	A	I	N	F				
Cg3308	Ribosomales Protein S6					M	R	Q	Y	E	L	M	I	I	L	D	P				

Auf diese Weise wurden 10 N-terminale und 10 C-terminale potentielle ClpC-Erkennungsmotive abgeleitet sowie ein Konsensusmotiv für die verschiedenen Motive ermittelt (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Ableitung von möglichen N- bzw. C-terminalen Erkennungsmotiven für ClpC in den mit ClpP co-gereinigten Proteinen. Die Abkürzungen in dem Konsensusmotiv haben folgende Bedeutungen: (P): Aminosäuren mit polarer Seitenkette, (P⁺) entsprechen Aminosäuren mit polarer, positiv geladener Seitenkette, (P⁻) Aminosäuren mit polarer, negativ geladener Seitenkette, (A) Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette, (R) entsprechen Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette und (X) kann jede Aminosäure sein.

N-terminale Erkennungsmotive			
Motiv	Konsensussequenz	Beispiel	Bestimmung aus den Proteinen
Motiv N1	(P)-A-(P ⁺)-(X)-(P,A)	MAKLI-; (Cg0693)	Cg0587, Cg0693, Cg0783, Cg1111, Cg1157, Cg1698, Cg1789, Cg2368, Cg2466, Cg2902, Cg3011, Cg3092, Cg3100, Cg3323
Motiv N2	(P)-(P)-(P ⁺)-(P)	MTEQ-; (Cg2559)	Cg0610, Cg1017, Cg1145, Cg1366, Cg1784, Cg2091, Cg2192, Cg2559, Cg3079
Motiv N3	(P)-(P,A)-(P)-(R)	MANY-; (Cg3327)	Cg0610, Cg1283, Cg1784, Cg1814, Cg2708, Cg3079, Cg3308, Cg3327, Cg3409
Motiv N4	(P)-(A)-(A)-(P)-(P)-(P,A)	MAANNV-; (Cg2692)	Cg0655, Cg2342, Cg2692, Cg3155, Cg3198
Motiv N5	(P)-(P ⁺)-(A)-(P,A)-(P)	MHAAS-; (Cg1365)	Cg1133, Cg1365, Cg1409, Cg2166, Cg2291, Cg2342, Cg2958
Motiv N6	(A)-(A)-(A)-(A)-(X) ₂ -G	-GAPPDMG-; (Cg2833)	Cg0387, Cg1338, Cg1586, Cg1698, Cg1783, Cg2091, Cg2291, Cg2366, Cg2833, Cg2958, Cg3100, Cg3198, Cg3255, Cg3323
Motiv N7	MFER	MFER-; (Cg0949)	Cg0949, Cg2963

Fortsetzung Tabelle 4.4

Motiv	Konsensussequenz	Beispiel	Bestimmung aus den Proteinen
Motiv N8	MA-(P)	MAT-; (Cg1367)	Cg0572, Cg0583, Cg0587, Cg0693, Cg0783, Cg1111, Cg1367, Cg1789, Cg2466, Cg2499, Cg2708, Cg3011, Cg3327
Motiv N9	ME-(X)-(P)	MEDM-; (Cg1409)	Cg1409, Cg1737, Cg2902
Motiv N10	(P)-(P)-(P)	MST-; (Cg3323)	Cg0387, Cg0867, Cg1586, Cg1606, Cg1762, Cg2366, Cg2368, Cg3079, Cg3255, Cg3323
C-terminale Erkennungsmotive			
Motiv	Konsensussequenz	Beispiel	Bestimmung aus den Proteinen
Motiv C1	(P ⁺)-(X)-(X)-(P ⁺)	-KIIK; (Cg0587)	Cg0587, Cg0693, Cg0783, Cg0949, Cg1145, Cg1365, Cg1366, Cg1586, Cg1698, Cg2192, Cg2291, Cg2559, Cg3255, Cg3308
Motiv C2	(P)-K	-IK; (Cg1762)	Cg0572, Cg1283, Cg1366, Cg1420, Cg1737, Cg1762, Cg1814, Cg2692, Cg3068, Cg3100, Cg3155, Cg3255, Cg3409
Motiv C3	(R)-(P)	-FQ-; (Cg1111)	Cg0783, Cg1111, Cg1133, Cg1157, Cg1283, Cg2708, Cg2958
Motiv C4	(R)	-F; (Cg3011)	Cg0783, Cg1145, Cg3011, Cg3092
Motiv C5	(P)-(P)	-NN; (Cg2368)	Cg0610, Cg1017, Cg1338, Cg1586, Cg1737, Cg1783, Cg2091, Cg2368, Cg2708, Cg3068
Motiv C6	(A)-(P ⁻)-(P)	-AED; (Cg2141)	Cg0610, Cg0655, Cg0693, Cg0783, Cg0949, Cg1133, Cg1283, Cg2141, Cg2166, Cg2192, Cg2222, Cg2291, Cg2366, Cg2466, Cg2499, Cg2833, Cg3100, Cg3409
Motiv C7	(P,A)-(P)-(A)-(P)	-GTAS; (Cg0583)	Cg0583, Cg0867, Cg1157, Cg2342, Cg3327
Motiv C8	(P ⁺)-(A)-(P ⁺)	-RVH-; (Cg1606)	Cg0583, Cg1365, Cg1420, Cg1606, Cg2166, Cg2291, Cg2559, Cg2708, Cg3327
Motiv C9	(A)-(A)-(P ⁻)-(A)	-LIDA; (Cg2902)	Cg0387, Cg0693, Cg0867, Cg1111, Cg1338, Cg1365, Cg1606, Cg1698, Cg1762, Cg2166, Cg2192, Cg2222, Cg2368, Cg2902, Cg2958, Cg3079, Cg3323, Cg3327
Motiv C10	(P)-(A)-(A)	-TIV; (Cg1133)	Cg1133, Cg1409, Cg1784, Cg1789, Cg2963

4.3.2 Überprüfung der Relevanz der abgeleiteten Motive

Um zu überprüfen, ob die in Tabelle 4.4 dargestellten N-terminalen Sequenzmotive für die Erkennung von Proteinen durch die ClpCP-Protease tatsächlich relevant sind, wurden diese Motive mit einem Testprotein fusioniert, das vermutlich kein ClpCP-Substrat darstellt. Die Halbwertszeit dieses Fusionsproteins wurde dann in Stämmen mit und ohne ClpC anhand von Western-Blot-Analysen bestimmt. Funktionelle ClpC-Erkennungsmotive sollten zu einer verringerten Halbwertszeit des Fusionsproteins in *clpC*⁺-Stämmen führen. Als Testprotein wurde PhoR gewählt, der Antwortregulator des

Zweikomponenten-Regulationssystems PhoSR. PhoR aktiviert Gene, die an der Phosphat-Mangelantwort beteiligt sind (Kočan et al., 2006; Schaaf und Bott, 2007). Die Fusionsproteine aus dem putativen Erkennungsmotiv und PhoR (N-PhoR) sollten ursprünglich in den Stämmen *C. glutamicum* $\Delta phoR$ (ClpC präsent) und *C. glutamicum* $\Delta clpC$ $\Delta phoR$ (ClpC abwesend) plasmidkodiert synthetisiert werden. Der Stamm *C. glutamicum* $\Delta phoR$ stammt von Sarah Schaaf (AG Bott, IBT1). Alle Versuche, das *clpC*-Gen in der $\Delta phoR$ -Mutante zu deletieren, waren nicht erfolgreich. Ebenso scheiterte der Versuch einer Deletion von *phoR* im Stamm *C. glutamicum* $\Delta clpC$. Dies deutet darauf hin, dass eine gleichzeitige Deletion von *phoR* und *clpC* für die Zelle lethal ist. Alternativ erfolgte daher die Synthese der Fusionsproteine in den Einzelmutanten $\Delta phoR$ (ClpC anwesend) und $\Delta clpC$ (ClpC abwesend). Der Stamm $\Delta clpC$ besitzt im Gegensatz zu $\Delta phoR$ neben dem Fusionsprotein auch noch natives, chromosomal kodiertes PhoR-Protein. Um dessen Menge und Halbwertszeit zu bestimmen, wurde der Stamm $\Delta clpC$ auf BHI-Medium mit 2 % Glukose kultiviert. Bei einer OD_{600} von 5 - 6 wurde sowohl die Transkription mit Rifampicin (250 $\mu\text{g/ml}$) als auch die Translation mit Tetracyclin (100 $\mu\text{g/ml}$) gehemmt. Zu den Zeitpunkten 0 min (vor Zugabe von Rifampicin und Tetracyclin) und bis 70 min nach Zugabe wurden alle 10 min eine Probe entnommen. Die Proben wurden auf die gleiche OD_{600} von 20 eingestellt, um gleiche Zellmengen für die SDS-PAGE einzusetzen. Die Proben wurden für 15 min bei 95 °C hitzedenaturiert, durch SDS-PAGE getrennt und mittels Western-Blot mit Anti-PhoR-Antikörpern analysiert. Wie Abbildung 4.20 zeigt, ist PhoR bereits vor Zugabe der Hemmstoffe mit der gewählten Detektionsmethode nur schwach nachweisbar und nach 10 min praktisch gar nicht mehr vorhanden war.

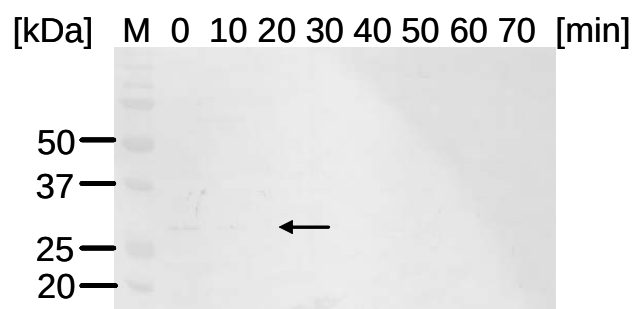


Abbildung 4.20: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit von PhoR in *C. glutamicum* $\Delta clpC$. Es wurden jeweils gleiche Zellmengen (Zellen aus 1 ml einer Suspension mit einer OD_{600} von 20) pro Spur aufgetragen. Mit M ist der Molekulargewichtsstandard Precision Plus (Biorad, München) bezeichnet.

Für die Konstruktion der plasmidkodierte Fusionsproteine N-PhoR wurden das PhoR-Gen unter Verwendung der Oligonukleotide OE-N1-phoR-fw bis OE-N10-phoR-fw jeweils mit OE-phoR-rv durch PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide OE-N1-phoR-fw bis OE-N10-phoR-fw enthalten eine Ribosomenbindungsstelle sowie die gewünschten N-terminalen Motive (siehe Tabelle 3.2). Das PCR-Fragment für unmodifiziertes PhoR (Schaaf und Bott, 2007) wurde mit den Oligonukleotiden OE-phoR-fw und OE-phoR-rv hergestellt. Nach Restriktion mit KpnI und SbfI wurden die PCR-Fragmente in das Plasmid pEKEx2 kloniert und rekombinante Plasmide durch Restriktionsanalyse sowie DNA-Sequenzierung kontrolliert (siehe auch Abbildungen 7.1 bis 7.11). Fehlerfreie Plasmide wurden in die Stämme $\Delta phoR$ und $\Delta clpC$ transferiert. Dies gelang mit Ausnahme der Transformation von $\Delta clpC$ mit pEKEx2-N4-*phoR*. Alle Stämme wurden in BHI-Medium kultiviert. Die $\Delta clpC$ -Stämme wurden mit 2 % Glukose kultiviert. Dies könnte einen Einfluss auf die Bestimmung der Halbwertszeit von PhoR und der Derivate haben, war jedoch notwendig, da eine Kultivierung ohne Glukose-Supplementation nicht möglich war. Bei einer OD_{600} von 3 - 5 wurde die Synthese von plasmidkodiertem PhoR und dessen Derivaten mit IPTG induziert und exakt eine Stunde nach Induktion sowohl die Transkription mit Rifampicin als auch die Translation mit Tetracyclin gehemmt. Analog zur Bestimmung der Konzentration von chromosomal kodiertem PhoR in $\Delta clpC$ wurden zu den Zeitpunkten 0 min (vor Zugabe der Hemmstoffe) bis 70 min nach Zugabe der Hemmstoffe alle 10 min eine Probe entnommen. Die Proben wurden wie oben beschrieben durch Western-Blot-Analyse mit Anti-PhoR-Antikörpern analysiert (Abbildung 4.21).

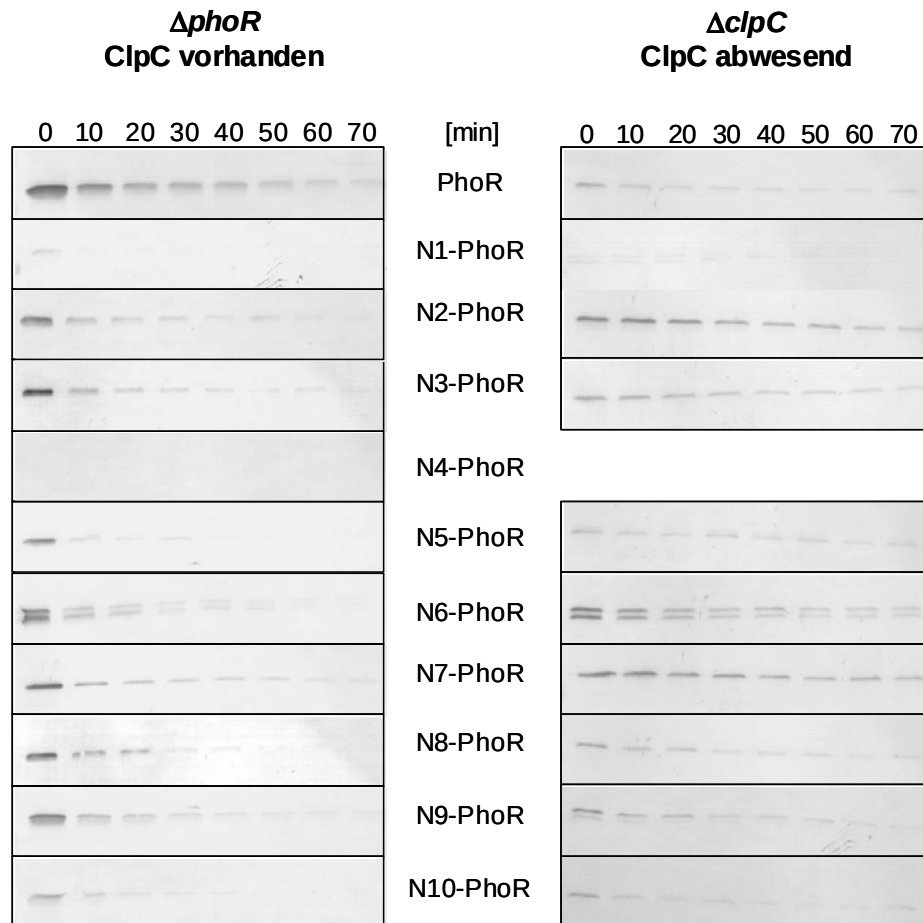


Abbildung 4.21: Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit von Wildtyp-PhoR und den 10 N-PhoR-Derivaten in den Stämmen *C. glutamicum* $\Delta phoR$ und *C. glutamicum* $\Delta clpC$. Es wurde jeweils identische Mengen hitzedenaturierter Zellen aufgetragen. Von N4-PhoR war keine Western-Blot-Analyse in $\Delta clpC$ möglich, da die Transformation des Stammes mit dem entsprechenden Plasmid nicht gelang.

Ein Vergleich der Abbildung 4.20 mit der Abbildung 4.21 zeigt, dass für die Berechnung der Halbwertszeiten die Menge an chromosomal kodierten PhoR in $\Delta clpC$ bei gleich aufgetragenen Zellmengen vernachlässigbar ist. Anhand der Abnahme der Intensitäten lassen sich die Halbwertszeiten von PhoR und den N-terminalen Derivaten in An- und Abwesenheit von ClpC bestimmen. Dazu wurden die gefärbten Membranen mit der AIDA-Software (siehe 3.10.10) ausgewertet, wobei für jede Spur die Intensitäten aller betrachteten Pixel nach Subtraktion des Hintergrunds bestimmt wurden. Zur Berechnung der Halbwertszeit wurde die Intensität vor Zugabe der Hemmstoffe (0 min) gleich 100 % gesetzt und die Intensitäten der Banden, die nach Zugabe der Hemmstoffe erhalten wurden, dazu in Bezug gesetzt. Die relativen Intensitäten wurden gegen die Zeit

aufgetragen und durch die Punkte eine exponentielle Regressionskurve gelegt. Anhand der Kurvengleichung wurde die Zeit ermittelt, bei der nur noch 50 % der Anfangsintensität vorhanden waren (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Bestimmung der Halbwertszeit von PhoR und den 10 N-PhoR-Derivaten mittels relativer Quantifizierung der u. a. in Abb. 4.21 gezeigten Western-Blot-Analysen. Die Halbwertszeiten wurden durch exponentielle Regression mit Hilfe der Excel-Software (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) bestimmt und stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit zugehöriger Standardabweichung dar. Aminosäuren des abgeleiteten Motivs sind unterstrichen.

Motiv	Halbwertszeit [min]		Sequenz aus	Fusionierte AS
	$\Delta phoR$	$\Delta clpC$		
PhoR	16,6 ± 5,1	16,2 ± 2,9	-	-
N1-PhoR	n. b.	n. b.	GroEL1	<u>MAKLI</u> AF
N2-PhoR	7,9 ± 3,2	26,7 ± 3,1	Malatsynthase	<u>MTEQEL</u>
N3-PhoR	7,0 ± 2,5	17,8 ± 6,6	ClgR	<u>MVTY</u> TLLDKP
N4-PhoR	n. b.	n. b.	Thioesterase	<u>MAANN</u> VN
N5-PhoR	4,1 ± 0,8	18,9 ± 0,7	GlnK	<u>MKLIT</u> AI
N6-PhoR	6,5 ± 3,3	17,9 ± 4,1	Cysteinsynthase	MIGAPP <u>D</u> MGN
N7-PhoR	9,9 ± 1,1	19,7 ± 5,0	Citratsynthase	<u>MFER</u> DI
N8-PhoR	9,0 ± 4,2	16,5 ± 2,2	ATP-Synthase (γ - UE)	<u>MATIREL</u>
N9-PhoR	5,1 ± 1,8	12,1 ± 2,1	6-Phosphofruktokinase	<u>MEDM</u> RIA
N10-PhoR	7,4 ± 3,5	21,8 ± 2,3	Myoinositol-P-Synthase*	<u>MSTSTIR</u>

n. b. = nicht bestimmbar; *Myoinositol-1-phosphat-Synthase

Tabelle 4.5 zeigt die Halbwertszeiten von PhoR und den 10 N-PhoR-Derivaten. Für natives PhoR in An- und Abwesenheit von ClpC wurde eine Halbwertszeit von ca. 16 min bestimmt. Alle analysierbaren PhoR-Fusionsproteine zeigten in Anwesenheit von ClpC eine 1,5- bis 3-fach niedrigere Halbwertszeit im Vergleich zu nativem PhoR. In Abwesenheit von ClpC zeigten die meisten Fusionsproteine eine längere Halbwertszeit als in Anwesenheit von ClpC. Mit Ausnahme von N9-PhoR zeigten alle Fusionsproteine sogar eine höhere Halbwertszeit als das native PhoR-Protein. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die N-termini von Malatsynthase (MAKLI), ClgR (MVTY), GlnK (MKLIT), Cysteinsynthase (MIGAPPDMG), Citratsynthase (MFER), der γ -UE der ATP-Synthase (MAT), der 6-Phosphofruktokinase (MEDM) und der Myoinositol-1-phosphat-Synthase (MST) von ClpCP erkannt werden und zu einer schnelleren Proteolyse des Proteins führen.

4.3.3 Einfluss des N-Terminus von ClgR auf dessen Stabilität

Das erste identifizierte Substrat der ClpCP-Protease war der Transkriptionsregulator ClgR, der nur in Abwesenheit von ClpC oder ClpP1 und ClpP2 nachweisbar ist (Engels et al., 2004 und 2005). Unklar ist bis jetzt, unter welchen Bedingungen und wodurch der Abbau von ClgR verhindert wird. Wird plasmidkodiertes ClgR in dem Stamm *C. glutamicum* $\Delta clpC \Delta clgR$ überproduziert, kann es nach 2D-Gelelektrophorese der löslichen Zellfraktion an drei verschiedenen Positionen im Gel nachgewiesen werden (Engels, 2004). Neben geringen Abweichungen in der Größe war zu beobachten, dass die ClgR-Proteinspots unterschiedliche isoelektrische Punkte im Bereich von 4,72 bis 4,94 aufwiesen und damit deutlich vom theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,42 abwichen. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Verschiebung auf eine Modifikation oder Prozessierung von ClgR zurückzuführen ist. Wie oben gezeigt, führte die Fusion der 11 N-terminalen Aminosäuren von ClgR mit dem PhoR-Protein zu einer Verringerung der Halbwertszeit. Es wäre somit denkbar, dass ClgR durch Prozessierung seines N-Terminus vor der Proteolyse geschützt wird. Um diese Hypothese zu testen, sollte der N-Terminus von ClgR bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde ClgR mit einem C-terminalen StrepTag-II in den Stämmen *E. coli* BB1553 pEKEx1-clgR-C und *C. glutamicum* $\Delta clpC \Delta clgR$ pEKEx1-clgR-C überproduziert und mittels Streptactin-Affinitätschromatographie gereinigt.

MVTYTTLLDK PISESAPRKA PEPLLREALG AALRSFRADK GVTLRELAEA
SRVSPGYLSE LERGRKEVSS ELLASVCHAL GASVADVLIE AAGSMALQAA
QEDLARVWSH PQFEK

Abbildung 4.22: Aminosäuresequenz von ClgR aus *C. glutamicum* (107 Aminosäurereste) mit einem C-terminalen StrepTag-II aus acht Aminosäuren (unterstrichen).

Bei der N-terminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau wurden mehrere N-Termini bestimmt (vgl. Abb. 4.22). Für ClgR-C, das aus *E. coli* gereinigt worden war, wurde die Sequenz VTY erhalten. Dies entspricht den Aminosäureresten zwei bis vier der vorhergesagten Sequenz. Das Startmethionin wurde in diesem Fall also abgespalten. Für ClgR-C, das aus *C. glutamicum* gereinigt worden war, konnte keine einheitliche Sequenz erhalten werden, sondern eine Mischung mehrerer Sequenzen: (MVT)-(VT)-(tYL)-(YtL)-(TD)-(tKI). Die Kleinbuchstaben deuten an, dass für diese Reste schwächere Signale erhalten wurden. Aus dieser Sequenzmischung lassen sich drei N-Termini ableiten: MVTYTT, VTYTT (Startmethionin abgespalten) und TTLLDK (Fehlen der ersten vier Aminosäuren). Die letztgenannte Form scheint in dem Gemisch am stärksten

vertreten zu sein. Eine Abspaltung der ersten vier Aminosäuren führt nicht zu einer Änderung des isoelektrischen Punktes von ClgR, so dass die Abweichungen von dem theoretischen isoelektrischen Punkt wahrscheinlich nicht durch die beobachtete N-terminale Prozessierung von ClgR verursacht werden. Weitere Modifikationen von ClgR wie zum Beispiel Phosphorylierung sind denkbar.

4.4 Bioinformatische Auswertung möglicher Substrate der ClpXP-Protease

Polypeptidketten, die bei Translation unvollständiger mRNA entstanden sind, werden mit einem durch die tmRNA kodierten Signal zum Abbau durch Clp-Proteasen markiert. Dieses Signal besteht aus mindestens 11 Aminosäuren, die der im Ribosom „gefangenen“ Polypeptidkette angefügt werden. In *E. coli* werden Proteine mit dem *ssrA*-„Tag“ vor allem durch ClpXP, aber auch durch ClpAP, abgebaut (Farrell et al., 2005). Dabei erkennt ClpX die letzten drei Aminosäuren des *ssrA*-„Tags“ (AANDENYALAA) und die Degradation wird zusätzlich durch SspB, welches die ersten vier Aminosäuren erkennt, begünstigt (Flynn et al., 2001). Da die Sequenz des *C. glutamicum*-Genoms bekannt ist, kann durch Sequenzvergleich die tmRNA sowie die Sequenz des *ssrA*-„Tags“ bestimmt werden: AAEKSQRDYALAA (<http://www.indiana.edu/~tmrna/>). Der *C. glutamicum* *ssrA*-„Tag“ ist um zwei Aminosäuren länger als der aus *E. coli* und innerhalb der *Actinomycetales* hochkonserviert (Abb. 4.23).

Cgl	1	AA----	EKSQRDYALAA
Cef	1	AA----	EKTQRDYALAA
Cdi	1	AA----	ENTQRDYALAA
Req	1	AA----	ESTQREYALAA
Mbo	1	AA----	DSHQRDYALAA
Mav	1	AA----	DSHQRDYALAA
Mtu	1	AA----	DSHQRDYALAA
Mle	1	AA----	DSYQRDYALAA
Msm	1	AA----	DSNQRDYALAA
Tfu	1	AA----	NSKRTEFALAA
Blo	1	AA----	KSNRTEFALAA
Sco	1	AANTKR	DSSQQAFAALAA
Sli	1	AANTKR	DSSQQAFAALAA

Abbildung 4.23: Sequenzalignment des *ssrA*-„Tags“ aus verschiedenen Actinomyceten. Alle Sequenzen wurden nach <http://www.indiana.edu/~tmrna/> bestimmt und mit dem Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) verglichen. Die Abkürzungen stehen für *C. glutamicum* (Cgl), *C. efficiens* (Cef), *C. diphtheriae* (Cdi), *Rhodococcus equi* (Req), *M. bovis* (Mbo), *M. avium* (Mav), *M. tuberculosis* (Mtu), *M. leprae* (Mle), *M. smegmatis* (Msm), *Thermobifida fusca* (Tfu), *B. longum* (Blo), *S. coelicolor* (Sco) und *S. lividans* (Sli).

Fast alle *ssrA*-„Tags“ weisen ein C-terminales Ala-Ala-Motiv auf. Dieses für die Erkennung durch ClpX wichtige Motiv konnte auch in Substraten der *E. coli* ClpXP-Protease bestimmt werden (Flynn et al., 2003). Unter der Annahme, dass ClpX aus *C. glutamicum* ebenfalls das Ala-Ala-Motiv des *ssrA*-„Tags“ erkennt, lassen sich durch bioinformatische Analyse aller Proteine von *C. glutamicum* potentielle Substrate der ClpXP-Protease mit einem C-terminalen Ala-Ala-Motiv identifizieren. Dabei sucht man mit Hilfe des Programms „Pattern search“ der Bioinformatik-Suite ERGO (<http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO/>) nach DNA-Sequenzen des Typs GCN GCN TAA, GCN GCN TGA und GCN GCN TAG. Bei dieser Suche wurden 35 Proteine mit einem C-terminalem Ala-Ala-Motiv identifiziert (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: *C. glutamicum*-Proteine mit einem C-terminalen Ala-Ala-Motiv, die putative Substrate der ClpXP-Protease darstellen. Die Annotation wurde der Swissprot-Datenbank entnommen (<http://expasy.org/sprot/>).

C-terminale Sequenz	Datenbanknummer	Annotation
EAAAA	Cg1178	Transposase
LAAAA	Cg1938	hypothetisches Protein
RKAAA	Cg1233	hypothetisches Membranprotein
TFAAA	Cg2561	Thiamin-Biosyntheseprotein X
VPAAA	Cg2318	ABC-Typ-Transporter, periplasmatische Komponente
ATAAA	Cg2789	Glutaredoxin
DTCAA	Cg1427	hypothetisches, sekretiertes Protein
SVDAA	Cg2381	hypothetisches Protein
AADAA	Cg2662	Aminopeptidase N
NSEAA	Cg0906	hypothetisches Protein
QTEAA	Cg1967	hypothetisches Protein
WIEAA	Cg2585	hypothetisches Protein
ACFAA	Cg4001	hypothetisches Protein
WAIAA	Cg1662	hypothetisches Protein
GTIAA	Cg2863	Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase I
RRIAA	Cg0875	HNH-Endonuklease
AIKAA	Cg1322	hypothetisches, sekretiertes Protein
APKAA	Cg1565	ribosomales Protein L20
ELKAA	Cg0182	3-Methyladenin-DNA-Glykosylase
YALAA	Cg2005	hypothetisches Protein
HLLAA	Cg1091	hypothetisches Protein
VALAA	Cg2322	hypothetisches Protein
EGLAA	Cg2727	hypothetisches, sekretiertes Protein
RGMAA	Cg2564	hypothetisches Protein
FPPAA	Cg2774	Nicotinsäurephosphoribosyltransferase
LKQAA	Cg2973	hypothetisches Protein
SKSAA	Cg1287	putativer Transkriptionsregulator der LysR-Familie
TESAA	Cg3230	putativer Transkriptionsregulator
AASAA	Cg2003	DNA-/RNA-Helikase der SNF2-Familie

Fortsetzung Tabelle 4.6

C-terminale Sequenz	Datenbanknummer	Annotation
INSAA	Cg2712	putativer Transkriptionsregulator der SyrB-Familie
EITAA	Cg2736	Thioredoxinperoxidase
GEVAA	Cg0362	Putatives Septumseitendifferenzierungsprotein
SEVAA	Cg2227	putative ATPase/Chaperon
SEVAA	Cg0061	Zellteilungsprotein FtsW
EVVAA	Cg3306	ribosomales Protein L9

5 Diskussion

5.1 Identifizierung von potentiellen Substraten der ClpCP-Protease

5.1.1 Co-Reinigung von potentiellen Substraten mit inaktivem ClpP1 und ClpP2

Das System der ClpXP-Substratfalle aus *E. coli* (Flynn et al., 2003) sollte auf *C. glutamicum* übertragen werden, um das Substratspektrum der ClpCP-Protease aufzuklären. Durch Deletion des Gens für *smpB* zur Inaktivierung des Ribosomen-Rettungssystems und der Gene der alternativen Clp-ATPasen ClpE und ClpX sowie durch Konstruktion von Plasmiden zur Produktion inaktiver ClpP1- bzw. ClpP2-Derivate konnten die beiden Substratfallenstämme ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} erhalten werden. Mit einer konditionalen *clpP1P2*-Mutante (*C. glutamicum* P_{tetA} -*clpP1P2* pJC1- P_{gap} -*tetR*) konnte durch Engels (2004) gezeigt werden, dass der Stamm bei Repression des chromosomalen *clpP1P2*-Operons nach 24 h nur eine OD₆₀₀ von 20 erreicht, während bei aktiver Transkription von *clpP1P2* nach 24 h eine OD₆₀₀ von 40 erreicht wird. Dieser Effekt konnte auf einen Mangel der essentiellen ClpP-Peptidasen ClpP1 bzw. ClpP2 zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu führte das Wachstum der Substratfallenstämme ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} unter *clpP1P2*-reprimierenden Bedingungen nicht zu einem früheren Eintritt in die stationäre Phase. ClpCP1^{TRAP} und ClpCP2^{TRAP} erreichten unter diesen Bedingungen nach 24 h eine OD₆₀₀ von ca. 40. Ausgehend davon führte eine weitere Kultivierung durch Überimpfen wiederum zu einer OD₆₀₀ von ca. 40 nach 24 h. Somit konnte eine TetR-abhängige Repression des chromosomalen *clpP1P2*-Operons in den Substratfallenstämmen nicht gezeigt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt können keine Gründe für diesen Sachverhalt gegeben werden. Es könnte somit bei gleichzeitiger Produktion der inaktiven ClpP-Derivate zu einer Mischung aus aktiven und inaktiven ClpP-Untereinheiten im proteolytischen Kern kommen, wobei die inaktiven Derivate in großer Mehrheit in der Zelle vorliegen sollten. Des Weiteren ist eine gewisse Konzentration an aktiven proteolytischen Untereinheiten durchaus erwünscht, da eine Prozessierung der inaktiven Derivate stattfinden muss (Maurizi et al., 1990a und 1990b). Es besteht aber die Gefahr, dass die mit dem proteolytischen Kern co-gereinigten Proteine zumindest partiell gespalten werden könnten. Ob dies auch mit einer kleineren Anzahl aktiver Zentren möglich wäre, ist unbekannt.

Eine Reinigung von ClpP1*-ST aus ClpCP1^{TRAP} zeigte, dass zahlreiche Proteine co-gereinigt wurden. Erste Identifizierungsversuche dieser Proteine mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie führten zu einem Nachweis von ClpP1 in Proteinspots, die eine andere molekulare Masse bzw. einen anderen pI hatten, als die für ClpP1*-ST berechnete bzw. experimentell bestimmte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die 2D-Gelelektrophorese mit einer Proteinlösung durchgeführt wurde, die erwartungsgemäß vor allem ClpP1*-ST enthält, was zu einer Aggregation von co-gereinigtem Protein und ClpP1*-ST führen könnte (vgl. Abbildung 4.8). Durch Denaturierung der Proteinlösung, die ClpP1*-ST und die co-gereinigten Proteine enthielt, mit Guanidiniumhydrochlorid konnten letztere aus dem proteolytischen Kern „befreit“ werden. Eine weitere Affinitätschromatographie zur erneuten Bindung von ClpP1*-ST an die StrepTactin-Säule, führte schließlich zur Entfernung eines Großteils von ClpP1*-ST aus der Proteinlösung (Abbildung 4.10). Diese Methodik wurde für alle weiteren Experimente angewendet und führte zu einer verbesserten 2D-Gelelektrophorese, da nun keine Identifizierung von ClpP in anderen Proteinspots mehr zu beobachten war.

5.1.2 Kontrollen zur Spezifität der Co-Reinigung

Die Überproduktion und Reinigung von inaktivem ClpP1*-ST und ClpP2*-ST mit gleichzeitiger Co-Reinigung von potentiellen Substraten konnte erfolgreich durchgeführt werden. Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese waren zahlreiche Proteine mit ClpP1 und ClpP2 co-gereinigt worden, was auf eine Erkennung dieser Substrate durch die einzig verbliebene Clp-ATPase ClpC zurückzuführen ist. Aus der Abbildung 4.10 wird deutlich, dass sicher mehr als 100 Proteine mit den proteolytischen Untereinheiten co-gereinigt wurden. Zur Kontrolle der Spezifität der Co-Reinigung sollte diese in einem Stamm wiederholt werden, bei dem neben *clpX* und *clpE* auch das *clpC*-Gen deletiert ist. Ein solcher Stamm, der vermutlich keine mit ClpP interagierende Clp-ATPase mehr besitzt, konnte jedoch nicht erhalten werden. Vermutlich ist eine simultane Deletion von *clpC*, *clpE* und *clpX* in *C. glutamicum* letal.

Da zur Co-Reinigung eine inaktive Protease benötigt wird, sollte eine Reinigung mit aktivem ClpP1-ST bzw. ClpP2-ST zeigen, dass keine Proteine co-gereinigt werden können, da diese im proteolytischen Kern der Protease abgebaut werden. Entgegen dieser Annahme wurden aber viele Proteine co-gereinigt. Eine Erklärung hierfür könnten die Studien von Ortega et al. (2000 und 2002) sein, die auch als Ausgangsbasis für die Entwicklung der Substratfallenstämme dienten. Darin konnte gezeigt werden, dass nur inaktive ClpP-Proteine Substrate im Kern akkumulieren, während aktive ClpP-Proteine die Substrate dagegen sehr schnell degradieren. Dies deutet darauf hin, dass im Fall von

ClpP1-ST und ClpP2-ST der C-terminale StrepTag-II zu einer Inaktivierung der Proteasen führt, so dass sich auch ohne den Serin-Glycin-Austausch im aktiven Zentrum Substrate im proteolytischen Kern anreichern können. Deshalb wurden auch die Proteine, die mit unmutiertem, aber möglicherweise inaktivem ClpP1-ST bzw. ClpP2-ST co-gereinigt wurden, als potentielle Substrate von ClpCP betrachtet. Um eine Reinigung mit einem aktiven ClpP1-Derivat durchzuführen, sollte statt eines C-terminalen StrepTags ein N-terminaler StrepTag eingeführt werden. In früheren Untersuchungen konnte ein ClpP1-Derivat mit einem N-terminalen His-„Tag“ nicht durch Ni^{2+} -Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Steffen Schaffer (unpublizierte Ergebnisse) konnte zeigen, dass ClpP1 und ClpP2 aus *C. glutamicum* ebenso wie ClpP-Proteine aus anderen Organismen N-terminal prozessiert werden (Maurizi et al., 1990a; Viala und Mazodier, 2002; Brötz-Oesterhelt et al., 2005). Diese Prozessierung liefert eine plausible Erklärung für die misslungene Reinigung von ClpP mit N-terminalem His-„Tag“. Um trotzdem mit einem N-terminalen „Tag“ zu arbeiten, wurde ein ClpP1-Derivat konstruiert, bei dem der StrepTag-II nicht vor das Startmethionin, sondern vor den vermuteten N-Terminus des prozessierten Proteins angehängt wurde (ClpP1-NStrep). Eine Reinigung dieses Derivats war erfolgreich und führte nicht zur Co-Reinigung weiterer Proteine (vgl. Abbildung 4.15), jedoch trat das gereinigte ClpP1-NStrep im SDS-Gel als Doppelbande auf, was auf eine Degradation oder eine weitere Prozessierung des Proteins hindeuten könnte. Für die fehlende Co-Reinigung von Proteinen mit ClpP1-NStrep gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- (I) Das Protein bildet einen funktionellen ClpCP-Komplex und die Substrate werden im proteolytischen Kern rasch degradiert
- (II) Der N-terminale StrepTag-II verhindert eine Interaktion mit ClpC und damit die Bildung eines funktionellen ClpCP-Komplexes. In diesem Fall ist ebenfalls keine Co-Reinigung mit ClpC-Substraten möglich

Die letztgenannte Möglichkeit beruht auf dem Wissen, dass der prozessierte N-Terminus eine wichtige Rolle bei der Interaktion von ClpP mit der Clp-ATPase spielt. Kristallographische Beobachtungen deuten darauf hin, dass er hochgradig beweglich ist. Mutationen innerhalb des prozessierten N-Terminus führten zu Konformationsänderungen des ClpP-Tetradecamers und zur Destabilisierung der Interaktion zwischen dem proteolytischen Kern und der Clp-ATPase (Gribun et al., 2005; Bewley et al., 2005; Szyk und Maurizi, 2006). Ein *in vitro* Aktivitätstest mit ClpP1-NStrep könnte den Einfluss des N-terminalen „Tags“ auf die Aktivität von ClpP1 zeigen (siehe 5.6). Abschließend war es bisher nicht möglich, eine Reinigung eines mit Sicherheit

aktiven ClpP-Proteins durchzuführen, um die Spezifität der Co-Reinigung mit ClpP1*-ST und ClpP2*-ST zu kontrollieren.

Alternativ sollte daher getestet werden, ob die Reinigung eines beliebigen anderen Proteins aus dem Ausgangsstamm der Substratfallenstämme (*C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE \Delta clpX P_{tetA-clpP1P2}$) zur Co-Reinigung vieler weiterer Proteine führt. Dazu wurde die E1-Untereinheit (OdhA) des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes gewählt. Eine Reinigung von OdhA mit C-terminalem StrepTag-II (OdhA-ST), das mit Hilfe des Plasmids pXMJ19-*odhA*-ST überproduziert werden sollte, war nicht möglich. Das *odhA*-Gen wurde inklusive von 70 bp stromaufwärts des Startcodons in pXMJ19 kloniert. Es könnte sein, dass innerhalb dieses Bereiches ein Repressor binden kann und die Transkription des Gens verhindert. Um dennoch OdhA reinigen zu können, wurde das Plasmid pAN6-*odhA* (Axel Niebisch) verwendet, das nur den kodierenden Bereich des *odhA*-Gens enthält. Wie die Abbildung 4.17 zeigt, wurde OdhA-ST aus dem Stamm *C. glutamicum* $\Delta smpB \Delta clpE \Delta clpX P_{tetA-clpP1P2}$ pAN6-*odhA* nahezu homogen als Doppelbande gereinigt. Die Identität der Doppelbande wurden nicht bestimmt, jedoch stimmt die Größe der oberen Bande mit der theoretischen Masse von OdhA-ST überein. Eine Silberfärbung zeigte schwache zusätzliche Banden, die eine geringere molekulare Masse haben als OdhA selbst. Es wird vermutet, dass es sich dabei um Abbauprodukte von OdhA handelt. Ein direkter Vergleich zeigt, dass die Co-Reinigung von Proteinen mit ClpP1*-ST spezifisch für dieses Protein ist und nicht ein Phänomen, das generell bei der Reinigung von Proteinen mit einem StrepTag-II aus einem Substratfallenstamm auftritt. Die Tatsache, dass OdhA ohne die anderen Untereinheiten des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase/Pyruvat-Dehydrogenase-Superkomplexes (SucA, LpdA, AceE) gereinigt wurde, beruht auf der Verwendung einer hohen Salzkonzentration und dem Fehlen von Glycerin in den zur Reinigung verwendeten Puffern.

5.1.3 Identifizierung der mit ClpP1 bzw. ClpP2 co-gereinigten Proteine

Die Analyse von gereinigtem ClpP1*-ST und ClpP2*-ST bzw. ClpP1-ST und ClpP2-ST durch 2D-Gelelektrophorese zeigte, dass zahlreiche Proteine unterschiedlicher Größe, isoelektrischem Punkt und Abundanz co-gereinigt wurden. Aufgrund von Limitierungen bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten nicht alle auf dem 2D-Gel sichtbaren Spots identifiziert werden, sondern nur solche, die eine bestimmte Mindestintensität erreichten. Insgesamt wurde die Identität von 61 Proteinen bestimmt, die in Tabelle 4.1 (ClpP1) und Tabelle 4.2 (ClpP2) aufgeführt sind. Bei einem Vergleich der Tabellen fällt auf, dass bestimmte Proteine nur jeweils einmal mit der entsprechenden proteolytischen

Untereinheit co-gereinigt wurden (z. B. die CTP-Synthase mit ClpP1 oder Dps mit ClpP2), andere Proteine dagegen wie der Elongationsfaktor Tu in jedem Reinigungsversuch mit ClpP1 und ClpP2 co-gereinigt und identifiziert werden. Insgesamt wurden 14 Proteine identifiziert, die in mindestens drei Reinigungen mit ClpP1*-ST oder ClpP1-ST und in mindestens zwei Reinigungen mit ClpP2*-ST oder ClpP2-ST co-gereinigt wurden (Cg0572, Cg0583, Cg0587, Cg0693, Cg0867, Cg1111, Cg1366, Cg1762, Cg2291, Cg2833, Cg2958, Cg2963, Cg3011, Cg3100; vgl. Tabellen 4.1 und 4.2). 22 Proteine wurden entweder mit ClpP1 (mindestens drei von sechs Reinigungen; vgl. Tabelle 4.1) oder mit ClpP2 (mindestens zwei von vier Reinigungen; vgl. Tabelle 4.2) co-gereinigt. Eine häufige Identifizierung eines Proteins unterstützt die Annahme, dass es sich dabei um ein ClpC-Substrat handelt. Die zahlreichen unidentifizierten Proteine aus den Versuchen der Co-Reinigung mit ClpP1 oder ClpP2 zeigen deutlich, dass bisher vermutlich weniger als die Hälfte der Proteine identifiziert wurden. Somit konnte nur ein Teil der potentiellen Substrate von ClpCP hinsichtlich ihrer ClpC-Erkennungssequenz untersucht werden.

Unter den identifizierten Proteinen, die mit ClpP co-gereinigt wurden, befand sich keines der beiden bereits bekannten ClpC-Substrate, ClgR und GlnK. Beide Proteine werden unter Nicht-Stressbedingungen, bei denen die Co-Reinigung durchgeführt wurde, nur schwach gebildet, weshalb die Konzentration dieser Proteine zu gering war, um sie mit MALDI-ToF-Massenspektrometrie zu identifizieren (Strösser et al., 2004; Engels, 2004).

5.2 Ableitung und Überprüfung potentieller Erkennungsmotive von ClpC

Da eine Co-Reinigung mit ClpP auf einer vorangegangenen Interaktion mit ClpC beruhen sollte, müssen die co-gereinigten Proteine in ihrer Primärsequenz ein oder mehrere ClpC-Erkennungsmotiv(e) tragen. Basierend auf einem Vergleich der Termini wurden 10 N-terminale und 10 C-terminale putative Erkennungssequenzen abgeleitet (Tabelle 4.4). Um zu testen, ob ClpC diese postulierten Erkennungssequenzen *in vivo* erkennt, wurde ein Degradationstest mit Fusionsproteinen aus den N-terminalen Motiven und dem PhoR-Protein durchgeführt (Abbildung 4.21). Die Fusionsproteine von PhoR mit den Motiven N2, N3, N5, N6, N7, N8, N9 und N10 (Tabelle 4.5) zeigten in Anwesenheit von ClpC eine 1,5- bis 3-fach reduzierte Halbwertszeit im Vergleich zu nativem PhoR, nicht jedoch in Abwesenheit von ClpC. Dies unterstützt die Annahme, dass diese Motive von ClpC erkannt werden und zu einem ClpCP-katalysierten Abbau führen. Da die Stämme mit ClpC ohne Glukose kultiviert wurden und die Stämme ohne ClpC mit Glukose,

besteht jedoch theoretisch noch die Möglichkeit, dass die Unterschiede in den Halbwertszeiten zwischen den Stämmen durch die Ab- bzw. Anwesenheit von Glukose verursacht werden. Auch wenn das nicht als wahrscheinlich angesehen werden kann, sollten die Halbwertszeiten der Fusionsproteine in den Stämmen mit ClpC ebenfalls nach Kultivierung mit Glukose bestimmt werden.

Basierend auf den Ergebnissen der Degradationsversuche mit den PhoR-Fusionsproteinen kann für die Proteine Malatsynthase (N2), ClgR (N3), GlnK (N5), Cysteinsynthase (N6), Citratsynthase (N7), ATP-Synthase γ -Untereinheit (N8), 6-Phosphofruktokinase (N9) und Myoinositol-1-phosphat-Synthase (N10) eine ClpCP-abhängige Degradation postuliert werden. Für ClgR und GlnK konnte eine Stabilisierung in Abwesenheit der ClpCP-Protease bereits experimentell gezeigt werden (Strösser et al., 2004; Engels, 2004), für die anderen Proteine jedoch noch nicht. Insgesamt zeichnen sich die Motive durch einen hohen Anteil an Aminosäuren mit polaren oder aliphatischen Seitenketten aus. Auch Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette könnten für eine Erkennung durch ClpC wichtig sein (Motiv N3). Die Identifizierung von Aminosäuren innerhalb dieser Motive, die essentiell für die Erkennung durch ClpC und den Abbau durch ClpCP sind, sollten zukünftig untersucht werden (siehe 5.6). Weiterhin sollten die N-Termini der übrigen Proteine sowie die C-Termini mit Hilfe des hier vorgestellten *in vivo* Degradationstestes auf einen Abbau durch die ClpCP-Protease hin überprüft werden.

5.3 ClpCP-abhängige Degradation der putativen Substrate

Proteine, die vermehrt in den Experimenten identifiziert werden konnten, sollten bevorzugt von ClpC erkannt werden. In den Termini dieser Proteine sollten Sequenzmotive zu finden sein, die einen besonders starken Einfluss auf die Stabilität der Fusionsproteine haben. Dies konnte für acht Proteine bereits gezeigt werden. Da es sich bei den getesteten Proteinen um Vertreter einer bestimmten Motivgruppe handelt, könnte man ebenfalls eine ClpCP-abhängige Degradation für alle Mitglieder dieser Gruppe postulieren (siehe Tabelle 4.4). Die co-gereinigten Proteine konnten in funktionelle Klassen unterteilt werden. Innerhalb dieser Klassen konnte beobachtet werden, dass verstärkt Motive einer Gruppe aufgetreten waren. Während bei der Klasse Translation verstärkt das Motiv N8 (MA-[P]) zu erkennen ist, tritt bei Proteinen des Aminosäurestoffwechsels vor allem das Motiv N6 ([A]₄-[X]₂-G) auf (Tabelle 5.1). Hier könnte die Verbindung von Funktion und ClpC-Erkennungsmotiv auf eine einheitliche Regulation hindeuten.

Tabelle 5.1 Übersicht über die in dieser Arbeit identifizierten putativen Substrate der *C. glutamicum* ClpCP-Protease sowie ihre möglichen ClpC-Erkennungsmotive (unterstrichen). Mit N- bzw. C- sind die N- bzw. C-terminalen Enden der Proteine abgekürzt.

Daten-bank	Funktion	N-terminal	Motive C-terminal	Protease(n)
Transkription/DNA-Bindung				
Cg0655	DNA-abhängige RNA-Polymerase, α -UE		C6: <u>AEDSE</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg2141	RecA		C6: <u>AED</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3327	Dps („DNA protection during starvation“)	N3: N- <u>MANY</u> N8: N- <u>MAN</u>	C7: <u>GNIQE</u> -C C8: <u>RAHIVDVGNIQE</u> -C C9: <u>IVDVGNIQE</u> -C	ClpCP2
Translation				
Cg0572	Ribosomales Protein L10	N8: N- <u>MAN</u>	C2: <u>KKDA</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg0583	Elongationsfaktor EF-G	N8: N- <u>MAQ</u>	C7: <u>GTAS</u> -C C9: <u>AADVIAERNGTAS</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg0587	Elongationsfaktor EF-Tu	N8: N- <u>MAK</u>	C1: <u>KLIK</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg0610	Ribosomales Protein L5	N2: N- <u>MTEN</u> N3: N- <u>MTENY</u>	C5: <u>QQ</u> -C C6: <u>GEDGNRQQ</u> -C	ClpCP1
Cg0867	Ribosomen-assoziiertes Protein Y	N10: N- <u>MTT</u>	C7: <u>ISLSDA</u> -C C9: <u>LSDA</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg1017	Methionyl-tRNA-Synthetase	N2: N- <u>MTKN</u>	C5: <u>QN</u> -C	ClpCP1
Cg1420	Amidotransferase für Asp-tRNA und Glu-tRNA, β -UE		C2: <u>KKLA</u> -C C8: <u>RGKADPAQVNQKIA</u> <u>KKLA</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg2222	Ribosomales Protein S2		C6: <u>AEAPAAE</u> -C C9: <u>AAEAEAPAAE</u> -C	ClpCP1
Cg2499	Glycyl-tRNA-Synthetase	N8: N- <u>MAQ</u>	C6: <u>LDELQGYLAQRLIGC</u> -C	ClpCP1
Cg3308	Ribosomales Protein S6	N3: N- <u>MRQY</u>	C1: <u>RLDK</u> -C	ClpCP1
Chaperone, Maturasasen, Stressantwort				
Cg0693	GroEL1	N8: N- <u>MAK</u>	C1: <u>HHHH</u> -C C6: <u>AEAAADAHAGHHHH</u> -C C9: <u>AADAHAGHHHH</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg1762	SufC, FeS-Cluster-Maturase	N10: N- <u>MST</u>	C2: <u>IK</u> -C C9: <u>GAELADKLEADGYDQF</u> <u>IK</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg2963	ClpC	N7: N- <u>MFER</u>	C10: <u>TAPSKE</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3011	GroEL2	N8: N- <u>MAK</u>	C4: <u>F</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3079	ClpB	N2: N- <u>MSSFNPITKT</u> N3: N- <u>MSSF</u> N10: N- <u>MSS</u>	C9: <u>VADGGQKLDVSRV</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3100	DnaK	N6 N- <u>MGRAVGIDLG</u>	C2: <u>KK</u> -C C6: <u>GEDKK</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3255	UspA, generelles Stressprotein	N6 N- <u>MSTEDIVVAVDVG</u> N10 N- <u>MST</u>	C1: <u>KIKK</u> -C C2: <u>KK</u> -C	ClpCP1, ClpCP2

Fortsetzung Tabelle 5.1

Daten-bank	Funktion	N-terminal	Motive C-terminal	Protease(n)
Aminosäurestoffwechsel				
Cg1133	Serin-Hydroxymethyl-transferase	N5: N-MTDAHQ	C3: WTIV-C C6: LEDWTIV-C C10: TIV-C	ClpCP1
Cg1283	Shikimat-5-Dehydrogenase	N3: N-MVNY	C2: SK-C C3: FSK-C C6: AEEFSK-C	ClpCP2
Cg1338	Homoserinkinase	N6: N-MAIELNVG	C5: NOP-C C9: VLELEVAGPVKVEV NOP-C	ClpCP2
Cg1586	Argininosuccinat-Synthase	N6: N-MTNRIVLAYSG N10: N-MTN	C1: KRDRAGNN-C C5: NN-C	ClpCP1
Cg1698	ATP-Phosphoribosyl-Transferase	N6: N-MLKIAVPNKG	C1: RIARI-C C9: GAAILASEIRIARI-C	ClpCP2
Cg1783	Glycin/b-Amino-säure-Oxidase	N6: N-MKIAVIGLG	C5: MCPR-C	ClpCP1
Cg1784	Ornithincyclo-deaminase	N2: N-MTATYTTET N3: N-MTATY	C10: SPALA-C	ClpCP1
Cg1814	Carbamoylphosphat-Synthase, kleine Kette	N3: N-MSKDITTY	C2: KKGA-C	ClpCP2
Cg2833	Cysteinsynthase	N6: N-MIGAPPDMG	C6: YEDIRD-C	ClpCP1, ClpCP2
Energistoffwechsel				
Cg0387	Zn-abhängige Alko-holdehydrogenase	N6: N-MSTVVPGLVALSKG N10: N-MST	C9: VVEI-C	ClpCP2
Cg0949	Citratsynthase	N7: N-MFER	C1: REER-C C6: REER-C	ClpCP1
Cg1111	Enolase	N8: N-MAE	C3: FQG-C C9: LLDGAGVYAGRSAPFR FQG-C	ClpCP1, ClpCP2
Cg1145	Fumarase	N2: N-MTEQ	C1: RENKF-C C4: F-C	ClpCP1, ClpCP2
Cg1157	Fruktose-1,6-bisphosphatase		C3: YTTAT-C C7: TTAT-C	ClpCP2
Cg1365	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase, δ-UE	N5: N-MHAAS	C1: KLERLRASFA-C C8: RLRASFA-C C9: VIDGSTSGKLERLR ASFA-C	ClpCP1
Cg1366	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase, α-UE	N2: N-MLEETTES	C1: KVSKK-C C2: KK -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg1367	F ₀ F ₁ -ATP-Synthase, γ-UE	N8: N-MAT		ClpCP1
Cg1409	6-Phospho-fructokinase	N5: N-MEDMRIAT N9: N-MEDM	C10: CPGLNA-C	ClpCP1
Cg1737	Aconitase	N9: N-MELT	C2: SK -C C5: SSK-C	ClpCP2
Cg1789	Triosephosphat-Isomerase	N8: N-MAR	C10: SVA-C	ClpCP1
Cg2091	Polyphosphat-Glukokinase	N2: N-MTET N6: N-MTET GFGIDIGGSGIKG	C5: NOHLTP-C	ClpCP1, ClpCP2
Cg2192	Malat-Chinon-Oxidoreduktase	N2: N-MSDS	C1: KTLKLEEA-C C6: LEEA-C C9: LEEA-C	ClpCP1, ClpCP2
Cg2291	Pyruvatkinase	N5: N-MDRRTKIVC N6: N-MDRRTKIVCTLGP AVASADG	C1: RIAKL-C C6: GDDTRIACL-C C8: HVHLLGDDTRIACL-C	ClpCP1, ClpCP2

Fortsetzung Tabelle 5.1

Daten-bank	Funktion	N-terminal	Motive C-terminal	Protease(n)
Cg2342	„short chain“ Dehydrogenase	N5: N-MISLLNDPRT	C7: <u>GTPTP</u> -C	ClpCP2
Cg2466	Pyruvatdehydro- genase, E1-UE	N8: N-MAD	C6: <u>PEE</u> -C	ClpCP1
Cg2559	Malatsynthase	N2: N-MTEQ	C1: <u>REFKAKN</u> -C C8: <u>KAKN</u> -C	ClpCP2
Cg2692	Thioesterase		C2: <u>EK</u> -C	ClpCP2
Cg2708	putativer ABC-Typ Transporter, ATPase	N3: N-MATVTE N8: N-MAT	C3: <u>FSASTGRLP</u> -C C5: <u>STGRL</u> -C C9: <u>IVEGGQHNFSAST</u> GRLP-C	ClpCP1
Cg2902	putative Hydrolase		C9: <u>LIDA</u> -C	ClpCP2
Cg2958	putative Dehydrogenase	N5: N-MSKVAM N6: N-MSKVAM VTGGAQIG	C3: <u>YN</u> -C C9: <u>LVDGGMLYN</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3068	Fructose-1,6- bisphosphat-Aldolase		C2: <u>SK</u> -C C5: <u>SSK</u> -C	ClpCP1, ClpCP2
Cg3198	Glycerinkinase	N6: N-MRISKANAY VAAIDQG		ClpCP1, ClpCP2
Cg3323	Myoinositol-1- phosphat-Synthase	N6: N-MSTSTIRVAIAGVG N10: N-MST	C9: <u>IIEA</u> -C	ClpCP2
Cg3409	Phosphomethyl- pyrimidin-Kinase	N3: N-MVNY	C2: <u>NK</u> -C C6: <u>AEDNK</u> -C	ClpCP2
Purin- und Pyrimidinmetabolismus				
Cg1606	CTP-Synthase	N10: N-MTS	C8: <u>RVHP</u> -C	ClpCP1
Cg2166	putative Polyribonu- kleotidphosphorylase	N5: N-MSDVKY	C6: <u>VEED</u> -C C8: <u>RGKISLVPVVEED</u> -C C9: <u>IADIDN_RGKISLVPV</u> VEED-C	ClpCP1
Cg3155	Desoxycytidintri- phosphat-deaminase		C2: <u>NK</u> -C	ClpCP1
Zellzyklus				
Cg2366	FtsZ, Zellteilungsprotein	N6: N-MTSPNNYLAKIK VVGVGGG N10: N-MTS	C6: <u>GDDL DVPSFLQ</u> -C	ClpCP2
Cg2368	UDP-N-acetylmura- mat-Alanin Ligase	N10: N-MTI	C5: <u>NN</u> -C C9: <u>APEILDQLQNN</u> -C	ClpCP2
Unbekannte Funktion				
Cg0783	hypothetisches Protein	N8: N-MAE	C1: <u>RFSKF</u> -C C3: <u>FSKF</u> -C C4: <u>F</u> -C	ClpCP1
Cg3092	hypothetisches Protein		C6: <u>LEEMLIKRFSSK</u> -C C4: <u>F</u> -C	ClpCP1

Ein Großteil der mit ClpP co-gereinigten Proteine sind involviert in Translation, Aminosäurebiosynthese und Energiestoffwechsel. Diese Proteine werden gerade in der exponentiellen Wachstumsphase benötigt, in der die Zellen für die ClpP-Reinigung geerntet wurden; eine Degradation durch ClpCP erscheint daher nicht sinnvoll.

Dennoch könnten aus den Daten Rückschlüsse auf zwei generelle Funktionen der ClpCP-Protease aus *C. glutamicum* gezogen werden. Die ClpCP-Protease könnte als Qualitäts-Kontrollsystem der identifizierten Proteine fungieren. Neben der direkten identifizierten Substrate der ClpXP-Protease aus *E. coli* (Flynn et al., 2003) und den hier vorgestellten Daten zu möglichen Substraten der ClpCP-Protease aus *C. glutamicum*, wurden bereits Untersuchungen in anderen Organismen zur Stabilisierung von potentiellen Substraten von ClpP-Peptidasen durchgeführt. In *B. subtilis* wurden durch Kock et al. (2004) Proteine identifiziert, die in einer *clpP*-Deletionsmutante stabilisiert wurden. Als putative Substrate wurden metabolische Enzyme und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen identifiziert, die Deletion von *clpP* führte somit zu einer Akkumulation dieser Proteine. Einen Einfluss der *Staphylococcus aureus* ClpC-ATPase auf die Aconitase in der späten stationären Phase ist durch Chatterjee et al. (2004) beschrieben worden. Die Deletion von *clpC* führte zu einer reduzierten Transkription des Aconitase-kodierenden Gens *citB* und damit zu einer Reduktion der Aconitase-Aktivität. Die Autoren vermuten, dass ClpC als Chaperon die Aktivität der Aconitase wiederherstellt, irreparabel geschädigte Aconitase-Proteine könnten einer Degradation durch die ClpCP-Protease zugeführt werden. Die Aconitase aus *E. coli* wurde mit ClpP co-gereinigt und besitzt ein C-terminales Degradationssignal für ClpX (Flynn et al., 2003). Ein Abbau von Proteinen, die ein durch Oxidation beschädigtes Eisen-Schwefel-„Cluster“ besitzen, könnte durch Clp-Proteasen als Qualitäts-Kontrollsystem erfolgen.

Neben der Funktion als Qualitätskontrollsystem könnte ClpCP auch Proteine degradieren, die nur unter bestimmten Bedingungen in der Zelle benötigt werden (konditionale Degradation). Es wurden Proteine co-gereinigt, die einer solchen Regulation unterliegen könnten: RecA, UspA, FtsZ und Dps.

RecA ist als Co-Protease zusammen mit dem Repressor LexA durch dessen Autoproteolyse an der Regulation der SOS-Antwort nach DNA-Schädigung und an der Reparatur der DNA durch homologe Rekombination beteiligt (für eine Zusammenfassung siehe McGrew und Knight, 2003). Für RecA aus *B. subtilis* ist bekannt, dass es in einer *clpP*-Deletionsmutante stabilisiert wird, was auf eine Regulation von RecA durch ClpP hindeutet (Kock et al., 2004). In *E. coli* wird RecA dagegen von der ATP-abhängigen Protease Lon abgebaut (Neher et al., 2006). RecA wird vor allem bei DNA-Schädigung gebraucht und könnte in *C. glutamicum* während der exponentiellen Wachstumsphase durch ClpCP abgebaut werden. Eine Schädigung der DNA zum Beispiel durch ultraviolettes Licht könnte zur Stabilisierung von RecA führen.

Cg3255 ist als „universal stress protein A“ (UspA) annotiert. Die Superfamilie der universellen Stressproteine ist weit verbreitet und Vertreter dieser Familie sind in Pro- und Eukaryoten zu finden. Das *E. coli* UspA-Protein wird vermehrt unter verschiedensten

Stimuli synthetisiert und ist das am stärksten vertretene Protein in der stationären Phase. Eine Beteiligung von UspA an der Resistenz gegen DNA-schädigende Agentien wird diskutiert (für eine Zusammenfassung siehe Kvint et al., 2003). Unter Wachstumsbedingungen wird UspA nicht benötigt und seine Konzentration in *C. glutamicum* könnte durch ClpCP-katalysierte Proteolyse niedrig gehalten werden. Durch einen externen Stimulus, zum Beispiel Eintritt in die stationäre Phase oder DNA-Schädigung, würde UspA stabilisiert werden.

Ein Substrat der *E. coli* ClpXP-Protease, das mit ClpP aus *C. glutamicum* coreinigt wurde, ist FtsZ. FtsZ wird bei der Zellteilung benötigt und bildet ringförmige Strukturen entlang der Cytoplasmamembran. FtsZ veranlasst die Einschnürung der Membran bei der Zellteilung. Überexpression von FtsZ führt sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* zum Zelltod (Ramos et al., 2005). Die *C. glutamicum* ClpCP-Protease könnte durch Degradation nicht nur eine verstärkte Präsenz von FtsZ verhindern, sondern auch FtsZ nach Zellteilung komplett aus der Zelle entfernen.

Für Dps („DNA protection during starvation“) aus *E. coli* konnte ebenfalls eine ClpXP-abhängige Degradation gezeigt werden. Dps hat eine Funktion als Eisenspeicher und Schutzprotein der DNA in der stationären Phase (Stephani et al., 2003). Unter exponentiellen Wachstumsbedingungen wird Dps schnell durch ClpXP abgebaut. ClpX erkennt Dps über ein N-terminales Erkennungsmotiv. Dps wird unter C-Quellenmangel, oxidativem Stress und bei Eintritt in die stationäre Phase stabilisiert. Eine ähnliche Regulation könnte auch für Dps aus *C. glutamicum* zutreffen. Die *dps*-Expression wird in *C. glutamicum* durch DtxR, einem zum Diphtheria-Toxin-Regulator homologen Protein, unter Eisenüberschuss aktiviert und unter Eisenmangel durch einen weiteren, noch unbekannten Regulator reprimiert (Brune et al., 2006; Wennerhold und Bott, 2006). Neben drei putativen C-terminalen Erkennungssequenzen zeichnet sich der N-Terminus von Dps durch die Anwesenheit gleich zweier N-terminaler Erkennungsmotive aus, die *in vivo* einen Einfluss auf die Stabilität der entsprechenden Fusionsproteine hatten. Dps hat den N-Terminus NH₂-MANYTVPG~Dps. Sowohl für MAN (Motiv N8) als auch für MANY (Motiv N3) könnte demnach eine ClpCP-abhängige Degradation postuliert werden. Die Signale ähneln sich stark und unterscheiden sich nur in der zusätzlichen aromatischen Aminosäure im Motiv N3. Ob Dps unter Hunger-Bedingungen oder bei Übergang in die stationäre Phase stabilisiert wird, muss in Zukunft noch untersucht werden.

Aus diesen Beispielen lässt sich postulieren, dass die *C. glutamicum* ClpCP-Protease zwei Funktionen ausübt. Zum Einen ist sie als Qualitäts-Kontrollsystem verantwortlich für den Abbau von nicht-funktionellen Proteinen, zum Anderen für die Degradation von Proteinen, die unter Nicht-Stressbedingungen nicht benötigt werden, dagegen schnell bei verschiedenen Stressbedingungen zur Verfügung stehen müssen.

5.4 ClgR – ein konditionales Substrat der ClpCP-Protease

Mit ClgR und PopR sind zwei Transkriptionsregulatoren von *clp*-Genen aus Actinomyceten bekannt. Beide Regulatoren werden auf posttranslationeller Ebene durch Degradation von Clp-Proteasen reguliert und sind selbst Transkriptionsaktivatoren der entsprechenden Strukturgene der Proteasen. Für PopR aus *S. lividans* ist bekannt, dass die beiden C-terminalen Alanine, ähnlich dem *ssrA*-„Tag“ der tmRNA, essentiell für die Erkennung und den Abbau sind. Ein Austausch gegen zwei Aspartate bewirkt eine drastische Stabilisierung von PopR. Die ClpP-Peptidasen ClpP1 und ClpP2, aber auch ClpP3 und ClpP4 sind verantwortlich für die Degradation. Dagegen ist noch unklar, durch welche Clp-ATPase PopR erkannt wird. Wie für andere Proteine mit C-terminalem Ala-Ala-Motiv und durch Polypeptidketten mit *ssrA*-„Tag“ bekannt, werden diese vor allem durch ClpX erkannt und durch ClpXP abgebaut. Eine Deletion des *clpX*-Gens in *S. lividans* führte aber nicht zu einer Stabilisierung von PopR, was darauf hindeutet, dass eine der anderen Clp-ATPasen (zum Beispiel ClpC) für die PopR-Degradation verantwortlich ist (Viala et al., 2000; Viala und Mazodier, 2002). Ebenso wie PopR zeigt auch ClgR aus *S. lividans* ein C-terminales Ala-Ala-Motiv. Auch hier führte ein Austausch dieses Motivs gegen zwei Aspartat-Reste zu einer Stabilisierung von ClgR. Für die Degradation waren ClpP1 und ClpP2 verantwortlich, deren Gene ebenfalls durch ClgR reguliert werden. Auch ein Einfluss von ClpC1 wird diskutiert (Bellier and Mazodier, 2004; Bellier et al., 2006). ClgR aus *C. glutamicum* wird durch die ClpCP-Protease auf posttranslatiionaler Ebene reguliert. In Abwesenheit von ClpC bzw. ClpP1 und ClpP2 wird ClgR stabilisiert (Engels et al., 2004 und 2005). Im Gegensatz zu ClgR aus *S. lividans* besitzt ClgR aus *C. glutamicum* am C-Terminus nicht das Ala-Ala-Motiv, sondern endet mit Arg-Val. Es war also unbekannt, wie ClpC ClgR erkennt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch Fusion der elf N-terminalen Aminosäuren von ClgR an PhoR (N3-PhoR) gezeigt werden, dass in Anwesenheit von ClpC die Halbwertszeit von ca. 16 min für natives PhoR auf ca. 7 min für N3-PhoR halbiert wurde. Bei Abwesenheit von ClpC war N3-PhoR (ca. 18 min) sogar etwas stabiler als PhoR (16 min; Abbildung 4.21 und Tabelle 4.5). ClpC erkennt somit das fusionierte Sequenzmotiv und führt N3-PhoR der Degradation durch ClpCP zu. Dass N3-PhoR in Anwesenheit von ClpC nachweisbar war, ClgR dagegen nicht, deutet auf weitere ClpC-Erkennungsmotive in ClgR hin. Welche Aminosäuren des fusionierten Sequenzmotivs für die Erkennung von ClgR durch ClpC essentiell sind, ist derzeit noch unklar. Durch Mutation des fusionierten Sequenzmotivs könnten die Aminosäuren identifiziert werden, die wichtig für die Erkennung durch ClpC sind. Ein mutiertes Motiv in N3-PhoR sollte nicht oder nur noch schlecht durch ClpC erkannt werden und daher zu einer Stabilisierung des Proteins in

Anwesenheit von ClpC führen. Die N-terminale Sequenzierung von ClgR zeigte, dass bei Überproduktion ClgR in drei Formen vorliegt. Dabei konnte ein ClgR-Derivat bestimmt werden, bei dem die ersten vier Aminosäuren (MVTY) fehlen. Diese Aminosäuren decken sich mit dem Motiv N3. Ein Fehlen dieser Aminosäuren könnte zu einer Stabilisierung von ClgR führen, was durch Reinigung eines ClgR-Derivats, bei dem die ersten vier Aminosäuren fehlen, in einer $\Delta clpC$ -Mutante getestet werden könnte. Leider führt diese Prozessierung nicht zu der von Engels (2004) beobachteten Erniedrigung des isoelektrischen Punktes von ClgR. Eine weitere Modifikation z. B. durch Phosphorylierung wäre denkbar. Es ist aber dennoch möglich, dass ClgR sich vor dem Abbau durch ClpCP schützt, indem durch Prozessierung die ClpC-Erkennungssequenz abgespalten wird. Dies setzt allerdings die Existenz einer entsprechenden Endopeptidase voraus. Andererseits könnte sich ClgR auch durch Maskierung des ClpC-Erkennungssignals vor Proteolyse schützen. Ähnlich wie in *C. glutamicum* aktiviert ClgR aus *Bifidobacterium breve* die Transkription der Gene von ClpC und ClpP1 bzw. ClpP2. *In vitro* DNA-Bindungsstudien zeigten, dass ClgR nur an die Promotoren der Gene bindet, wenn ein Zelllysats aus hitzestressierten Zellen zugefügt wurde (für eine Zusammenfassung siehe Ventura et al., 2006). Die Autoren vermuten einen Einfluss eines 56 kDa Proteins, welches mit ClgR co-gereinigt werden konnte, wenn Zelllysats aus hitzestressierten Zellen auf eine Affinitätschromatographie-Säule gegeben wurde, dass bereits ClgR gebunden hatte. Evtl. könnte es sich bei dem Protein um GroEL handeln (Ventura et al., 2005b). Reinigungsversuche von *C. glutamicum* ClgR aus *E. coli* zeigten, dass DnaK mit ClgR co-gereinigt wurde. Dies war aber bei Reinigung von ClgR aus *C. glutamicum* nicht zu beobachten (Engels, 2004). DnaK könnte daher einen Einfluss auf die ClgR-Stabilität in *C. glutamicum* haben, da es *in vivo* an ClgR binden und die ClpC-Erkennungssequenz maskieren könnte. Es ist aber immer noch unverstanden, unter welchen Bedingungen ClgR stabilisiert wird und dann die Transkription seiner Zielgene aktiviert. Als Stimuli können mehrere Faktoren wirken. Hitzestress bei 50 °C führte zwar zu einer erhöhten mRNA-Konzentration der Gene *clpC* und *clpP1P2* sowie von *clgR*, doch erfolgte dies nicht über eine Stabilisierung von ClgR, sondern durch Aktivierung über Sigmafaktoren (Engels et al., 2004, Schweitzer, 2004). Auch andere Stressoren wie DNA-Schädigung durch Mitomycin oder UV-Licht führten nicht zu einer ClgR-abhängigen Transkriptionsaktivierung der Gene des ClgR-Regulons.

5.5 Potentielle Substrate der *C. glutamicum* ClpXP-Protease

Der Abbau von Polypeptidketten mit *ssrA*-„Tag“ durch Clp-Proteasen ist ein gut untersuchtes Beispiel ATP-abhängiger Proteolyse. Untersuchungen in *E. coli* zur Funktionsweise dieses Degradationssignals AANDENYALAA zeigten, dass ClpA und ClpX unterschiedliche Bereiche des Signals erkennen. ClpX erkennt die letzten drei Aminosäuren LAA, wobei die beiden Alanine besonders wichtig für die Erkennung durch ClpX sind. ClpA erkennt dagegen die ersten beiden Alanine und das Motiv ALA (Flynn et al., 2001). Die Affinität der Clp-ATPasen zu den Sequenzmotiven wird zusätzlich noch durch Adaptormoleküle beeinflusst. Während SspB die Affinität von ClpX zu Peptiden mit C-terminalem *ssrA*-„Tag“ erhöht und somit den Abbau dieser Proteine fördert, hat ClpS bei ClpA eine entgegengesetzte Wirkung. ClpS verhindert die Interaktion von ClpA mit dem *ssrA*-„Tag“ (siehe 2.4; Dougan et al., 2002a; Flynn et al., 2004). ClpX und ClpA aus *E. coli* haben somit einen bedeutenden Einfluss auf die Degradation *ssrA*-markierter Proteine. Da der *ssrA*-„Tag“ aus *C. glutamicum* ebenfalls ein C-terminales Ala-Ala-Motiv aufweist (AAEKSQRDYALAA), könnte die Entfernung *ssrA*-markierter Proteine durch die ClpXP-Protease erfolgen. Eine bioinformatische Analyse erbrachte 35 potentielle Substrate von ClpXP, die alle ein C-terminales Ala-Ala-Motiv aufweisen (Tabelle 4.6). Wie in anderen Eubakterien könnten auch in *C. glutamicum* analog zum *ssrA*-„Tag“ zwei C-terminale Alanine kritisch für das Erkennen durch ClpX und die Degradation durch ClpXP sein. Neben einer Reihe von hypothetischen Proteinen mit unbekannter Funktion und zwei ribosomalen Proteinen gibt es zwei Proteine Cg0061 und Cg0362, die an der Zellteilung beteiligt sind. Wie bereits für CtsR aus *B. subtilis* unter 2.3 beschrieben, ist ein Einfluss von Clp-Proteasen auf den Zellzyklus gegeben und kann somit auch für *C. glutamicum* postuliert werden. Weiterhin besitzen die drei putativen Transkriptionsregulatoren Cg1287, Cg2712 und Cg3230 zwei C-terminale Alanine. Eine ClpX-abhängige Degradation wird auch für die Transkriptionsregulatoren Fnr und IscR mit C-terminalem Ala-Ala-Motiv aus *E. coli* angenommen (Flynn et al., 2003). Eine konditionale Degradation von Transkriptionsregulatoren ähnlich zu ClgR könnte auch für Cg1287, Cg2712 und Cg3230 angenommen werden, da es der Zelle erlaubt, die Expression der Zielgene dieser Transkriptionsregulatoren durch die Stabilität der Regulatoren zu kontrollieren.

Neben Sequenzmotiven, die direkt an den Termini der Substrate lokalisiert sind, gibt es Hinweise darauf, dass Erkennungssequenzen auch im Innern des Substrats lokalisiert sein können (Hoskins et al., 2002b). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Degradation des σ^E -Antisigmafaktors RseA durch eine proteolytische Kaskade. RseA besitzt eine transmembrane Helix und neben einer periplasmatischen auch eine

cytosolische Domäne, die σ^E bindet. Durch einen fehlerhaften Transport von sekretierten Proteinen, die sich im Periplasma der Zelle anreichern, wird DegS, eine membranständige Protease mit periplasmatischer katalytischer Domäne, aktiviert. DegS spaltet RseA nahe der Zellmembran, was zu einer zweiten Spaltung durch RseP, einer RIP-Protease („regulated intramembrane proteolysis“) führt. Es folgt die Freisetzung des RseA¹⁻¹⁰⁸- σ^E -Komplexes in das Cytosol. Durch die zweite proteolytische Spaltung kommt es zur Exposition von zwei C-terminalen Alaninen. Dieses Ala-Ala-Motiv markiert RseA zum Abbau durch ClpXP und Lon; es kommt zur Freisetzung von σ^E , das dann die Transkription der Zielgene aktivieren kann (Chaba et al., 2007; Hasenbein et al., 2007). Ein ähnliches Beispiel aus *B. subtilis* (σ^W und der σ^W -Antisigmafaktor RsiW) wurde bereits in der Einleitung erwähnt. Das ClpX-abhängige Degradationssignal ist also im Innern der Primärsequenz von RseA lokalisiert und wird erst durch ortsspezifische Proteolyse demaskiert. Neben den oben bereits diskutierten potentiellen Substraten der ClpXP-Protease könnte ein solcher Abbau eines Antisigmafaktors auch in *C. glutamicum* existieren. Es gibt in *C. glutamicum* sieben Gene, die für Sigmafaktoren kodieren (für eine Zusammenfassung siehe Schweitzer, 2004). Für σ^E -RseA aus *E. coli* und σ^W -RsiW aus *B. subtilis* ist charakteristisch, dass sie in einem Operon kodiert sind. Die Gene von Cg0696 (σ^M) und Cg0697 (putativer σ^M -Antisigmafaktor) sind vermutlich ebenfalls in einem Operon organisiert. Durch Analyse der Primärsequenz von Cg0697 mit ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) konnte eine Transmembran-Helix von 23 Aminosäuren identifiziert werden (159-181). Auch darin findet man ein Sequenzmotiv von vier Alaninen. Somit könnte eine zu RseA aus *E. coli* oder RsiW aus *B. subtilis* ähnliche Degradationskaskade des putativen σ^M -Antisigmafaktors postuliert werden, wobei ClpXP z. B. das Fragment Cg0697¹⁻¹⁶⁹ an den C-terminalen Alaninen erkennt, den σ^M -Antisigmafaktor abbaut und σ^M freisetzt. Auch wenn die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese noch aussteht, könnten hier erste Substrate der ClpXP-Protease aus *C. glutamicum* vorgestellt worden sein.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Co-Reinigung von putativen ClpCP-Substraten mit inaktiven Derivaten der proteolytischen Untereinheiten ClpP1 oder ClpP2 aus *C. glutamicum* möglich ist. Weiterhin konnten aus den co-gereinigten Proteinen N-terminale Sequenzmotive abgeleitet und deren Einfluss auf die Degradation eines Modellproteins *in vivo* untersucht werden. Die spezifische Co-Reinigung mit ClpP1 bzw. ClpP2 sowie der Einfluss der abgeleiteten Motive auf die Halbwertszeit des

Modellproteins sind erste Hinweise dafür, dass es sich bei den identifizierten Proteinen tatsächlich um Substrate der ClpCP-Protease handelt. Weitere Untersuchungen könnten diese These untermauern. Dazu könnte ein *in vitro*-Degradationstest mit rekonstituierter ClpCP-Protease und gereinigten putativen Substratproteinen etabliert werden. Das Co-Reinigungssystem kann auch verwendet werden, um das Substratspektrum der ClpXP-Protease aufzuklären; ebenso könnte dies für die ClpEP-Protease durchgeführt werden.

Die hier gezeigte Reinigung von ClpP1-NStrep kann als Kontrolle der Co-Reinigung angesehen werden, wenn belegt werden kann, dass dieses Derivat zur Bildung einer aktiven ClpCP-Protease führt. Ebenso muss dies für ClpP2 wiederholt werden (ClpP2-NStrep). Eine Aktivität der Derivate könnte in dem oben beschriebenen *in vitro*-Ansatz gezeigt werden. Die Bestimmung der Sequenzmotive ergab einen ersten Hinweis darauf, welche Aminosäuren bevorzugt von ClpC erkannt werden. Um dies genauer zu untersuchen, sind weitere Experimente nötig. Auch hierzu könnten Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* nützlich sein. Ein gerichteter Austausch der Aminosäuren in den PhoR-Fusionsproteinen könnte zu einem Nichterkennen durch ClpC und damit zu einer Stabilisierung und einer Erhöhung der Halbwertszeit auch in Anwesenheit von ClpC führen. Eine weitere Möglichkeit der Bestätigung der hier bestimmten Sequenzmotive ist die Bindung von ClpC an synthetisierte Polypeptide, die auf einer Membran immobilisiert werden. Durch ClpC-spezifische Antikörper können so Peptide identifiziert werden, an die ClpC besonders gut bindet.

Ein weiterer wichtiger Punkt, ist die mögliche Präsenz von Modulatoren der Substratspezifität der Clp-Proteasen aus *C. glutamicum*. Für *E. coli* und *B. subtilis* sind einige dieser Substratadaptoren bereits bekannt und zum Teil gut untersucht (siehe 2.4). Auch für *C. glutamicum* kann die Existenz solcher Adaptoren nicht ausgeschlossen werden. Die Affinität von *ssrA*-markierten Polypeptidketten an Clp-Proteasen wird in *E. coli* durch die beiden Adaptoren SspB und ClpS beeinflusst. Da das Genom von *C. glutamicum* ein *clpA*-Gen aufweist, dessen Genprodukt wahrscheinlich nicht mit ClpP1 oder ClpP2 interagieren könnte, ist eine Existenz von ClpS eher unwahrscheinlich. Sollte ClpC ähnlich zu ClpA den *ssrA*-„Tag“ erkennen, wäre die Existenz eines funktionellen ClpS-homologen Proteins durchaus denkbar. Das Gen *cg2772* wird zwar als *clpS* annotiert, das Genprodukt zeigt jedoch nur eine Sequenzidentität von ca. 15 % zu ClpS aus *E. coli*. SspB erhöht die Affinität von ClpX zum *ssrA*-„Tag“ in *E. coli*, jedoch gibt es kein SspB-homologes Protein in *C. glutamicum*. Ebenso gibt es in *C. glutamicum* keine Homologen der beiden bekannten Modulatoren der ClpCP-Protease aus *B. subtilis*, MecA und McsB. Zukünftige Untersuchungen bezüglich Modulatoren von Clp-Proteasen auch in Actinomyceten werden dazu beitragen, die konditionale Proteolyse durch Clp besser zu verstehen.

6 Literatur

- Abe, S., Takayama, K. and Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* **13**: 279-301.
- Ades, S. E. (2006) AAA+ molecular machines: Firing on all cylinders. *Curr Biol* **16**: R46-R48.
- Ansaldi, M. and Dubnau, D. (2004) Diversifying selection at the *Bacillus* quorum-sensing locus and determinants of modification specificity during synthesis of the ComX pheromone. *J Bacteriol* **186**:15-21.
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**:179-186.
- Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2006) ATP-dependent proteases of bacteria: Recognition logic and operating principles. *Trends Biochem Sci* **31**: 647-653.
- Becker, G., Klauck, E. and Hengge-Aronis, R. (1999) Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6439-6444.
- Bellier, A. and Mazodier, P. (2004) ClgR, a novel regulator of *clp* and *lon* expression in *Streptomyces*. *J Bacteriol* **186**: 3238-2348.
- Bellier, A., Gominet, M. and Mazodier, P. (2006) Post-translational control of the *Streptomyces lividans* ClgR regulon by ClpP. *Microbiology* **152**: 1021-1027.
- Beuron, F., Maurizi, M. R., Belnap, D. M., Kocsis, E., Booy, F. P., Kessel, M. and Steven, A. C. (1998) At sixes and sevens: Characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J Struct Biol* **123**: 248-259.
- Bewley, M. C., Graziano, V., Griffin, K. and Flanagan, J. M. (2005) The asymmetry in the mature amino-terminus of ClpP facilitates a local symmetry match in ClpAP and ClpXP complexes. *J Struct Biol* **103**: 2063-2068
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R. (1999) The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 295-317.
- Bolon, D. N., Grant, R. A., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2004) Nucleotide dependent substrate handoff from the SspB adaptor to the AAA+ ClpXP protease. *Mol Cell* **16**: 343-350.
- Bougdour, A., Wickner, S. and Gottesman, S. (2006) Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of σ^S stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **20**: 884-897.

- Braud, S., Lavire, C., Bellier, A. and Mazodier, P. (2005) Effect of SsrA (tmRNA) tagging system on translational regulation in *Streptomyces*. *Arch Microbiol* **184**: 343-352.
- Brötz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H. P., Endermann, R., Ladel, C., Hinzen, B., Raddatz, S., Paulsen, H., Henninger, K., Bandow, J. E., Sahl, H. G. and Labischinski, H. (2005) Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med* **10**:1082-1087.
- Brune, I., Werner, H., Huser, A. T., Kalinowski, J., Pühler, A. and Tauch, A. (2006) The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **7**:21.
- Burton, R. E., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2003) Energy-dependent degradation: Linkage between ClpX-catalyzed nucleotide hydrolysis and protein-substrate processing. *Protein Sci* **12**: 893-902.
- Burton, B. M. and Baker, T. A. (2005) Remodeling protein complexes: Insights from the AAA+ unfoldase ClpX and Mu transposase. *Protein Sci* **14**: 1945-1954.
- Burton, R. E., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2005) Nucleotide-dependent substrate recognition by the AAA+ HslUV protease. *Nat Struct Biol* **12**: 245-251.
- Chaba, R., Grigorova, I. L., Flynn, J. M., Baker, T. A. and Gross, C. A. (2007) Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered and rapid signal transduction. *Genes Dev* **21**: 124-36.
- Chandu, D. and Nandi, D. (2004) Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Res Microbiol* **155**: 710-719.
- Chatterjee, I., Becker, P., Grundmeier, M., Bischoff, M., Somerville, G. A., Peters, G., Sinha, B., Harraghy, N., Proctor, R. A. and Herrmann, M. (2004) *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery and death. *J Bacteriol* **187**: 4488-4496.
- Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G. 3rd, Daniels, D. L. and Blattner, F. R. (1993) Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hsITS/ibpAB* and *hslUV* operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**: 1-6.
- Chung, C. H., Seol, J. H. and Kang, M. S. (1996) Protease Ti (Clp), a multi-component ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *Biol Chem* **377**:549-554.
- Chung, C. H., Yoo, S. J., Seol, J. H. and Kang, M. S. (1997) Characterization of energy-dependent proteases in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **241**: 613-616.

- 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.
- Derré, I., Rapoport, G. and Msadek, T. (1999a) CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **31**: 117-131.
- Derré, I., Rapoport, G., Devine, K., Rose, M. and Msadek, T. (1999b) ClpE, a novel type of Hsp100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **32**: 581-593.
- Dougan, D., Reid, B. G., Horwich, A. L. and Bukau, B. (2002a) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol Cell* **9**: 673-683.
- Dougan, D., Mogk, A., Zeth, K., Turgay, K. and Bukau, B. (2002b) AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett* **529**: 6-10.
- Dulebohn, D. P., Cho, H. J. and Karzai, A. W. (2006) Role of conserved amino acids in binding of SmpB protein to *ssrA* RNA. *J Biol Chem* **281**: 28536-28545.
- Eggeling, L. and Bott, M. (ed) (2005) Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press Inc., Boca Raton, USA.
- Ehrmann, M. and Clausen, T. (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* **38**: 709-724.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. und Sahm, H. (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Engels, S. (2004) Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- 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.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A. Zahn, R., Dougan, D. and Bukau, B. (2006) ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature* **439**: 753-756.
- Farrell, C. M., Grossman, A. D. and Sauer, R. T. (2005) Cytoplasmic degradation of *ssrA*-tagged proteins. *Mol Microbiol* **57**: 1750-1761.

- Farrell, C. M., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2007) Altered specificity of a AAA+ protease. *Mol Cell* **25**: 161-166.
- Flynn, J. M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S. H., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2001) Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10584-10589.
- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y.-I., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* **11**: 671-683.
- Flynn, J. M., Levchenko, I., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2004) Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev* **18**: 2292-2301.
- 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.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sørensen, K. Hill, P., Msadek, T. and Ingmer, H. (2004) Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **54**: 1445-1462.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P. and Ingmer, H. (2007) Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **63**: 1285-1295.
- Gerth, U., Kirstein, J., Mostertz, J., Waldminghaus, T., Miethke, M., Kock, H. and Hecker, M. (2004) Fine-tuning in regulation of Clp protein content in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 179-191.
- Gottesman, S., Clark, W. P., de Crecy-Lagard, V. and Maurizi, M. R. (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-depent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 22618-22626.
- Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**: 465-506.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. and Sauer, R. T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* **12**: 1338-1347.
- Gottesman, S. (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 565-587.
- Gribun, A., Kimber, M. S., Ching, R., Sprangers, R., Fiebig, K. M. and Houry, W. A. (2005) The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. *J Biol Chem* **280**: 16185-16196.

- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Stevens, A. C. and Maurizi, M. R. (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* **273**: 112476-12481.
- Guo, F., Maurizi, M. R., Esser, L. and Xia, D. (2002) Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J Biol Chem* **277**:46743-46752.
- Haebel, P. W., Gutmann, S. and Ban, N. (2004) Dial tm for rescue: tmRNA engages ribosomes stalled on defective mRNAs. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 58-65.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA-cloning*. Vol 1. Glover, D. M. (ed). Oxford/Washington DC: IRL-Press, 109-135.
- Hanaw-Suetsugu, K., Takagi, M., Inokuchi, H., Himeno, H. and Muto, A. (2002) SmpB functions in various steps of *trans*-translation. *Nucleic Acids Res* **30**: 1620-1629.
- Hasenbein, S., Merdanovis, M. and Ehrmann, M. (2007) Determinants of regulated proteolysis in signal transduction. *Genes Dev* **21**: 6-10.
- Heinrich, J. and Wiegert, T. (2006) YpdC determines site-1 degradation in regulated intramembrane proteolysis of the RsiW anti-sigma factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **62**: 566-579.
- Herman, C., Thévenet, D., Bouluc, P., Walker, G. C. and D'Ari, R. (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev* **12**:1348-1355.
- Hersch, G. L., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2004) SspB delivery of substrates for ClpXP proteolysis probed by the design of improved degradation tags. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12136-41.
- Hersch, G. L., Burton, R. E., Bolon, D. N., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2005) Asymmetric interactions of ATP with the AAA+ ClpX₆ unfoldase: Allosteric control of a protein machine. *Cell* **121**: 1017-1027.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W. A., Furtak, K. J., Farr, G. W. and Horwich, A. L. (2005a) Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding and translocation. *Cell* **121**: 1029-1041.
- Hinnerwisch, J., Reid, B. G., Fenton, W. A. and Horwich, A. L. (2005b) Roles of the N-domains of the ClpA unfoldase in binding substrate proteins and in stable complex formation with the ClpP protease. *J Biol Chem* **280**: 40838-40844.
- Hoskins, J. R., Kim, S. Y. and Wickner, S. (2000) Substrate recognition by the ClpA chaperone component of ClpAP protease. *J Biol Chem* **275**: 35361-35367.
- Hoskins, J. R., Singh, S. K., Maurizi, M. R. and Wickner, S. (2000) Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8892-8897.

- Hoskins, J. R., Sharma, S., Sathyanarayana, B. K. and Wickner, S. (2002a) Clp ATPases and their role in protein unfolding and degradation. *Adva Protein Chem* **59**: 413-429.
- Hoskins, J. R., Yanagihara, K., Mizuuchi, K. and Wickner, S. (2002b) ClpAP and ClpXP degrade proteins with tags located in the interior of the primary sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11037-11042.
- Hoskins, J. R. and Wickner, S. (2006) Two peptide sequences can function cooperatively to facilitate binding and unfolding by ClpA and degradation by ClpAP. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 909-914.
- Hwang, B. J., Park, W. J., Chung, C. H. and Goldberg, A. L. (1987) *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8892-8897.
- Ikeda, M. and Nakagawa S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 99-109.
- Ingmer, H., Vogensen, F. K., Hammer, K. and Kilstup, M. (1999) Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC* and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **181**: 2075-2083.
- Ingvarsson, H., Mate, M. J., Hogbom, M., Benaroudj, N., Alzari, P. M., Ortiz-Lombardia, M. and Unge, T. (2007) Insights into the inter-ring plasticity of caseinolytic proteases from X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**: 249-259.
- Ishikawa, T., Beuron, F., Kessel, M., Wickner, S., Maurizi, M. R. and Steven, A. C. (2001) Translocation pathway of protein substrates in ClpAP protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4328-4333.
- Ishikawa, T., Steven, A. C. and Maurizi, M. R. (2004) The N-terminal substrate-binding domain of ClpA infoldase is highly mobile and extends axially from the distal surface of ClpAP protease. *J Struct Biol* **146**: 180-188.
- Ito, K. and Akiyama, Y. (2006) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol* **59**: 211-231.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G. und 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.
- Jenal, U. and Hengge-Aronis, R. (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Curr Opin Microbiol* **6**: 163-172.

- Joshi, S. A., Hersch, G. L., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2004) Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat Struct Biol* **11**: 404-411.
- 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., Wiegrabe, I., 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, S. G., Maurizi, M. R., Thompson, M., Mueser, T. and Ahvazi, B. (2004) Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J Struct Biol* **148**:338-352.
- Karzai, A. W., Süsskind, M. M. and Sauer, R. T. (1999) SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J* **18**: 3793-3799.
- Karzai, A. W., Roche, E. D. and Sauer, R. T. (2000) The SsrA-SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* **7**: 449-455.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A., Fernandez, J. M. and Sauer, R. T. (2003) Linkage between ATP consumption and mechanical unfolding during the protein processing reactions of an AAA+ degradation machine. *Cell* **114**: 511-520.
- Kenniston, J. A., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2005) Partitioning between unfolding and release of native domains during ClpXP degradation determines substrate selectivity and partial processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 1390-1395.
- Kessel, M., Maurizi, M. R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B. L., Singh, S. K. and Steven, A. C. (1995) Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol* **250**: 587-594.
- Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**: 193-205.
- Kim, Y.-I., Burton, R. E., Burton, B. M., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2000) Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machinery. *Mol Cell* **5**: 639-648.
- Kim, Y.-I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R. V., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**: 230-233.

- Kim, D. Y. and Kim, K. K. (2003) Crystal structure of ClpX molecular chaperone from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **278**:50664-50670.
- Kirstein, J. and Turgay, K. (2005) A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:182-188.
- Kirstein, J., Zühlke, D., Gerth, U., Turgay, K. and Hecker, M. (2005) A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J* **24**: 3435-3445.
- Kirstein, J., Schlothauer, T., Dougan, D. A., Lilie, H., Tischendorf, G., Mogk, A. Bukau, B. and Turgay, K. (2006) Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J* **25**: 1481-1491.
- Kočan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, V. F. and Bott, M. (2006) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188**:724-732.
- Kock, H., Gerth, U. and Hecker, M. (2004) The ClpP peptidase is the major determinant of bulk protein turnover in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 5856-5864.
- Krüger, E., Msadek, T., Ohlmeier, S. and Hecker, M. (1997) The *Bacillus subtilis clpC* operon encodes DNA repair and competence proteins. *Microbiology* **143**: 1309-1316.
- Krüger, E., Zühlke, D., Witt, E., Ludwig, H. and Hecker, M. (2001) Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J* **20**: 852-863.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A. and Nystrom, T. (2003) The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol* **6**:140-145.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Liebl, W. (1991) The genus *Corynebacterium*-nonmedical. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. (eds). New York: Springer, 1157-1171.
- Link, A. J., Philips, 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.
- Lüdtke, a., Krämer, R., Burkovski, A., Schluesener D. and Poetsch, A. (2007) A proteomic study of *Corynebacterium glutamicum* AAA+ protease FtsH. *BMC Microbiol* **7**: 6.

- Ludwig, C. (2002) Charakterisierung des Substratspektrums der ATP-abhängigen Protease Clp aus *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Martin, A., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2005) Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* **437**: 1115-1120.
- Maurizi, M. R., Clark, W. P., Katayama, Y., Rudikoff, S., Pumphrey, J., Bowers, B. and Gottesman S. (1990a) Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 12536-12545.
- Maurizi, M. R., Clark, W. P., Kim, S.-H. and Gottesman S. (1990b) Clp P represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem* **265**: 12546-12552.
- Maurizi, M. R., Singh, S. K., Thompson, M. W., Kessel, M. and Ginsburg, A. (1998) Molecular properties of ClpAP protease of *Escherichia coli*: ATP-dependent association of ClpA and ClpP. *Biochemistry* **37**: 7778-7786.
- McGinness, K. E., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2006) Engineering controllable protein degradation. *Mol Cell* **22**: 701-707.
- McGrew, D. A. and Knight, K. L. (2003) Molecular design and functional organization of the RecA protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38**: 385-432.
- Miethke, M., Hecker, M. and Gerth, U. (2006) Involvement of *Bacillus subtilis* ClpE in CtsR degradation and protein quality control. *J Bacteriol* **188**: 4610-4619.
- Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J. and Bukau, B. (2003a) Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis and chaperone activity. *J Biol Chem* **278**: 17615-17624.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E. and Bukau, B. (2003b) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol* **50**: 585-595.
- Mogk, A., Schmidt, R. and Bukau, B. (2007) The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* **17**: 165-172.
- 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
- Nagy, I., Tamura, T., Vanderleyden, J., Baumeister, W. and De Mot, R. (1998) The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **180**: 5448-5453.
- Nagy, I., Banerjee, T., Tamura, T., Schoofs, G., Gils, A., Proost, P., Tamura, N., Baumeister, W. and De Mot, R. (2003) Characterization of a novel intracellular endopeptidase of the α/β hydrolase family from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **185**: 496-503.

- Nagashima, K., Kubota, Y., Shibata, T., Sakaguchi, C., Shinagawa, H. and Hishida, T. (2006) Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *J Biol Chem* **281**: 30941-30946.
- Nanamiya, H., Shiomi, E., Ogura, M., Tanaka, T., Asai, K. and Kawamura, F. (2003) Involvement of ClpX protein in the post-transcriptional regulation of a competence specific transcription factor, ComK protein, of *Bacillus subtilis*. *J Biochem (Tokyo)* **133**: 295-302.
- Neher, S. B., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2003) Distinct peptide signals in the UmuD and UmuD' subunits of UmuD/D' mediate tethering and substrate processing by the ClpXP protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13219-13224.
- Neher, S. B., Villén, J., Oakes, E. C., Bakalarski, C. E., Sauer, R. T., Gygi, S. P. and Baker, T. A. (2006) Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. *Mol Cell* **22**: 193-204.
- Niebisch, A. and Bott, M. (2001) Molecular analysis of the cytochrome *bc₁-aa₃* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c₁*. *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.
- Ortega, J., Singh, S. K., Ishikawa, T., Maurizi, M. R. and Steven, A. C. (2000) Visualization of substrate binding and translocation by the ATP-dependent protease, ClpXP. *Mol Cell* **6**: 1515-1521.
- Ortega, J., Lee, H. S., Maurizi, M. R. and Steven, A. C. (2002) Alternating translocation of protein substrates from both ends of ClpXP protease. *EMBO J* **18**: 4938-4949.
- Ortega, J., Lee, H. S., Maurizi, M. R. and Steven, A. C. (2004) ClpA and ClpX ATPases bind simultaneously to opposite ends of ClpP peptidase to form active hybrid complexes. *J Struct Biol* **146**: 217-226.
- Pan, Q. and Losick, R. (2003) Unique degradation signal for ClpCP in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 5275-5278.
- Piszczek, G., Rozycki, J., Singh, S. K., Ginsburg, A. and Maurizi, M. R. (2004) The molecular chaperone, ClpA, has a single high affinity peptide binding site per hexamer. *J Biol Chem* **280**:12221-12230.
- Pummi, T., Leskelä, S., Wahlström, E., Gerth, U., Tjalsma, H., Hecker, M., Sarvas, M. and Kontinen, V. P. (2002) ClpXP protease regulates the signal peptide cleavage of secretory preproteins in *Bacillus subtilis* with a mechanism distinct from that of the ecs ABC transporter. *J Bacteriol* **184**: 1010-1018.

- Ramos, A., Letek, M., Campelo, A. B., Vaquera, J., Mateos, L. M. and Gil, J. A. (2005) Altered morphology produced by *ftsZ* expression in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *Microbiology* **151**:2563-2572.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratorial manual. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I., Neher, S. B., Oakes, E. S. C., Siddiqui, S. M., Wah, D. A. and Baker, T. A. (2004) Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell* **119**: 9-18.
- Schaaf, S. and Bott, M. (2007) Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* doi:10.1128/JB.00121-07.
- 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., Gunther, 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.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379.
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. and Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* **21**: 289-296.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J. W., Schultz, P. G., Bukau, B. and Mogk A. (2004) Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol* **11**:607-615
- Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D. A., Bukau, B. and Turgay, K. (2003) MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2306-2311.
- Schobel, S., Zellmeier, S., Schumann, W. and Wiegert, T. (2004) The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol Microbiol* **52**:1091-1105.

- Schweitzer, J.-E. (2004) Untersuchungen zur *in vitro*-Aktivität der *Corynebacterium glutamicum* ClpCP-Protease und zur Expression ihrer Strukturgene. Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Siddiqui, S. M., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2004) Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates. *Genes Dev* **18**: 369-374.
- Singh, S. K., Guo, F. and Maurizi, M. R. (1999) ClpA and ClpP remain associated during multiple rounds of ATP-dependent protein degradation by ClpAP protease. *Biochemistry* **38**: 14906-14915.
- Singh, S. K., Grimaud, R., Hoskins, J. R., Wickner, S. and Maurizi, M. R. (2000) Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8898-8903.
- Singh, S. K., Rozycki, J., Ortega, J., Ishikawa, T., Lo, J., Steven, A. C. and Maurizi, M. R. (2001) Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis. *J Biol Chem* **276**: 29420-29429.
- 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, C. K., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (1999) Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6678-6682.
- Smith, D. M., Benaroudj, N. and Goldberg, A. (2006) Proteasomes and their ATPases: A destructive combination. *J Struct Biol* **156**: 72-83.
- Sprangers, R., Gribun, A., Hwang, P. M., Houry, W. A. and Kay, L. E. (2005) Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: Dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16678-16683.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-491.
- Stanne, T. M., Pojidaeva, E., Andersson, F. I. and Clarke, A. K. (2007) Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria. *J Biol Chem* **282**: 14394-14402.
- Stephani, K., Weichart, D. and Hengge R. (2003) Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**: 1605-1614.
- 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.

- Stüdemann, A., Noirclerc-Savoye, M., Klauck, E., Becker, G., Schneider, D. and Hengge, R. (2003) Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX. *EMBO J* **22**: 4111-4120.
- Szyk, A. and Maurizi, M. R. (2006) Crystal structure at 1.9 Å of *E. coli* ClpP with a peptide covalently bound at the active site. *J Struct Biol* **156**: 165-174.
- Tatusova, T. A. and Madden, T. L. (1999) Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* **174**:247-250.
- Thibault, G., Yudin, J., Wong, P., Tsitrin, V., Sprangers, R., Zhao, R. and Houry, W. A. (2006) Specificity in substrate and cofactor recognition by the N-terminal domain of the chaperone ClpX. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 17724-17729.
- Thompson, M. W. and Maurizi, M. R. (1994) Activity and specificity of *Escherichia coli* ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J Biol Chem* **27**: 18201-18208.
- 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.
- Tindall, K. R. and Kunkel, T. A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. and Varshavsky, A. (1991) The N-end rule in bacteria. *Science* **254**: 1374-1377
- 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.
- Turgay, K., Hamoen, L. W., Venema, G. and Dubnau, D. (1997) Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **11**: 119-128.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J. and Dubnau D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* **17**: 6730-6738.
- Turgay, K., Persuh, M., Hahn, J. and Dubnau D. (2001) Roles of the two ClpC ATP binding sites in the regulation of competence and the stress response. *Mol Microbiol* **42**: 717-727.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12142-12149.

- Varshavsky, A. (2003) The N-end rule and regulation of apoptosis. *Nature Cell Biol* **5**: 373-376.
- Ventura, M., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. (2005a) Genetic and transcriptional organization of the *clpC* locus in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6282-6291.
- Ventura, M., Zhang, Z., Cronin, M., Canchaya, C., Kenny, J. G., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. (2005b) The ClgR protein regulates transcription of the *clpP* operon in *Bifidobacterium breve* UCC 2003 *J Bacteriol* **187**: 8411-8426.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. (2006) How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 734-759.
- Viala, J., Rapoport, G. and Mazodier, P. (2000) The *clpP* multigenic family in *Streptomyces lividans*: conditional expression of the *clpP3 clpP4* operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol Microbiol* **38**: 602-612.
- Viala, J. and Mazodier, P. (2002) ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol* **44**: 633-643.
- Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068.
- Wang, J., Hartling, J. A. and Flanagan, J. M. (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**: 447-456.
- Wang, K. H., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2007) ClpS modulates but is not essential for bacterial N-end rule degradation. *Genes Dev* **21**: 403-408.
- Weibezahn, J., Bukau, B. and Mogk, A. (2004) Unscrambling an egg: Protein disaggregation by AAA+ proteins. *Microb Cell Fact* **3**:1.
- Weichart, D., Querfurth, N., Dreger, M. and Hengge-Aronis, R. (2003) Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 115-125.
- Wendisch, V. F. (2003) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* **104**: 273-285.
- Wennerhold, J. and Bott, M. (2006) The DtxR regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **188**: 2907-2918.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science* **286**: 1888-1893.
- Wiegert, T. and Schumann, W. (2001) SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**: 3885-3889,

- Withey, J. H. and Friedman, D. I. (2003) A salvage pathway for protein synthesis tmRNA and *trans*-translation. *Annu Rev Microbiol* **57**: 101-123.
- Wojtyra, U. A., Thibault, G., Tuite, A. and Houry, W. A. (2003) The N-terminal zinc binding domain of ClpX is a dimerization domain that modulates the chaperone function. *J Biol Chem* **278**:48981-48990.
- Zellmeier, S., Schumann, W. and Wiegert, T. (2006) Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* σ^w stress response. *Mol Microbiol* **61**: 1569-1582.
- Zhou, Y. and Gottesman, S. (1998) Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS. *J Bacteriol* **180**: 1154-1158.
- Zolkiewski, M. (2006) A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. *Mol Microbiol* **61**: 1094-100.

7 Anhang

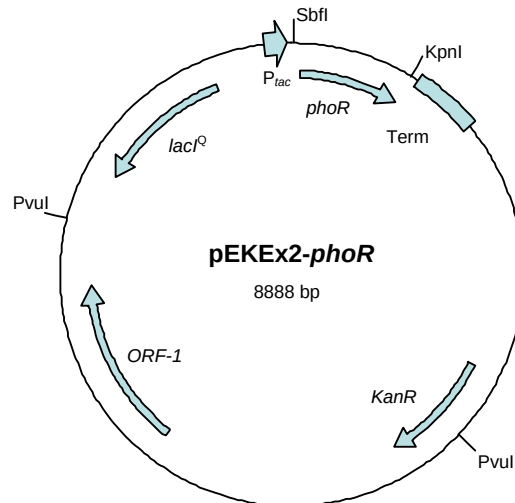


Abbildung 7.1: Plasmidkarte von pEKEx2-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 756 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das *phoR*-Gen von *C. glutamicum* enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-phoR-fw und OE-phoR-rv synthetisiert.

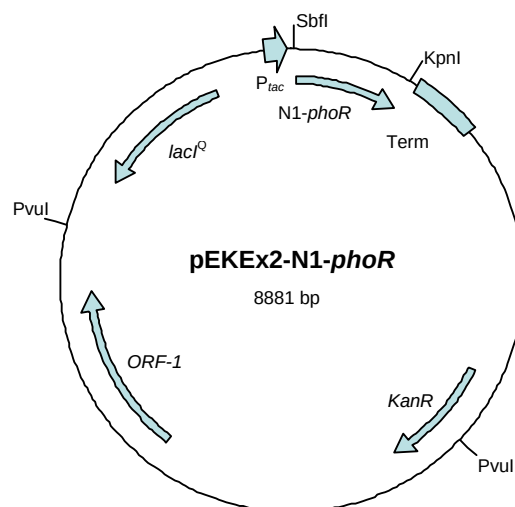


Abbildung 7.2: Plasmidkarte von pEKEx2-N1-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 748 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 1 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N1-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

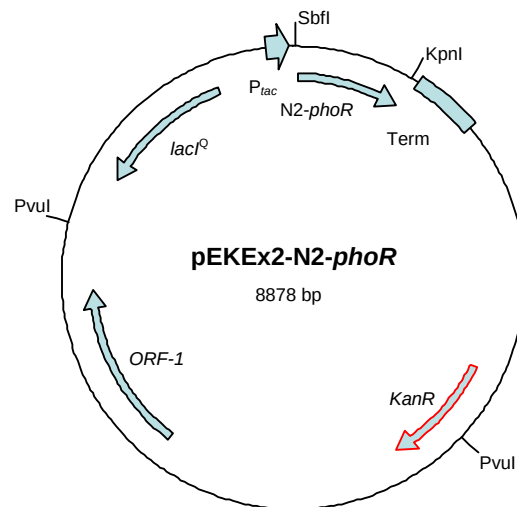


Abbildung 7.3: Plasmidkarte von pEKEx2-N2-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 745 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 2 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N2-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

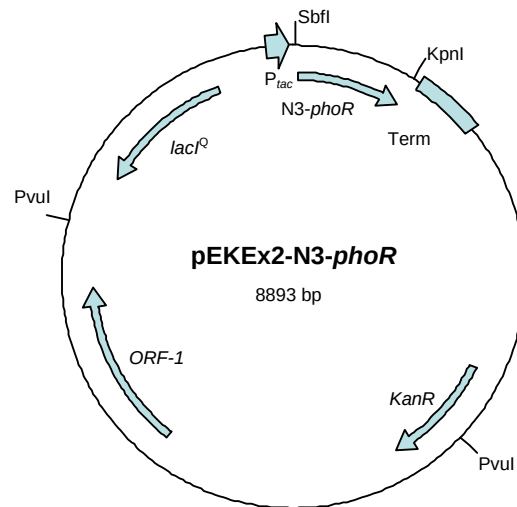


Abbildung 7.4: Plasmidkarte von pEKEx2-N3-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 760 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 3 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N3-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

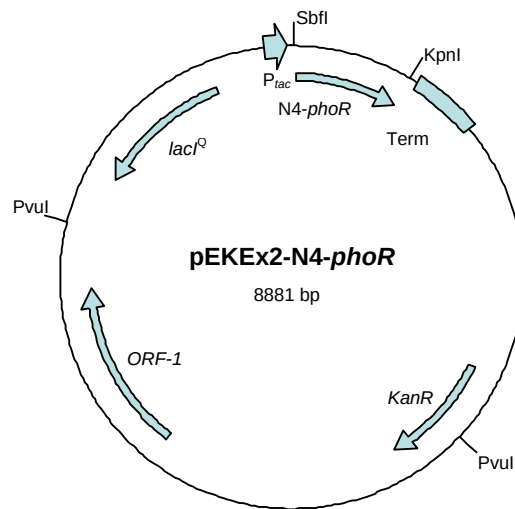


Abbildung 7.5: Plasmidkarte von pEKEx2-N4-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 748 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 4 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N4-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

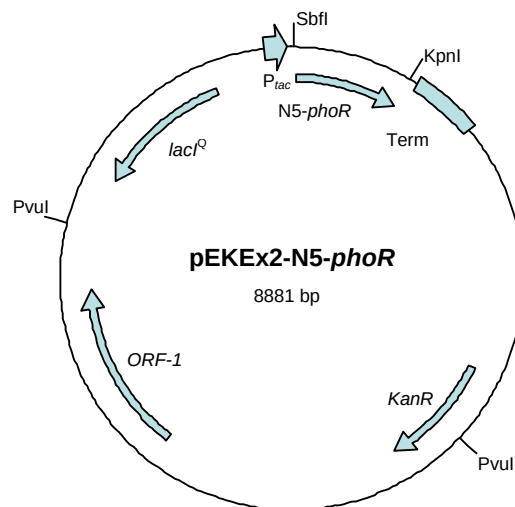


Abbildung 7.6: Plasmidkarte von pEKEx2-N5-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 748 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 5 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N5-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

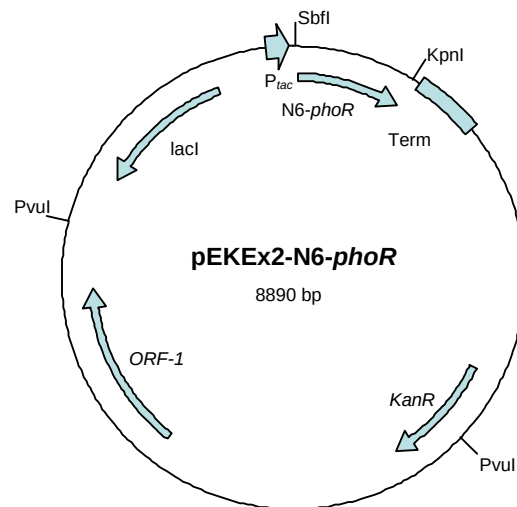


Abbildung 7.7: Plasmidkarte von pEKEx2-N6-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 757 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 6 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N6-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

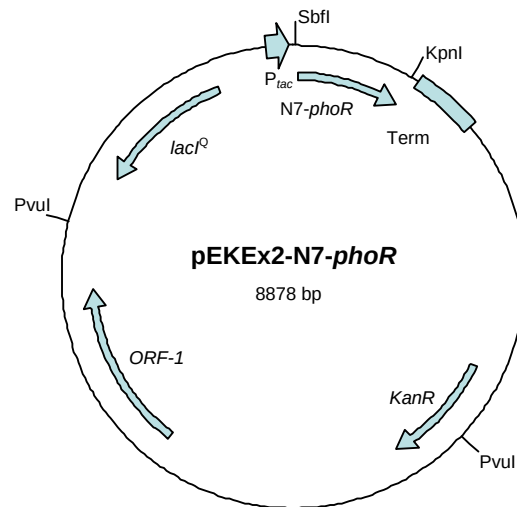


Abbildung 7.8: Plasmidkarte von pEKEx2-N7-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 745 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 7 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N7-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

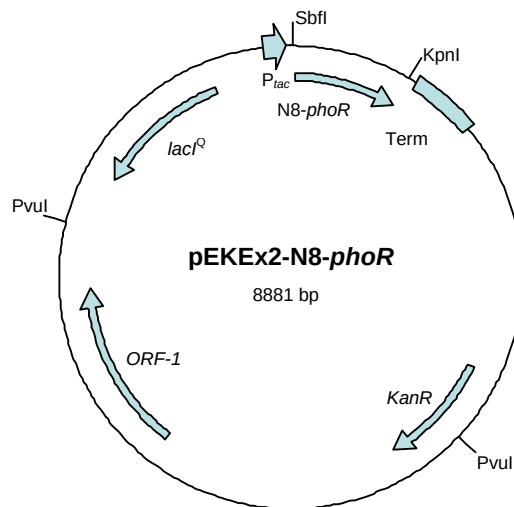


Abbildung 7.9: Plasmidkarte von pEKEx2-N8-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 748 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 8 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N8-phoR-fw und OE-phoR-rv synthetisiert.

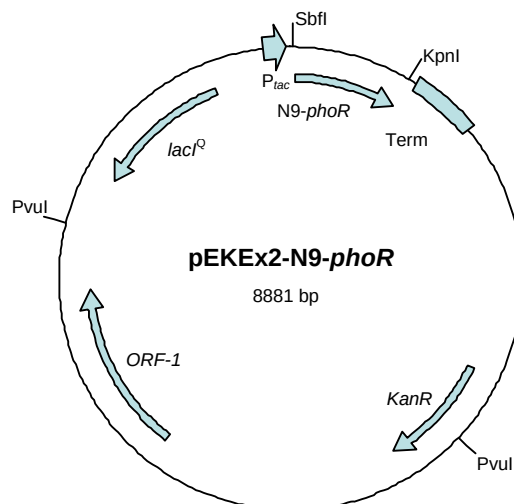


Abbildung 7.10: Plasmidkarte von pEKEx2-N9-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 748 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 9 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N9-phoR-fw und OE-phoR-rv synthetisiert.

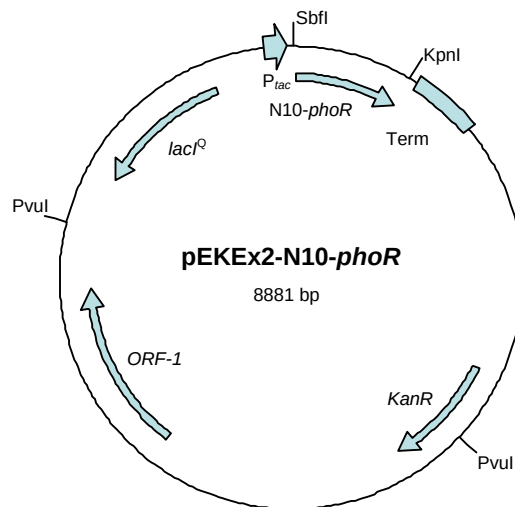


Abbildung 7.11: Plasmidkarte von pEKEx2-N10-*phoR*. Das Plasmid trägt ein 748 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das veränderte *phoR*-Gen von *C. glutamicum* mit N-Motiv 10 enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-N10-*phoR*-fw und OE-*phoR*-rv synthetisiert.

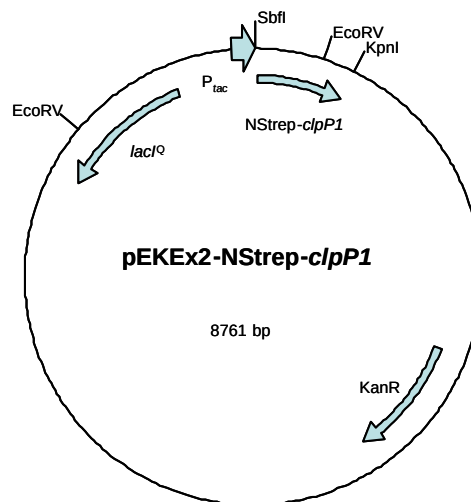


Abbildung 7.12: Plasmidkarte von pEKEx2-NStrep-*clpP1*. Das Plasmid trägt ein 628 bp SbfI-KpnI-Fragment, welches das modifizierte *clpP1*-Gen von *C. glutamicum* mit N-terminalem StrepTag-II enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden NStrep-*clpP1*-fw und NStrep-*clpP1*-rv synthetisiert.

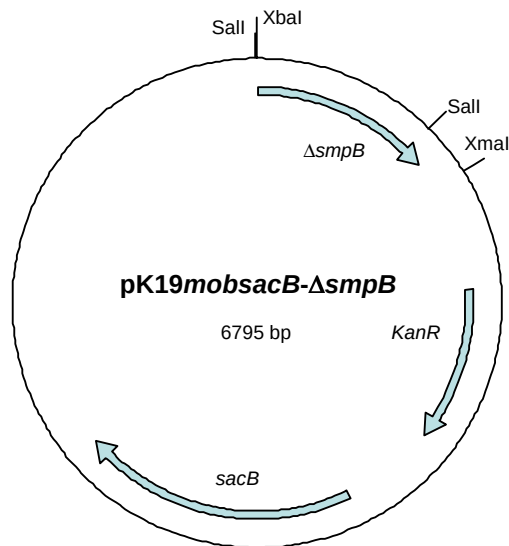


Abbildung 7.13: Plasmidkarte von pK19mobsacB-ΔsmpB. Das Plasmid trägt ein 756 bp XmaI-XbaI-Crossover-PCR-Fragment, das die *smpB* flankierenden Bereiche von *C. glutamicum* enthält. Das Fragment wurde unter Verwendung der Oligonukleotiden DeltasmpB-1, DeltasmpB-2, DeltasmpB-3 und DeltasmpB-4 synthetisiert.

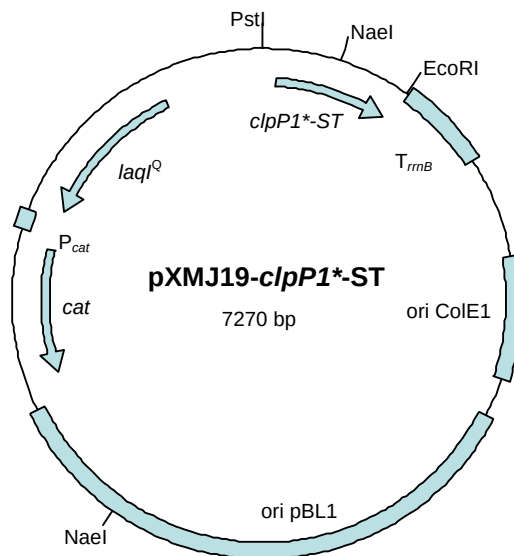


Abbildung 7.14: Plasmidkarte von pXMJ19-clpP1*-ST. Das Plasmid ist ein Derivat von pXMJ19-clpP1-ST bei dem durch gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden EX-clpP1-S96G-fw und EX-clpP1-S96G-rv das Codon für das katalytisch aktive Serin gegen Glycin ausgetauscht wurde. Durch diesen Austausch wurde eine zusätzliche *NaeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

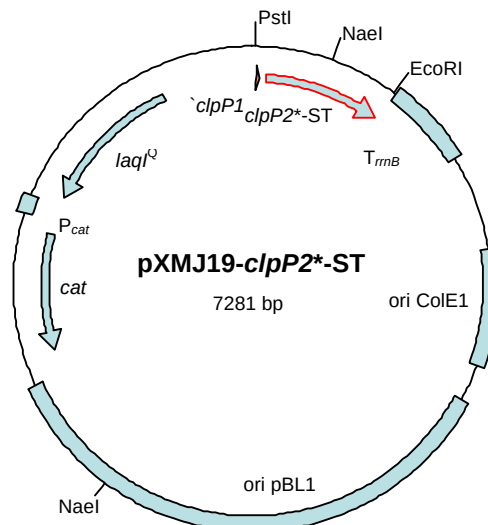


Abbildung 7.15: Plasmidkarte von pXMJ19-*clpP2**-ST. Das Plasmid ist ein Derivat von pXMJ19-*clpP2*-ST bei dem durch gerichtete Mutagenese mit den Oligonukleotiden EX-*clpP2*-S108G-fw und EX-*clpP2*-S108G-rv das Codon für das katalytisch aktive Serin gegen Glycin ausgetauscht wurde. Durch diesen Austausch wurde eine zusätzliche NaeI-Restriktionsschnittstelle eingefügt.

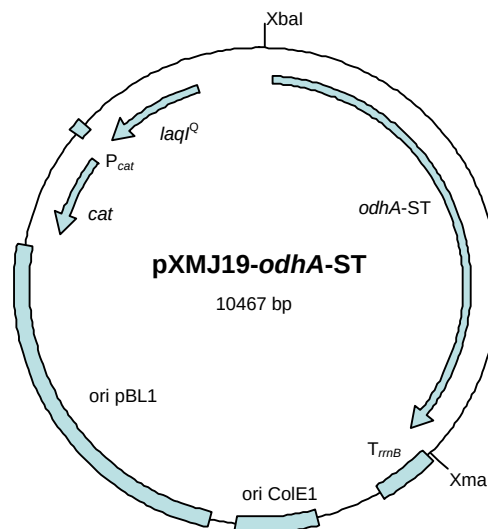


Abbildung 7.16: Plasmidkarte von pEKEx2-*odhA*-ST. Das Plasmid trägt ein 3878 bp XbaI-XmaI-Fragment, welches das modifizierte *odhA*-Gen von *C. glutamicum* mit C-terminalem StrepTag-II enthält. Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden OE-*odhA*-ST-fw und OE-*odhA*-ST-rv synthetisiert.

Tabelle 7.1 Peptidmassenfingerprint-Analyse von Proteinen, die mit ClpP1 co-gereinigt und über zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt wurden. Die Nummerierung bezieht sich auf die Proteinspots der Abbildung 4.18 und gibt die jeweils beste Bestimmung der Tabelle 4.1 wieder. Die Δ ppm-Werte geben die Abweichung der experimentell bestimmten zu den berechnenden monoisotopischen Massen an.

Nr:	Protein (Datenbanknummer)	Sequenz-abdeckung			
	m/z	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Modifikation
1	Ribosomales Protein S6 (Cg3308)				52 %
	1112,7554	101,2432	78-87	(R)VNLNNDGVLR(T)	
	1306,7710	106,9145	67-77	(K)CESATVLELDR(V)	
	1574,0721	112,2867	18-31	(R)TVAPSLDKFLEVVR(K)	
	1850,1074	111,7963	3-17	(R)QYELMIILDPSQDER(T)	
	1866,1088	114,3255	3-17	(R)QYELMIILDPSQDER(T)	1Met-Ox
2	Ribosomales Protein L10 (Cg0572)				66 %
	1188,7767	99,1584	30-40	(R)GLTVAQTTELRL(K)	
	1297,7735	72,6215	42-53	(K)ALGFQDVQYSVAK(N)	
	1316,8904	103,7646	30-41	(R)GLTVAQTTELRL(K)	
	1372,8518	85,9979	147-160	(K)AAGLFNAPASQVAR(L)	
	1543,8795	57,8204	1-14	(-)MANPRNEAALAE(LK)	1Met-Ox
	1543,8795	74,5581	17-29	(R)FAETDVTVLTEYR(G)	
	2422,2836	63,0658	107-129	(K)GGYMDGNALTAQVNAIAELDNR(E)	
	2438,2980	70,6408	107-129	(K)GGYMDGNALTAQVNAIAELDNR(E)	1Met-Ox
	2485,4679	59,9280	59-83	(K)IAANEAGVEGLDLDLTGPTAVAFIK(G)	
3	Ribosomales Protein L5 (Cg0610)				46 %
	996,4613	-186,4915	101-107	(R)MWEFLDR(L)	
	1012,2674	-186,4685	101-107	(R)MWEFLDR(L)	1Met-Ox
	1201,4096	-188,7134	39-50	(K)IVVNMGVGDAAR(D)	
	1465,4417	-181,4036	177-189	(R)ELGFPPFKGEDGNR(Q)	
	1721,5175	-178,4512	177-191	(R)ELGFPPFKGEDGNRQQ(-)	
	1779,5173	-183,2627	156-172	(R)GMDITVVTAVTDDEGR(S)	
	2065,6540	-180,4517	21-38	(K)LQGEFEFENVMIQPGVTK(I)	
	2081,6437	-181,5633	21-38	(K)LQGEFEFENVMIQPGVTK(I)	1Met-Ox
	2150,8017	-191,5303	54-73	(K)LINGAIEDLTAITGQKPLRL(R)	
4	Desoxycytidintriphosphat-deaminase (Cg3155)				33 %
	966,4312	-76,2479	182-189	(K)AYLNFPNK(-)	
	1082,5427	-63,1911	88-97	(K)FTLPAHLA(LR)	
	2167,9639	-48,8386	146-166	(K)VGQLALFQMSSPAETPYGSGK(L)	
	2183,9638	-46,5144	146-166	(K)VGQLALFQMSSPAETPYGSGK(L)	1Met-Ox
	2643,2097	-39,9876	11-35	(K)SIDAGDLGIEPFDAELIQPSSVDVR(M)	
	2771,3008	-39,5243	10-35	(R)KSIDAGDLGIEPFDAELIQPSSVDVR(M)	
5	F₁F₀ ATP-Synthase, δ-UE (Cg1365)				33 %
	1261,6953	90,3291	85-95	(K)DAAEQTWSTPR(E)	
	1501,8791	100,1299	116-128	(K)QGQLGQVEDELFR(L)	pyro-Glu
	1518,8881	87,4636	116-128	(K)QGQLGQVEDELFR(L)	
	1661,9879	92,2404	250-265	(R)VGDEVIDGSTGSKLER(L)	
	2046,1881	74,1527	231-249	(R)AMSIHSEVDTSLGGMIIR(V)	1Met-Ox
	2062,1933	78,5858	231-249	(R)AMSIHSEVDTSLGGMIIR(V)	2Met-Ox
	2313,4040	84,2646	75-95	(K)VSPPSVLEVLDAAEQTWSTPR(E)	
	2321,3835	74,6999	202-223	(R)SVAHVVTAVELNEGQQALAE(L)	
6	Ribosomenassoziiertes Protein Y (Cg0867)				45 %
	1312,7630	102,5819	22-32	(R)NVEVPDHFAER(V)	
	1408,8131	98,1614	209-221	(R)HAFDYGLISLSDA(-)	
	1564,9318	99,5615	208-221	(R)HAFDYGLISLSDA(-)	
	1928,1415	91,3685	82-99	(R)AEAKEDSFYAALETALAK(M)	
	1983,2002	93,5412	120-139	(R)APLGTGEVGAQLVAESQEAR(G)	
	2290,3703	90,9183	43-61	(R)LDPTLTFFHVELQHEPNPR(R)	
	2297,2838	90,4858	147-166	(K)YDVPDYADKVDDVMPGQVVR(T)	1Met-Ox
7	Glycin/D-Aminosäuren-Oxidase (Cg1783)				43 %
	1305,7373	43,6460	68-79	(R)ALWSSLSEISGR(E)	
	1608,8880	48,7522	51-64	(R)MAYHEGSTYVPLLK(R)	
	1624,8944	55,3066	51-64	(R)MAYHEGSTYVPLLK(R)	1Met-Ox
	2421,3112	52,5874	80-100	(R)ELFHNFGVLTSGKDEAPFQR(L)	
	2467,5099	52,1419	194-216	(R)VIVTTGSGWSELVPSIAPLLEVR(R)	
	2611,4384	58,6813	170-193	(K)ITSIEDNGDHVVIQAGEETTIVDR(V)	
	2885,6620	59,7472	131-158	(R)DDEAGIVDLQGGALRPELAVFSAIETAK(A)	
8	UspA, generelles Stressprotein (Cg3255)				22 %
	1133,4512	-98,1589	216-224	(R)QQTDMILIER(L)	
	1149,4366	-105,0795	216-224	(R)QQTDMILIER(L)	1Met-Ox
	1221,5278	-98,3266	75-85	(R)DIAHEVAPEIK(I)	
	1921,8706	-72,2793	249-267	(R)ALAEASENAQLLVVSGHGR(G)	
	2929,2029	-62,3635	154-181	(K)YGPVVVGVDGSEVSQQATEYAFAEAEAR(G)	

Fortsetzung Tabelle 7.1

9	SufC, FeS-Cluster-Maturase (Cg1762)				32 %
	1272,7817	87,7078	50-61	(K)STLAYTLGGHPR(Y)	
	1298,7403	87,3787	242-252	(K)LEADGYDQFIK(-)	
	1432,9728	83,7376	159-170	(R)HEVLQLDLLKPK(F)	
	1589,0939	88,1439	158-170	(K)RHEVLQLDLLKPK(F)	
	1661,9512	82,8773	131-145	(R)TAQEALAIIDPEFSNR(S)	
	1735,0152	85,8578	8-23	(R)NLHAQVLPDSAEAPK(E)	
	1884,0361	88,3507	171-187	(K)FAIMDETDSGLDVALR(I)	1Met-Ox
10	Polyphosphat-Glukokinase (Cg2091)				36 %
	966,4006	-54,4293	24-31	(K)TGEFIDER(I)	
	1200,6018	-47,5152	72-83	(R)GQIALSAANIDK(S)	
	1549,7901	-54,3109	197-211	(K)LFSPSVFIIGGGISR(K)	
	1549,7901	-16,7815	235-250	(R)AGIVGAAMAVNQHLTP(-)	
	1565,7474	-40,6192	235-250	(R)AGIVGAAMAVNQHLTP(-)	1Met-Ox
	1582,7173	-38,8031	1-16	(-)MTETGFGIDIGSGSIK(G)	
	1589,7168	-35,5312	1-16	(-)MTETGFGIDIGSGSIK(G)	1Met-Ox
	2387,1295	-22,9497	102-125	(R)EITVLNDADAAGIAEATFGNPAAR(E)	
11	Triosephosphatisomerase (Cg1789)				27 %
	1431,8136	20,1711	39-51	(K)VDDVAVTVPFTDIR(S)	
	1504,7141	14,6833	105-117	(R)EYHNESDELVAAC(A)	
	1582,8283	17,1345	13-26	(K)MNLDHQQAIGTVQK(L)	
	1598,8313	22,0321	13-26	(K)MNLDHQQAIGTVQK(L)	1Met-Ox
	1617,8185	19,2945	140-153	(R)EAGTHVEYVVEQTR(K)	
	1640,8984	7,5727	197-212	(R)GLIVELAGDEVAEGLR(I)	
	1745,9183	20,6637	140-154	(R)EAGTHVEYVVEQTR(S)	
12	putative Dehydrogenase (Cg2958)				39 %
	2350,3916	38,0128	136-158	(K)IINAASIAAIQGFILSAYSTTK(F)	
	2643,4338	44,7934	22-46	(K)LAADGFDIAVADLPQQEEQAAETIK(L)	
	2744,4535	43,0334	176-201	(K)GHTVNAYAPGIVGTGMWEQIDAELSK(I)	
	2760,4601	47,0109	176-201	(K)GHTVNAYAPGIVGTGMWEQIDAELSK(I)	1Met-Ox
	2995,7641	42,9031	79-106	(K)LGGFDVLVNNAGIAQIKPLLEVEEDLK(Q)	
13	Cysteinsynthase (Cg2833)				70 %
	1104,5094	1,7852	145-153	(R)QFENEANPR(V)	
	1336,7216	7,7541	288-299	(K)TIVTVTDFGER(Y)	
	1472,7411	9,3601	300-311	(R)YVSTVLYEDIRD(-)	
	1641,9180	13,1323	221-235	(K)IQGIGANFIPEVLDR(K)	
	1770,0155	13,6118	221-236	(K)IQGIGANFIPEVLDR(K)	
	1840,8820	13,3982	88-103	(R)GYNVVLTMPETMSNER(R)	
	1856,8809	15,4393	88-103	(R)GYNVVLTMPETMSNER(R)	1Met-Ox
	1899,0207	14,2844	128-144	(K)DKADEIVAERENAVLAR(Q)	
	1964,0262	14,5507	237-254	(K)VLDLTVSNEDAIASFR(K)	
	2092,1285	17,1615	236-254	(R)KVLDLTVSNEDAIASFR(K)	
	2092,1285	17,1615	237-255	(K)VLDLTVSNEDAIASFR(K)	
	2445,2894	-14,1716	23-45	(K)LTEGLDATVLVKLESFNPAANSVK(D)	
	2445,2894	30,4687	193-215	(K)ENNADVQVYVTEPEASPLTAGK(D)	
	2670,4828	21,7012	59-87	(K)SGALKPGGTIVEATSGNTGIALAMVGAAR(G)	
	2868,4909	26,4518	59-87	(K)SGALKPGGTIVEATSGNTGIALAMVGAAR(G)	1Met-Ox
	2868,4909	18,3438	274-299	(K)AALDLAAKPENAGKTIVTVTDFGER(Y)	
	3138,6673	26,3365	162-192	(K)EILEDTDGNVDIFVASFGTGGTVTGVGQVLK(E)	
14	Fructose-/Tagatosebisphosphat-Aldolase (Cg3068)				31 %
	1326,6205	-72,7488	71-84	(K)GAVALAAFAHEAAK(S)	
	1541,6116	-65,3503	176-189	(K)AGANLYTSPEDFEK(T)	
	1607,8260	-60,5406	222-235	(K)LRPEVLLEGQVAR(K)	
	2029,9842	-53,2121	100-116	(K)EVLDEYVRPLAISQER(V)	
	2278,9849	-49,8053	238-259	(K)LGLADDALPFDVFGGSGSEK(E)	
	2645,1571	-43,9985	40-66	(K)GFAEAESDGIQFSTGGAEEFGSLAVK(N)	
15	Ribosomales Protein S2 (Cg2222)				39 %
	968,5914	61,5102	29-35	(R)RFIFTER(N)	
	1046,6405	70,3755	148-157	(R)VLGGIAEMTR(V)	
	1072,6087	67,5810	87-95	(R)VGMPYVNHRR(W)	
	1579,9157	74,4538	8-21	(R)ELLDAGVHFGHQTR(R)	
	1653,8444	76,5176	116-130	(K)ELQAMDAEAENGYEGR(T)	
	1913,0125	83,2253	114-160	(R)MKELQAMDAEAENGYEGR(T)	
	2397,3577	76,8884	75-95	(K)QAQEAQVEADRVGMPYVNHRR(W)	
	2557,4112	77,1420	111-132	(R)LNRMKELQAMDAEAENGYEGR(T)	
	3249,7484	101,2216	239-272	(K)DAAGDAKPEAAEAPAAAEAAEAPAAEAAEAPAAE(-)	
16	6-Phosphofruktokinase (Cg1409)				34 %
	1165,6935	104,7500	154-163	(R)LHTTAESHNR(V)	
	1167,6866	112,9817	236-245	(R)EGHIDQFGHK(T)	
	1357,9273	105,3088	216-228	(K)YGIHVVAEGALPR(E)	
	1380,8178	137,2170	50-60	(R)VQLYDDEIDIR(I)	
	1480,9825	112,1943	112-125	(K)WLSDNIGIPVGVPK(T)	
	1785,1119	102,1625	246-261	(K)TFTGIGQQAIDEIHVR(L)	
	2067,3088	102,2629	88-108	(K)ANLEDAGIDALIPIGGEGTLK(G)	

Fortsetzung Tabelle 7.1				
	2558,4323	98,6635	25-48	(R)TASNEFGSTVVGYYQDQWEGLLGDR(R)
	2714,5319	92,4340	25-49	(R)TASNEFGSTVVGYYQDQWEGLLGDRR(V)
17	ATPase eines ABC-Typ Transporters (Cg2708)			36 %
	1203,5684	-36,3627	211-221	(K)DGYLQQVGAPR(E)
	1533,7496	-28,0401	343-358	(R)AAPNAAPAGSVFHAR(I)
	1701,7695	-24,8352	262-277	(K)LSPETLAAMTPEDNGR(I)
	1734,8426	-28,1196	116-131	(R)VDEAAATLGLTEFLER(K)
	1786,7753	-72,5595	1-17	(-)MATVTFKDASLSYPGAK(E)
	1946,9056	-24,5177	153-169	(R)NPQVFLMDEPLSNLDAK(L)
	2307,0896	-17,1045	185-205	(K)LGVTTVYVTHDQTEALTMGDR(I)
	2329,1086	-18,7919	320-342	(K)LVGEGDLGSSSEDPESGQIVVR(A)
	2435,1799	-18,1431	184-205	(R)KLGVTTVYVTHDQTEALTMGDR(I)
	2451,1775	-16,9006	184-205	(R)KLGVTTVYVTHDQTEALTMGDR(I)
18	2-Polyprenylphenol-Hydroxylase (Cg3092)			15 %
	1900,8155	-119,7075	369-385	(R)AMIRRGTPAQQIEILGF(-)
	2383,9214	-105,7134	135-155	(R)EADAEHAPASYQAEIVEVEKR(S)
	2501,1636	-51,9189	1-22	(-)MTPRPVSSVARLVEDNAQDFLR(A)
19	RecA (Cg2141)			21 %
	1600,6956	-45,3264	269-282	(K)IAEFDIMYGEGISR(E)
	1773,7251	-46,9487	299-314	(K)SGSWFTYEQEQLQGQK(E)
	2072,9163	-42,3544	98-117	(K)AGGIAAFIDAEHALDPDYAR(K)
	3097,2981	-100,4043	118-146	(R)KLGVDTDALLVSQPDTEGEQALEIADMLVR(S)
20	F₁F₀-ATP-Synthase, γ-UE (Cg1367)			24 %
	1235,5590	-84,6295	105-115	(K)LLAESGYEVVR(Y)
	1388,6043	-81,4140	39-51	(R)VAAAAPYAEIQR(V)
	1388,6043	-76,7157	86-98	(R)GMAGGYNHNVLKK(A9)
	1846,7424	70,3775	155-171	(R)HLIDGFTASSEGEAAWR(E)
	2631,0170	-64,3848	130-153	(R)AEDVAGTWTGFSQDPDWAATHNVR(R)
	2934,1743	-61,9105	128-153	(K)FRAEDVAGTWTGFSQDPDWAATHNVR(R)
21	Ornithincyclodeaminase (Cg1784)			30 %
	1213,5998	11,2373	82-92	(R)FMAMPAYLGGR(F)
	1229,5971	13,0148	82-92	(R)FMAMPAYLGGR(F)
	1245,5908	11,8878	82-92	(R)FMAMPAYLGGR(F)
	1313,6272	19,6679	266-276	(R)FDDAYLLDDAR(L)
	1699,9764	43,8134	115-130	(R)SIHTFVLNDVTGAPK(A)
	1705,0778	35,9365	250-265	(K)EWLKPGLALLPAAGR(F)
	1888,1128	48,4048	173-189	(K)TITEACIAERPGITTIK(I)
	1937,1619	56,1919	153-172	(K)HLAVADATTLAVVGPGVMAK(T)
	2854,4957	86,5720	50-75	(K)MAGLNSNSHGAMITFPENPEFEGMPK(D)
22	DNA-abhängige RNA-Polymerase, α-UE (Cg0655)			35 %
	1118,5624	-84,8570	213-222	(K)TLVELFGLAR(E)
	1368,5696	-77,6854	266-277	(R)EDIHTVGEAER(A)
	1371,6807	-78,7593	161-172	(R)IPVDQIYSPVLK(V)
	1548,6946	-69,4759	145-160	(R)GYVPATVTATGGEIGR(I)
	2108,9681	-63,5294	21-39	(R)FVIEPLEPGFGYTLGNSLR(R)
	2118,9682	-60,8029	1-18	(-)MLISQRPTITEEFVNAR(S)
	2134,9679	-58,1062	1-18	(-)MLISQRPTITEEFVNAR(S)
	2901,4062	-57,3402	145-172	(R)GYVPATVTATGGEIGRIPVDQIYSPVLK(V)
	3460,6258	-42,0137	100-133	(K)EGPGVVTAGDIQPPAGVEIHNPDLHIATLNETAK(I)
23	Enolase (Cg1111)			32 %
	1188,5832	-45,8728	120-131	(K)AAADSAGLPLFR(Y)
	1461,7196	-34,6251	404-417	(R)IEQLLDAGVYAGR(S)
	1735,8178	-27,5154	304-318	(K)VQIVGDDFFVTNPER(L)
	1864,8578	-24,8235	196-215	(K)GLSTGLGDEGGFAPSVGSTR(E)
	2117,9934	-16,7898	335-353	(K)VNQIGTLTETFDVDMMAHR(A)
	2133,9929	-14,5148	335-353	(K)VNQIGTLTETFDVDMMAHR(A)
	2386,0636	-15,6967	66-87	(K)AVENVNEEIGDELAGLEADDQR(L)
	3598,7289	3,5165	17-52	(R)GNPTVEAEVFLDDGSHGVAGVPSGASTGVHEAHEL(R)
24a	EF-Tu (Cg0587)			54 %
	1429,6283	-49,9511	253-265	(K)STSTTVTGIEFR(K)
	1557,7087	-55,1723	253-266	(K)STSTTVTGIEFR(K)
	1585,7484	-60,1307	236-250	(R)GTLNVNDDVDIIGIK(E)
	1693,7084	-59,2167	78-92	(R)HYAHVDAPGHADYIK(N)
	1731,7868	-60,5648	62-76	(R)GITINISHVEYQTEK(R)
	1809,8689	-57,1672	9-25	(R)TKPHVNIGTIGHVDHGK(T)
	1858,8405	-69,4662	266-282	(R)KLLDSAEAGGNCGLLLR(G)
	1887,8899	-54,5117	62-77	(R)GITINISHVEYQTEK(R)
	2034,8461	-56,7151	322-336	(R)HTPFFDNRYRQFYFR(T)
	2383,0732	-54,6085	158-178	(R)ELLAEQDYDEEAPIVHISALK(A)
	2706,1609	-93,6250	292-316	(R)GQVIVKPGAYTPHTEFEGSVVLSK(D)
	2812,1818	-62,2725	35-59	(K)VLADTYPELNEAFKDSIDKAPEEK(E)
	3097,3132	-60,4941	35-61	(K)VLADTYPELNEAFKDSIDKAPEEKER(G)

Fortsetzung Tabelle 7.1

	3220,4319	-60,8415	292-321	(R)GQVIVKPGAYTPHTEFEGSVVYLSKDEGGR(H)	
	3344,3763	-63,4879	346-376	(K)LPEGTEMVMPGDNVDMSVTLIQPVAMDEGLR(F)	
	3360,3961	-55,7762	346-376	(K)LPEGTEMVMPGDNVDMSVTLIQPVAMDEGLR(F)	1Met-Ox
	3376,4609	-34,8140	346-376	(K)LPEGTEMVMPGDNVDMSVTLIQPVAMDEGLR(F)	2Met-Ox
24b	Argininosuccinat-Synthase (Cg1586)				42 %
	1382,7330	29,9270	282-293	(K)AHEALEDVTIER(E)	
	1405,7298	30,8730	172-183	(K)SPFSIDQNVWGR(A)	
	1429,7443	-6,7034	51-65	(R)ALDAGAAESIVVDK(D)	
	1630,9825	40,2588	267-281	(K)SREIYEAPGAIALIK(A)	
	1820,9948	48,1691	184-199	(R)AIETGYLEDLWNAPTK(D)	
	1859,0495	50,7848	155-171	(K)AIAFAEENNVPSEQSVK(S)	
	1994,2212	50,0650	5-23	(R)IVLAYSGGLDTTVAIPYK(K)	
	2004,0983	65,3155	322-339	(R)SLDAFIDSTQEHVTGDIR(M)	
	2122,3332	55,0309	5-24	(R)IVLAYSGGLDTTVAIPYK(K)	
	2151,2070	76,1136	128-146	(R)FEVGFMDDPNLEIAPAR(D)	1Met-Ox
	2810,5360	91,2145	354-378	(R)SSHSLYDFNLATYDTGDTFDQTLAK(G)	
25	Citratsynthase (Cg0949)				53 %
	994,5061	-4,9250	128-135	(K)SQFNVFPR(D)	
	1112,6042	3,2935	398-406	(R)LPGWIAHYR(E)	
	1128,6118	11,5496	177-186	(K)VPMLAAYHR(A)	
	1306,7169	12,3675	65-76	(K)ITYIDGDAGILR(Y)	
	1568,7675	18,9091	1-13	(-)MFERDIVATDNNK(A)	1Met-Ox
	1568,7675	32,3786	190-203	(K)GAPYMYPDNSLNAR(E)	
	1584,7523	25,6490	190-203	(K)GAPYMYPDNSLNAR(E)	1Met-Ox
	1654,8760	26,1012	352-365	(K)LEEIALADDYFISR(K)	
	1712,8493	24,9276	189-203	(R)KGAPYMYPDNSLNAR(E)	
	1733,9459	32,0665	367-380	(K)LYPNVDFYTGILYR(A)	
	1862,0464	32,8589	366-380	(R)KLYPNVDFYTGILYR(A)	
	2302,2847	39,8195	331-351	(K)ETAHEILEHLGGDDLLDLAIK(L)	
	2420,2686	47,2267	42-64	(K)MLSETGLITFDPGYVSTGSTESK(I)	
	2945,5595	42,0913	14-41	(K)AVLHYPGGEFEMDIEASEGNNGVVLGK(M)	
	3662,0400	67,8891	79-111	(R)GYDIADLAENATFNEVSYLLINGELPTDELHK(F)	
	3662,0400	73,8378	136-168	(R)DAHPMATLASSVNILSTYYQDQLNPLDEAQLDK(A)	
26	SHMT (Cg1133)				46 %
	912,4109	-11,6747	62-69	(K)YAEYGPGR(R)	
	1232,7055	21,3989	177-187	(K)VIIAGWSAYPR(H)	
	1621,8660	47,1271	35-48	(R)DTLEMIASENFVPR(S)	
	1637,8638	48,4157	35-48	(R)DTLEMIASENFVPR(S)	1Met-Ox
	1741,9361	51,1241	146-160	(K)LYEVVAYGVDPETMR(V)	
	1757,9352	52,9881	146-160	(K)LYEVVAYGVDPETMR(V)	1Met-Ox
	1791,9979	54,7180	123-139	(K)IMGLSLAHGHHLTHGMK(L)	2Met-Ox
	1833,0121	51,1584	188-204	(R)HLDFAEFQSIAAEVGAK(L)	
	1854,0725	55,5096	357-373	(R)NAVFPDPRPPMVTSGLR(I)	
	1870,0681	55,3981	357-373	(R)NAVFPDPRPPMVTSGLR(I)	1Met-Ox
	1906,0490	52,3133	33-48	(R)QRTLEMIASENFVPR(S)	
	1914,9963	55,1256	71-86	(R)YGGCEQVDIIDLAR(D)	
	1922,0520	56,0869	33-48	(R)QRTLEMIASENFVPR(S)	1Met-Ox
	2092,2716	62,8015	314-334	(K)AAGVDVLTGGTDVHLVLADLR(N)	
	2109,2307	65,9748	257-277	(K)LNSSVFPGQQGGPLMHAVAAK(A)	
	2125,2327	68,8204	257-277	(K)LNSSVFPGQQGGPLMHAVAAK(A)	1Met-Ox
	2240,3075	67,4938	12-32	(R)YQPLNELDPEVAAAAGELAR(Q)	
	2454,3516	74,6891	335-356	(R)NSQMDGQQAEDLLHEVGITVNR(N)	
	2470,3585	79,0571	335-356	(R)NSQMDGQQAEDLLHEVGITVNR(N)	1Met-Ox
27	Pyruvatkinase (Cg2291)				40 %
	1047,6000	4,6965	341-349	(R)VPDLTHIPR(T)	
	1336,7829	14,9468	185-196	(K)LGVDFIALSFVR(S)	
	1356,6686	21,3832	95-106	(R)ITVDDVEGTHDR(V)	
	1695,8379	23,6459	80-94	(R)FTDGATVWENGETIR(I)	
	1695,8379	-41,1245	320-333	(K)DPHNVVRTMSRIVR(F)	1Met-Ox
	1821,0437	23,4674	245-261	(R)GDLGVEVPLEEVPLVQK(R)	
	1823,9858	24,8751	334-349	(R)FAETDGRVPDLTHIPR(T)	
	1937,9054	27,0171	36-51	(R)LNFSHGDPDHEQNYK(W)	
	1943,1306	22,5916	387-403	(R)LHSHPLLVFTPNFAVR(S)	
	2598,4824	23,3566	221-244	(K)LEKPEAVTSLEPIVLAFAVMMVAR(G)	
	2614,4817	24,9045	221-244	(K)LEKPEAVTSLEPIVLAFAVMMVAR(G)	1Met-Ox
	2716,4470	26,0476	269-292	(R)ENAKPVIVATQMLDSMIENSRPTR(A)	1Met-Ox
	2732,4763	38,4752	269-292	(R)ENAKPVIVATQMLDSMIENSRPTR(A)	2Met-Ox
	3394,7245	20,5110	293-326	(R)AEASDVANAVLDGADAVMLSGETSVGKDPHNVVR(T)	
	3410,8568	60,6829	293-326	(R)AEASDVANAVLDGADAVMLSGETSVGKDPHNVVR(T)	1Met-Ox
28	Malat-Chinon-Oxidoreduktase (Cg2192)				28 %
	1593,8029	16,8780	196-209	(K)QYLDAAEVEGTEIR(Y)	
	1606,9063	16,0698	365-377	(K)YLVTEVLKDQDKR(M)	

Fortsetzung Tabelle 7.1			
	1632,8664	17,0158	35-47 (R)QLEPSWTQIVFER(L)
	1645,8612	16,6379	477-490 (K)LASEPALFEQQWAR(T)
	1773,9537	14,0604	476-490 (K)KLASEPALFEQQWAR(T)
	2194,0139	12,0299	383-401 (R)EYMPEAQNGDWETIVAGQR(V)
	2210,0142	14,3869	383-401 (R)EYMPEAQNGDWETIVAGQR(V)
	2416,2630	13,6075	115-136 (K)EFINPVPHVSFGQADQVAYIK(A)
	2434,2832	8,7706	343-364 (K)SIRPDNIPSYLGVAAQEFDLTK(Y)
	2855,3576	3,0972	170-195 (K)GRDFSDPVAISWIDEGTDINYGAQTK(Q)
29	Glycyl-tRNA-Synthetase (Cg2499)		30 %
	1307,6127	-47,5347	196-206 (R)NEITPGNFIFR(T)
	1501,7491	-34,8755	445-457 (R)VPLDELQGYLAQR(L)
	1525,7999	-34,8420	316-329 (R)WIPFVIEPAAGLGR(A)
	1632,7201	-43,3975	266-279 (R)TVDIEYAFNFANTK(W)
	1729,7151	-38,7784	392-406 (R)EFWNVDYDTSGAIGR(R)
	2282,9067	-32,1718	296-315 (R)VHSESGEDLSFFDQETNER(W)
	2877,2524	-35,8628	112-138 (K)HGHPPVNGLADINDPETGQPGNWTEPK(A)
	3192,4817	-37,2384	146-173 (K)TFLGPVDDEGLHYRPETAQGIIVNFK(N)
30	Fumarase (Cg1145)		35 %
	1089,5877	16,8579	31-40 (R)AVENFPISGR(G)
	1101,5974	15,3520	22-30 (K)ALWQAQTOR(A)
	1195,6028	20,6608	268-278 (R)DALVEFSGAMR(V)
	1400,7861	20,6521	293-306 (R)LMGSGPLTGLGEIR(L)
	1416,7760	16,9204	293-306 (R)LMGSGPLTGLGEIR(L)
	2162,1239	24,7017	182-201 (R)THLMDAVPTLQGFEFGGYAR(Q)
	2178,1341	34,5588	182-201 (R)THLMDAVPTLQGFEFGGYAR(Q)
	2178,1341	13,7042	217-240 (R)LGELAIGGTAAGTGINTSADFGGK(V)
	2418,3147	30,7107	396-419 (R)QTVIDLGLVDGKLTTEEELDKR(L)
	2500,3709	22,5201	433-454 (K)ELAESSPSIVTPLNSAIGYEAARKVAK(T)
	3296,6902	46,1362	87-117 (K)HDAEFPIDVFQTGSGTSSNMNTNEVIASIAK(A)
31a	Amidotransferase für Asp/Glu, β-UE (Cg1420)		15 %
	1438,5699	-90,4827	248-259 (K)SVEQAIFEMQR(Q)
	1454,5718	-84,6267	248-259 (K)SVEQAIFEMQR(Q)
	1613,6887	-89,2721	298-311 (R)YFNPDPLPPVIAPR(E)
	1743,7089	-81,6810	260-275 (R)QAQVLDDGGVIDQETR(H)
	1975,8552	-83,4593	380-399 (K)ANESGVELDALGVAPAHVAR(V)
	2001,8592	-88,1814	220-237 (R)VDANLSLRPIGQEEFGTR(T)
31b	GroEL1 (Cg0693)		85 %
	997,4653	-20,3035	164-171 (K)SPYFGDRR(K)
	1227,6689	-9,8388	280-290 (K)LRVEDAINAAR(A)
	1286,5432	-8,4580	314-324 (K)AYAEFEFGDQK(V)
	1307,5838	-2,3179	238-248 (R)EIANSTDSTWDR(E)
	1411,7578	-5,6576	386-399 (K)VTHSAVVNATSVAR(M)
	1460,7212	-6,4768	41-54 (R)DEVVGEIVAAAMEK(V)
	1471,8360	-3,5606	113-125 (K)JSSLPDFLPLEK(V)
	1493,7800	-28,6923	159-171 (K)VVAVKSPYFGDRR(K)
	1507,7003	-86,4233	171-183 (R)RKAFMDDLAIVTK(A)
	1564,7155	-5,6559	238-250 (R)EIANSTDSTWDREK(A)
	1846,8757	4,6965	214-231 (K)DETIIVDGAGSAEDVEAR(R)
	2090,9753	-59,9958	1-19 (-)MELNKGISAAAEKLTLEELK(A)
	2154,1929	7,3750	291-313 (R)AAAQEGVIAGGGSALVQIAETLK(A)
	2375,2166	9,4308	209-231 (R)ITVSKDETIIVDGAGSAEDVEAR(R)
	2487,2943	23,1503	184-207 (K)ATVVDPEVGINLNEAGEEVFGTAR(R)
	2525,2418	-69,1160	258-281 (K)LSGGIAVIRVGAATETEVNDRKLR(V)
	2531,3194	9,5227	208-231 (R)RITVSKDETIIVDGAGSAEDVEAR(R)
	2531,3194	9,5527	209-232 (R)ITVSKDETIIVDGAGSAEDVEARR(G)
	2588,3482	9,3054	30-54 (K)EIANVATVSSRDEVVGEIVAAAMEK(V)
	2782,4159	22,8792	58-83 (K)DGVVTVEESQSIETALEVTEGISFDK(G)
	2874,4027	15,0906	400-426 (R)MVLTTASVVEKPAEEAADAHAGHHHH(-)
	3035,5779	9,9124	84-110 (K)GYLSPYFINDNDTQQAVLDNPAVLLVR(N)
	3073,6181	22,7501	356-385 (R)TAALPNGEGFNAATLEYGNLINDGVDPVK(V)
	3202,8298	19,0680	126-154 (K)VVESNRPLLIAEDVEGEPLQLTVNSIR(K)
32	hypothetisches Protein (0783)		45 %
	1255,7229	37,4352	197-208 (R)IQEAQAAVQAAR(E)
	1279,7432	29,7745	252-263 (R)TYLGGQPVFLGK(F)
	1317,6978	37,8307	264-274 (K)FGEIFTFNSQK(S)
	1452,7718	51,4701	184-196 (K)EVNSLFTEDAATR(I)
	1505,7941	53,3862	279-290 (R)WLVEHDDHDLAR(A)
	1763,9441	68,4427	324-339 (K)DINTSVDAVDTQQMAR(A)
	1779,9483	73,0182	324-339 (K)DINTSVDAVDTQQMAR(A)
	1929,0907	78,4155	222-239 (K)VDPYDNPWAAAGIDPIK(V)
	1990,0577	76,4994	145-163 (R)GSEHYSGPNGLGEWTSVGR(A)
	2086,2369	74,2263	164-183 (R)AVATNWNGVVDALDEAIVK(E)
	2892,8363	99,9862	81-108 (R)VVPDANAELDIIGAPALLADRPYANVK(T)
	3014,5809	111,0931	340-365 (R)AYELMADTADWADDDSMNSYFLANPR(M)

Fortsetzung Tabelle 7.1

33	DnaK (Cg3100)				34 %
	1240,8446	115,4218	132-143	(K)EAGQIAGLNVLR(I)	
	1294,7876	114,6731	511-521	(R)NNAESLVYQTR(K)	
	1498,0138	114,0934	427-441	(K)LLGSFELGGIAPAPR(G)	
	1735,9058	109,3646	192-207	(R)ATSGDNELGGDDWDQR(I)	
	1935,2783	109,5466	338-357	(K)GVNPDEVVAVGAALQAGVLR(G)	
	1997,2344	102,1689	299-318	(K)DAGVSVSEIDHVVLVGGSTR(M)	
	2091,1952	100,8964	470-488	(K)ENTITIQDGSGLSQDEIDR(M)	
	2606,5018	97,1126	72-94	(R)HIGTDWVAIDDKNYTSQEISAR(T)	
	2611,5006	104,5460	397-419	(R)SETFTTAEDNQPSVQIQVFQGER(E)	
	2874,6012	93,6063	102-127	(R)DAEAYLGEDVTDAVITVPAYFEDSQR(Q)	
	3010,8545	94,6066	4-34	(R)AVGIDLGTTNSVSVLEGGEPPVIANAEGRS(T)	
34a	GroEL2 (Cg3011)				39 %
	1063,4931	-46,3364	4-12	(K)IIAFDEEAR(R)	
	1219,5899	-43,9782	4-13	(K)IIAFDEEARR(G)	
	1509,6143	-35,8238	201-213	(K)GYISGYFATDMER(L)	
	1525,6048	-38,3673	201-213	(K)GYISGYFATDMER(L)	1Met-Ox
	1552,7697	-41,0704	456-471	(K)QIAANAGLEPGVVADK(V)	
	1642,7936	-37,5819	42-57	(K)AWGAPTITNDGVTIAR(E)	
	1698,6893	-33,2748	354-367	(R)VEIENSDDSDYDREK(L)	
	1758,9232	-37,6219	214-229	(R)LEAVLEDPYILLVSGK(I)	
	1833,7892	-31,3413	331-348	(K)DDTTIVDGAGSEAQIEGR(V)	
	2074,9885	-35,4600	80-100	(K)TDDVAGDGTATTATVLAQALVR(E)	
	2203,0795	-35,1984	79-100	(K)KTDDVAGDGTATTATVLAQALVR(E)	
	2654,2759	-28,8375	136-162	(K)EVETEEQIAATAGISAADPAIGAQIAK(A)	
	3070,4117	-33,8035	472-501	(K)VSQLPQGEGLNAANGEYVDLMAAGINDPVK(V)	
	3086,4511	-19,2346	472-501	(K)VSQLPQGEGLNAANGEYVDLMAAGINDPVK(V)	1Met-Ox
	3616,6941	-41,9474	408-444	(K)AAVEEGIVAGGGVALLQAAHVLDNDLELSGDEA TGVR(I)	
34b	Methionyl-tRNA-Synthetase (Cg1017)				11 %
	1173,3137	-211,0555	111-120	(R)GLYDNGYMIK(E)	
	1851,8396	-19,9244	594-610	(K)LDPELGETGPEWAPVQN(-)	
	2606,0861	-37,5548	373-394	(R)YFIAVAGPENNDTDFTWDEFVR(R)	
	2612,0726	-70,5048	229-251	(R)AMSRDIDWGIPIPEVGWQDNNAK(K)	
35	Glycerolkinase (Cg3198)				18 %
	1638,6730	-82,8525	6-21	(K)ANAYVAAIDQGTSTR(A)	
	1838,7123	-53,0414	495-509	(R)YAEWNRAVEHSYDQA(-)	
	1930,7640	-119,5600	274-291	(K)NTYGTGLFLLMNTGTSLK(I)	
	2210,8531	-120,6426	347-367	(R)EVEDNGGVHVVPFTGLFAPR(W)	
	2285,8742	-127,5557	445-467	(R)LEVDVETAVGVAAGLGSGFFK(T)	
36	F₀F₁-ATP-Synthase, α-UE (Cg1366)				46 %
	1367,8618	52,6004	131-142	(R)VLELQAPTTLER(Q)	
	1402,8999	49,1190	74-86	(R)VGVVVLGNLYELLK(E)	
	1410,8929	53,0067	363-376	(R)GVRPAINVGVSVSR(V)	
	1553,8435	67,3383	295-307	(R)EAYPGDVLYLHRSR(L)	
	1630,9994	72,9503	94-109	(R)TGDVLSIPVGEAFLGR(V)	
	1977,8918	71,3789	13-28	(R)SAIANYTSSYSAEASR(E)	
	1771,9686	73,1096	402-418	(R)DLEAFATFASDLDAASK(S)	
	1787,1105	72,1290	93-109	(R)RTGVDVLSIPVGEAFLGR(V)	
	1928,2143	80,4601	315-333	(K)LSDELGAGSITALPIIETK(A)	
	2222,3308	90,1511	110-130	(R)VINPLGQPIDGLGEIASEEDR(V)	
	2553,5404	104,9385	222-246	(K)TLEEQGALEYTTIVAAPASDAAGFK(W)	
	2716,6330	110,9164	509-534	(K)SAFQTTDGTVPINEPEVEALDAGQVK(K)	
	3182,9560	111,5596	334-362	(K)ANDVSAFIPTNVISITDQVFLSDFLNR(G)	
	3370,9867	123,1741	467-497	(R)FESELHEYLGSNAAQVYEQIAGGAQLSDESK(E)	
	3527,0805	115,6399	466-497	(R)RFESSELHEYLGSNAAQVYEQIAGGAQLSDESK(E)	
	3571,3455	124,2315	110-142	(R)VINPLGQPIDGLGEIASEEDRVLELQAPTTLER(Q)	
37	CTP-Synthase (Cg1606)				30 %
	1009,3953	-89,3886	327-335	(R)AAGYANWTR(T)	
	1143,5169	-86,8704	267-275	(R)EHLDTFIIR(R)	
	1236,6655	-82,8531	213-224	(R)GIGILPDALVLR(C)	
	1321,5285	-84,4539	477-486	(R)HRYEVNNAYR(A)	
	1492,7177	-80,2936	119-131	(K)TVQVIPHITDEIK(A)	
	1641,8139	-72,3968	355-371	(K)ALSGDLAIVVPGGFGIR(G)	
	1971,6553	-72,6352	283-295	(R)DVDWSTWHDLLER(V)	
	1722,8182	-73,2394	531-545	(K)SRPTHAPLIFYGLVK(T)	
	1881,8141	-72,1960	515-530	(K)EVHPYLVATQAHPYK(S)	
	2976,2408	-46,2460	407-434	(R)QAGLEQASSTEFDPATQPVIATMEEQK(A)	pyro-Glu, 1Met-Ox
	2992,2657	-64,2654	487-514	(R)AIQIAEGSDLVFSGTSPDGHVFEVPEPK(E)	
38	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase (Cg2166)				17 %
	1268,7058	-21,1835	156-169	(R)ISGLPVSGAVGGVR(M)	
	1799,8534	2,3384	68-82	(R)EGDFDFPLTVDEER(M)	
	1957,0935	1,2149	463-479	(R)AVLPVIPSREEFPYAIR(Q)	

Fortsetzung Tabelle 7.1				
	2056,8982	0,3208	429-445	(R)YMHYHNFPPYSTGETGR(V)
	2072,9255	15,9488	429-445	(R)YMHYHNFPPYSTGETGR(V) 1Met-Ox
	2159,0578	11,1617	278-295	(K)EFPLFPPTYDEVYSAVER(K)
	2869,3981	15,8805	41-67	(R)QADGAVTTYLDDDTMLLATTTASNQPR(E)
	2885,4202	25,2036	41-67	(R)QADGAVTTYLDDDTMLLATTTASNQPR(E) 1Met-Ox
	2908,4319	-15,5999	210-236	(K)RGNKTFSDVAVMMVEAGASENVVNRVK(D)
39	ClpB (Cg3079)			42 %
	969,4750	75,1610	554-561	(K)MMQGETEK(L) 1Met-Ox
	996,5508	49,4280	359-366	(R)YEVHHGVR(I)
	1091,6397	60,4294	748-756	(R)LDDVVIFDR(L)
	1104,6685	57,1803	505-513	(R)YGRIPLEK(Q)
	1238,7263	73,2656	738-747	(K)MAFKPEFVNR(L)
	1254,7189	70,4381	738-747	(K)MAFKPEFVNR(L) 1Met-Ox
	1363,7938	129,1368	74-86	(K)ASGANMANPNFNR(D)
	1364,8582	76,5372	312-323	(R)LVGATTLNEYRK(Y)
	1364,8582	121,6333	702-713	(R)LTDGQGRTVDFR(N)
	1379,7281	83,7312	74-86	(K)ASGANMANPNFNR(D) 1Met-Ox
	1475,8897	51,0478	237-251	(K)TLISLDLGSMMVAGAK(Y)
	1557,9803	100,5357	367-381	(R)IQDSALVAAELSNR(Y)
	1568,8508	99,9032	486-499	(R)SESDIAERDGNVGR(V)
	1595,0103	101,6881	672-684	(R)RPYTVVLFDEVEK(A)
	1601,0608	99,0624	714-729	(R)NTILITSLNLAGGTR(E)
	1614,0506	101,8347	573-588	(R)VVGQLEAVTAVSDAVR(R)
	1624,9996	102,2514	131-145	(K)GATYDAIKEAFPSVR(G)
	1691,0052	104,3233	150-164	(R)VTTQDPEGQFQALEK(Y)
	1751,1270	101,5483	671-684	(R)RRPYTVVLFDEVEK(Y)
	1760,1043	102,9705	387-402	(R)FLPKAIDLVDAAASR(L)
	1770,1659	100,8423	573-589	(R)VVGQLEAVTAVSDAVRR(S)
	1785,0652	112,6619	620-634	(K)AVAEFLDDDRAMIR(I)
	2015,2310	112,3984	831-850	(R)DGDGVLVDVADGGQKLDVSR(A) 1Met-Ox
	2076,2371	118,1059	403-419	(R)LRMEIDSSPQEIDELER(I) 1Met-Ox
	2134,3581	112,3104	335-353	(R)FQQVYVGTEPTVEDAIGLR(G)
	2247,4265	127,0816	649-670	(R)LVGAPPYVGYDQGGQLTEAVR(R)
	2258,4682	121,7232	592-614	(R)AGVADPNRPTGSFLFLGPTGVGK(T)
	2297,4772	89,4859	757-776	(R)LSPEQLTSIVDIQIKQLTDR(L)
	2297,4772	132,1174	823-845	(K)ELLAGNVRDGDGVLVDVADGGQK(L)
	2403,5410	124,3867	649-671	(R)LVGAPPYVGYDQGGQLTEAVRR(R)
	2501,5815	101,9443	590-614	(R)SRAGVADPNRPTGSFLFLGPTGVGK(T)
40	EF-G (Cg0583)			49 %
	1096,5907	-22,6589	32-40	(R)ILFYTGINR(K)
	1443,6692	-12,2016	112-123	(K)EGVEPQSEQVWR(Q)
	1455,7132	-16,4257	233-245	(K)YFGGEELSIAEIK(A)
	1581,7824	-17,3973	660-673	(K)VPLSQMFGYVGDRL(S)
	1597,7736	-19,5418	660-673	(K)VPLSQMFGYVGDRL(S) 1Met-Ox
	1703,8051	-13,5007	142-156	(K)LGADFYFTVGTIEDR(L)
	1835,9104	-20,3785	124-138	(R)QATKYDVPRICFVNK(M)
	1835,9104	-10,2329	472-487	(R)EFKVEANIGDPQVAYR(E)
	2042,0480	-11,3341	367-385	(K)ENPVEVAHAGNIYAFIGLK(D)
	2198,0777	-14,2763	190-210	(R)GVTPIGTEATVEEIPAEADR(A)
	2275,9779	-4,8621	42-61	(K)VGETHDGGATTDWMEQEKER(G)
	2615,2711	-15,0893	100-123	(R)VLDGAVAVFDGKEGVEPQSEQVWR(Q)
	2679,3241	-51,0480	268-292	(K)NKGIQPLLDVAVDFLPSPLDLGETK(G)
	2679,3241	-1,9250	514-537	(K)VIITIEPYAPEADELEEGESAIFY(F)
	2702,2336	-16,1317	680-704	(R)ANYSMVFDSDYAEVPANVAADVIAER(N)
	2718,2521	-7,3837	680-704	(R)ANYSMVFDSDYAEVPANVAADVIAER(N) 1Met-Ox
	3058,5014	-27,1712	157-184	(R)LGAKPLVMQLPIGAEDNFDGVIDLLEMK(A)
	3058,5014	-7,2648	550-577	(R)EYIPSVDAIQDAMQYGLAGYPLNVNK(A) 2Met-Ox
	3074,5226	1,3214	550-577	(R)EYIPSVDAIQDAMQYGLAGYPLNVNK(A) 1Met-Ox
	3416,6800	-15,6089	610-640	(K)AKPVLLEPIMSVEITTPPEEYMGVEIGDVNSR(R)
	3432,7100	-5,3247	610-640	(K)AKPVLLEPIMSVEITTPPEEYMGVEIGDVNSR(R) 1Met-Ox
	3448,6767	-13,4620	610-640	(K)AKPVLLEPIMSVEITTPPEEYMGVEIGDVNSR(R) 2Met-Ox
	3610,6767	-60,6335	354-385	(K)ERIGKLFQMHANKENPVEVAHAGNIYAFIGLK(D) 1Met-Ox
	3610,6767	-28,7304	514-546	(K)VIITIEPYAPEADELEEGESAIFYKFENAVTGGR(V)
41	ClpC (Cg2963)			24 %
	1071,3259	-149,3444	280-287	(R)YRGDFEER(L)
	1127,4871	-137,7273	12-21	(R)VIVLAQEEAR(M)
	1215,4777	-132,4054	726-734	(K)HFRPEFLNR(I)
	1222,4816	-132,1509	185-195	(R)STSLVLDQFGR(N)
	1283,5778	-129,1147	11-21	(R)RVIVLAQEEAR(M)
	1441,6180	-130,0452	735-746	(R)IDEIVVFHQLTK(D)
	1515,6358	-121,8343	747-759	(K)DQIVQMVDLLIGR(V) 1Met-Ox
	1563,6498	-114,1778	563-578	(K)RPSGSFIFAGPSGVGK(T)
	1564,6492	-117,7841	265-279	(K)QVYSLDLGSLVAGSR(Y)
	1672,7010	-111,1591	391-407	(R)VSITDGALTAAQLADR(Y)
	1729,7199	-111,3288	413-428	(R)FLPKAVDLIDEAGAR(M)

Fortsetzung Tabelle 7.1

	1793,7696	-108,8464	678-694	(K)NTVLIFTSNLGTADISK(A)	
	1794,7340	-105,7288	334-349	(R)GELQTIGATTLDEYRK(H)	
	2061,6904	-101,7378	695-714	(K)AVGLGFSGSSETDSDAQYDR(M)	
	2111,8244	-96,8370	613-632	(R)LFGAPPGYVGYEEGGQLTEK(V)	
	2504,0058	-94,3952	61-83	(R)QEVEEIIIGQGPTTGHPFTPR(A)	pyro-Glu
	2521,0374	-91,7369	61-83	(R)QEVEEIIIGQGPTTGHPFTPR(A)	
42	Pyruvatdehydrogenase, E1-UE (Cg2466)				52 %
	1097,5983	27,7729	109-117	(R)WNAAIMVHR(A)	
	1122,6815	26,0147	543-552	(R)LVPIIPDEAR(T)	
	1206,6003	-85,3095	57-65	(R)YLMRLLLER(A)	
	1206,6003	28,7893	417-427	(K)GYGLGHNFEGR(N)	
	1264,6987	35,5234	771-782	(K)AASILEADYGV(R)	
	1281,7247	31,5320	298-307	(K)IIQELSESFFR(G)	
	1363,8541	35,1777	405-416	(K)DRPTVILAHTIK(G)	
	1411,7705	31,4269	553-564	(R)TFGLDSWFPTLK(I)	
	1492,7430	38,5788	635-648	(R)TGDSIWAADQMAR(G)	
	1565,8743	42,5729	783-796	(R)ANIYATSWVNLAR(D)	
	1607,8554	43,6556	7-21	(K)LGGKPSDDSNFAMIR(D)	
	1618,8667	36,4536	808-823	(R)NPGADAGEAFVTTQLK(Q)	
	1623,8496	42,7947	7-21	(K)LGGKPSDDSNFAMIR(D)	1Met-Ox
	1634,8425	41,3594	194-208	(R)EQGGIPSYPHPHGMK(D)	
	1634,8425	-49,1957	538-552	(K)GLADRLVPIIPDEAR(T)	
	1650,8353	39,6722	194-208	(R)EQGGIPSYPHPHGMK(D)	1Met-Ox
	1676,8642	-28,3531	513-528	(R)KSGSKQIATTMATVR(T)	
	1765,9024	37,7887	179-193	(R)LEDLDDGFRQEVSR(E)	
	2226,1959	44,0935	749-770	(R)GEGTGHEANILASGVGMQWALK(A)	
	2278,1963	11,8630	783-803	(R)ANIYATSWVNLARDGAARNK(A)	
	2278,1963	42,6283	824-844	(K)QTSGPYVAVSDFSTDLPNQIR(E)	pyro-Glu
	2295,2243	-14,3744	494-512	(R)RENYDPIQVPLDKLRVR(K)	
	2295,2243	42,9739	824-844	(K)QTSGPYVAVSDFSTDLPNQIR(E)	
	2345,1718	51,0123	151-172	(K)DHPGGGDQIFFQGHASPGMYAR(A)	
	2384,0958	-61,7285	518-537	(K)QIATTMATVRTFKELMRDK(G)	1Met-Ox
	2521,1661	42,9514	242-263	(K)DTSQHVWAFLDGDEMDEPESR(G)	
	2530,2702	40,1380	149-172	(R)GKDHPGGGDQIFFQGHASPGMYAR(A)	
	2531,3076	52,8019	209-230	(K)DFWEFPTVSMGLGPMDAIYQAR(F)	
	2531,3076	36,9094	565-585	(K)IYNPHGQNYVPVDHDLMLSYR(E)	
	2537,1810	50,5738	242-263	(K)DTSQHVWAFLDGDEMDEPESR(G)	1Met-Ox
	2546,2761	44,2007	149-172	(R)GKDHPGGGDQIFFQGHASPGMYAR(A)	1Met-Ox
	2547,2880	46,7736	209-230	(K)DFWEFPTVSMGLGPMDAIYQAR(F)	1Met-Ox
	2547,2880	30,9809	565-585	(K)IYNPHGQNYVPVDHDLMLSYR(E)	
	2563,2953	51,3348	209-230	(K)DFWEFPTVSMGLGPMDAIYQAR(F)	2Met-Ox
	2684,3880	42,2982	845-869	(R)EWVPGDYTVLGADGFGFSDTRPAAR(R)	
	3312,7933	54,2160	586-618	(R)EAPEGQILHEGINEAGSVASFIAAGTSYATHGK(A)	
	2452,9052	62,2768	448-477	(K)QGIPITDEQLEKDPYLPYYHPGEDAPEIK(Y)	
	3486,8607	47,3308	711-741	(K)GEDVIYYITIYNEPTPQPAEPEGLDVEGLHK(G)	

Tabelle 7.2 Peptidmassenfingerprint-Analyse von Proteinen, die mit ClpP2 co-gereinigt und über zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt wurden. Die Nummerierung bezieht sich auf die Proteinspots der Abbildung 4.19 und gibt die jeweils beste Bestimmung der Tabelle 4.2 wieder. Die Δ ppm-Werte geben die Abweichung der experimentell bestimmten zu den berechnenden monoisotopischen Massen an.

Nr:	Protein (Datenbanknummer)				Sequenz-abdeckung
	m/z	Δ ppm	Position	Zugeordnetes Peptid	Modifikation
1	Dps (Cg3327)				44 %
	1135,5949	-46,3168	112-121	(R)VYTQVLTGVR(E)	
	1522,7150	-37,8511	98-111	(R)NAGNVQAHLTDLNR(V)	
	1833,8901	-30,4140	72-90	(R)ISTLGGAPVGTPEGHVADR(T)	
	2704,9665	-130,8381	1-24	(-)MANYTVPGINENDAKQLIDGLQER(L)	1Met-Ox
	2721,3226	-26,9745	72-97	(R)ISTLGGAPVGTPEGHVADRTPQLQYER(N)	
2	Thioesterase (Cg2692)				55 %
	1044,5520	3,9889	67-74	(R)HLEVDYLR(A)	
	1096,5468	3,6925	46-54	(R)LAFAEDQFR(E)	
	1150,6267	0,5851	57-66	(R)GYEIPAVFVR(H)	
	1381,6819	-3,2607	46-56	(R)LAFAEDQFRER(G)	
	1435,7694	-0,2918	55-66	(R)ERGYEIPAVFVR(H)	
	1813,9758	-8,4523	75-91	(R)AILPDDTQAVVETQVTK(I)	
	1886,9335	-9,4620	29-45	(R)FGHVNNAAFFIEIAQEAR(L)	
	1930,9936	-1,9177	138-155	(K)VLTAVATDEVQSQAELAK(-)	
	2677,2489	-15,7974	23-45	(R)WADFDRFGHVNNAAFFIEIAQEAR(L)	
3	Ribosomales Protein L10 (Cg0572)				28 %
	1372,6932	-29,5234	147-160	(K)AAGLFNAPASQVAR(L)	
	1543,7231	-43,5159	1-14	(-)MANPRNEAALAEK(A)	1Met-Ox
	1543,7231	-26,7799	17-29	(R)FAETDTVVLTETGR(G)	
	2210,9794	-111,0394	147-168	(K)AAGLFNAPASQVARLAVALQDK(K)	
4	Ribosomenassoziiertes Protein Y (Cg0867)				32 %
	1312,6318	2,4394	22-32	(R)NVEVPDHFAR(V)	
	1408,6816	4,7771	209-221	(R)HAFDYGLISLSDA(-)	
	1754,8804	-1,2502	22-36	(R)NVEVPDHFARVNTK(L)	
	1983,0117	-1,5010	120-139	(R)APLGTGEVGAQLVAESQEAR(G)	
	2158,0964	-1,2666	1-21	(-)TTPAENNTLSPETKVSITGR(N)	Acet-N
	2420,2359	3,1883	116-139	(R)APLGTGEVGAQLVAESQEAR(G)	
5	SufC, FeS-Cluster-Maturase (Cg1762)				40 %
	1272,6531	-13,3412	50-61	(K)STLAYTLGGHPR(Y)	
	1588,9268	-17,0360	158-170	(K)RHEVLQLDLLKPK(F)	
	1661,7715	-25,2612	131-145	(R)TAQEALAIPEFSNR(S)	
	1867,8205	-29,0357	171-187	(K)FAIMDETDSGLDVDALR(I)	
	2218,1180	-24,3360	8-27	(R)NLHAQVLPSESAEPKEILK(G)	
	2866,3803	0,7774	62-86	(R)YEVTAGEVLLDGENILEMEVDERAR(A)	1Met-Ox
6	Transkriptionsregulator für Zuckerkinasen (Cg2091)				33 %
	1420,6822	-43,2364	20-31	(R)VNLKTGEFIDER(I)	
	1549,7702	-67,1371	197-211	(K)LFSPSVFIIGGGISR(K)	
	1549,7702	-29,6082	235-250	(R)AGIVGAAMAVNQHLTP(-)	
	2010,9704	-43,2692	216-232	(K)WLPLMELDTDIVPAELR(N)	
	2387,0660	-49,5727	102-125	(R)EITVLNDADAAGIAEATFGNPAAR(E)	
7	putative Dehydrogenase (Cg2958)				43 %
	1216,6481	0,7011	4-16	(K)VAMVTGGAQGIGR(G)	
	1216,6481	-17,2013	202-212	(K)INGKPIGENFK(E)	
	1297,7147	2,4024	163-175	(R)GLTQAAAQELAPK(G)	
	1380,6379	6,9394	66-78	(K)ANFDSAIDEAAEK(L)	
	2525,2434	0,8980	55-78	(K)AVFVGLDVTDKANFDSAIDEAAEK(L)	
	2643,3223	2,6149	22-46	(K)LAADGFDIAVADLPQQEEQAETIK(L)	
	2744,3318	-1,3230	176-201	(K)GHTVNAYAPGIVGTGMWEQIDAELSK(I)	
	2760,3374	2,5716	176-201	(K)GHTVNAYAPGIVGTGMWEQIDAELSK(I)	1Met-Ox
8	Phospho-/Hydroxymethyl-Pyrimidinkinase (Cg3409)				18 %
	1509,7900	-35,0540	165-177	(R)LIHEQGPQYVVVK(G)	
	1514,7051	-26,3671	113-127	(K)GQEPGAALDTDALR(A)	
	2333,1309	-20,0748	245-266	(R)AVKDAVASNAPFTSVWLAEDNK(-)	
9	Hydrolase der HAD-Superfamilie (Cg2902)				15 %
	1346,6613	-69,1754	113-124	(R)GFREASKPVLRSR(L)	
	1571,7214	-51,8772	245-260	(K)AAADLVTDVAGQDGLR(N)	
	1741,7445	-54,6750	154-168	(K)ISYIFNSQEDLDAAR(E)	
10	Cysteinsynthase (Cg2833)				58 %
	1336,7021	-6,8213	288-299	(K)TIVTVWTFGER(Y)	
	1472,7176	-6,6143	300-311	(R)YVSTVLYEDIRD(-)	
	1641,8876	-5,3530	221-235	(K)IQGIGANFIPEVLDR(K)	
	1769,9849	-3,6645	221-236	(K)IQGIGANFIPEVLDRK(V)	

Fortsetzung Tabelle 7.2

	1804,9175	-5,1027	109-127	(R)AYGAEIVLTPGAAGMQGAK(D)	
	1840,8464	-5,9656	88-103	(R)GYNVVLTMPETMSNER(R)	
	1963,9848	-6,5394	237-254	(K)VLDDVLTVSNEAIAFSR(K)	
	1996,9510	-3,7261	88-104	(R)GYNVVLTMPETMSNERR(V)	
	2092,0804	-5,8604	236-254	(R)KVLDVLTVSNEAIAFSR(K)	
	2092,0804	-5,8604	237-255	(K)VLDDVLTVSNEAIAFSR(K)	
	2445,2338	-36,9387	23-45	(K)LTEGLDATVLKLEFNPANSVK(D)	
	2445,2338	7,7005	193-215	(K)ENNADVQVYVTEPEASPLLTAGK(D)	
	2670,4230	-0,7158	59-87	(K)SGALKPGGTIVEATSGNTGIALAMVGAAR(G)	
	2686,4417	8,1636	59-87	(K)SGALKPGGTIVEATSGNTGIALAMVGAAR(G)	1Met-Ox
	2686,4417	0,0556	274-299	(K)AALDLAAKPENAGKTIVTVVDFGER(Y)	
11	Dehydrogenase für Kurzkettenmoleküle (Cg2342)				37 %
	1281,6575	-10,0496	248-259	(K)IEFGQGHAPIGR(A)	
	1735,8390	-12,9827	31-47	(K)LSPQADIGLSSYQSGSR(L)	
	2032,9330	-6,5777	73-91	(R)EGADVAIAYLPEEQADADR(V)	
	2501,2495	-3,2875	225-247	(R)VNSVAPGPFWTPLQPSHGQPQEK(I)	
	3229,5837	-0,8427	73-102	(R)EGADVAIAYLPEEQADADRVLQAIEETGQK(A)	
	3241,6044	7,3405	140-167	(R)QVWAPGLTEITDENFDQTLQVNLVGSFR(V)	
12	Homoserinkinase (Cg1338)				19 %
	1350,7270	-8,2322	196-207	(R)VLPTEVTHIDAR(F)	
	1513,7890	-8,2660	241-253	(R)AEVLPITSEWVNR(L)	
	1683,8911	5,5095	179-194	(R)ATALVPNFHASTEAVR(R)	
	1839,9683	-7,9570	179-195	(R)ATALVPNFHASTEAVRR(V)	
	1927,9857	-1,0645	162-178	(K)SQPQYAAVPLEVQDNIR(A)	
13	ATP-Phosphoribosyl-Transferase (Cg1698)				27 %
	1774,9012	-24,7468	112-127	(R)IATSYPNLVRDDLAAR(G)	
	2151,9713	-27,7602	74-93	(R)DSQADVHEVLSLFGSSSTFR(Y)	
	2223,0911	-31,9496	219-241	(R)DNLDAATAVTPGLSGPTVSPLAR(D)	
	2286,0545	-44,3585	33-51	(K)SLNVFDEANNVEFFLRPK(D)	
14	Shikimat-5-Dehydrogenase (Cg1283)				31 %
	1395,7678	-20,1869	42-56	(K)JAVAPADITAAVAGIT(G)	
	1615,6977	-18,7831	165-178	(R)YGWSEYATVPEDAK(I)	
	1790,8797	-27,4447	71-86	(K)SDVIPLIDELHPSAER(I)	
	2681,2850	-28,2832	62-86	(R)GAGVSMYPKSDVIPLIDELHPSAER(I)	
	3443,5442	-34,2204	89-118	(R)SVNTIVNNDGHLVGYNTRYTAVYHLEEHR(V)	
15	UspA, generelles Stressprotein (Cg3255)				25 %
	1922,0082	-0,6891	249-267	(R)ALAEASENAQLLVGSHGR(G)	
	2929,3581	-9,3784	154-181	(K)YGPVVVGVDGSEVSQQATEYAFAEAEAR(G)	
	3072,5125	8,0490	86-114	(K)IGHTIAEGSPIDMLLEMSPDATMIVMGSR(G)	
16	Fruktose-7-Tagatosebisphosphat-Aldolase (Cg3068)				15 %
	1607,9483	15,5526	222-235	(K)LRPEVLLEGQQVAR(K)	
	2030,0746	-8,6949	100-116	(K)EVLDEYVRPLLAIQER(V)	
	2527,2736	21,0473	176-189	(K)AGANLYTSPEDFEKTIDAIGTGEK(G)	
17	RecA (Cg2141)				13 %
	1600,7909	14,2406	269-282	(K)IAEFDIMYEGGISR(E)	
	2031,0154	34,1864	299-316	(K)SGSWFTYEQEQLGQGEK(V)	
	2073,0454	19,9128	98-117	(K)AGGIAAFIDAETHALDPDYAR(K)	
18	Fruktose-1,6-bisphosphatase (Cg1157)				17 %
	1525,7060	23,1150	118-130	(R)GTMYDPSSVFYMK(K)	
	1653,8120	27,9972	118-131	(R)GTMYDPSSVFYMKK(I)	
	1674,9158	-1,2436	142-157	(K)IDIEAPVAHNINAVAK(S)	
	1736,9799	8,0475	160-175	(K)GINPSDVTVVVLDPRR(H)	
	1952,1067	7,0697	158-175	(K)SKGINPSDVTVVVLDPRR(H)	
	2568,3829	-12,4995	132-157	(K)IAVGPEAAGKIDIEAPVAHNINAVAK(S)	
19	EF-Tu (Cg0587)				55 %
	1413,7589	-62,3106	127-139	(R)QVGVVPYILVALNK(C)	
	1429,6195	-56,1154	253-265	(K)STSTTVTGIEFMR(K)	
	1557,7087	-55,1723	253-266	(K)STSTTVTGIEFMR(L)	
	1585,7447	-62,4519	236-250	(R)GTLNVNDDVDIIGIK(E)	
	1693,7105	-57,9816	78-92	(R)HYAHVDAPGHADYIK(N)	
	1731,7933	-56,8163	62-76	(R)GITINISHVEYQTEK(R)	
	1809,8636	-60,1335	9-25	(R)TKPHVNIPTIGHVDHGK(T)	
	1842,8709	-59,9041	236-252	(R)GTLNVNDDVDIIGIKEK(S)	
	1887,8844	-57,4561	62-77	(R)GITINISHVEYQTEK(R)	
	2034,8410	-59,1898	322-336	(R)HTPFDNYRPFQFYFR(T)	
	2383,0481	-65,1326	158-178	(R)ELLAEQDYDEEAPIVHISALK(A)	
	1706,2263	-69,4717	292-316	(R)GQVIVKPGAYTPHTEFEGSVYVLSK(D)	
	2812,1586	-70,5246	35-59	(K)VLADTYPELNEAFKSDIDKAPEEK(E)	
	3125,3157	-75,9239	158-185	(R)ELLAEQDYDEEAPIVHISALKALEGDEK(W)	
	3220,4154	-65,9657	292-321	(R)GQVIVKPGAYTPHTEFEGSVYVLSKDEGGR(H)	
	3344,3952	-57,8352	346-376	(K)LPEGTEMVMPGDNDMSVTLIQPVAMDEGLR(F)	
20	Carbamoylphosphat-Synthase, kleine Kette (Cg1814)				31 %
	1026,5011	-141,4998	91-99	(K)IIVVAGLVIR(D)	
	1558,6265	-134,9375	220-233	(R)TVIVPAETPFEDIK(Q)	

Fortsetzung Tabelle 7.2					
	2302,8713	-128,1664	110-132	(R)ATTSLQQEMAGQGIVGIGGIDTR(A)	
	2318,8937	-115,4461	110-132	(R)ATTSLQQEMAGQGIVGIGGIDTR(A)	1Met-Ox
	2513,8822	-120,8773	65-87	(R)QIVVATAPQIGNTGWNEDESNESR(D)	
	2525,9607	-123,5357	4-27	(K)DTTTYQGVTEIGSVPAYLVADGR(T)	
	3109,0873	-109,3104	167-195	(K)NQPAMTGANLSVESADETYVIEAEGER(H)	
21a	Zn-abhängige Alkoholdehydrogenase (Cg0387)				12 %
	1237,5213	-110,5404	334-343	(R)FLPDKFVSR(I)	
	1251,4990	-110,5750	294-304	(R)VDVPAIDFYGR(G)	
	2432,9094	-100,2649	222-246	(K)EFGATHINSSGLGEGDASEVVAK(V)	
21b	Myoinositol-1-Phosphat-Synthase (Cg3323)				43 %
	1190,5057	-114,5674	354-363	(R)ERLEAFIIEA(-)	
	1300,4791	-114,9091	96-107	(R)GPTLDGLGDHYR(A)	
	1323,5017	-115,3983	342-353	(K)SPPEQLPDDVAR(E)	
	1395,6344	-115,7481	83-95	(K)IADVPQTGINVLR(G)	
	1608,6017	-122,1537	342-355	(K)SPPEQLPDDVARER(L)	
	1707,5844	-182,2813	285-300	(R)LEGTAFGGVPLNLEYK(L)	
	1887,6800	-121,9511	263-278	(R)NVHIGPSDHVQWLDDR(K)	
	1654,7788	-125,3144	301-318	(K)LEVWDSPNSAGIIDAVR(A)	
	2015,7685	-117,3731	263-279	(R)NVHIGPSDHVQWLDDR(W)	
	2083,8061	-79,9434	215-232	(R)TMQLNVGGNMDFKNMLDR(N)	
	2083,8061	-122,9622	243-262	(K)TQAVTSNIPDGPLSGKVEDR(N)	
	2525,0508	-113,0931	176-199	(K)FTDAGIOIVGDDIKSQIGATITHR(V)	
22	DNA-abhängige RNA-Polymerase, α-UE (Cg0655)				19 %
	1371,6190	-123,7699	161-172	(R)IPVDQIYSPVLK(V)	
	1548,6190	-118,2542	145-160	(R)GYVPATVTATGGGEIGR(I)	
	2108,8163	-135,5065	21-39	(R)FVIEPLEPGFGYTLGNSLR(R)	
	2118,8263	-127,7414	1-18	(-)MLISQRPITITEEFVNNAR(S)	
23	Amidotransferase für Asp/Glu, β-UE (Cg1420)				23 %
	1438,6894	-7,3862	248-259	(K)SVEQAITFEMQR(Q)	
	1613,8179	-9,2328	298-311	(R)YFNDDPLPPVIAPR(E)	
	1743,8380	-7,6615	260-275	(R)QAQVLDDGGVIDQETR(H)	
	1859,9167	-18,0764	449-465	(K)AVDDALAANPDIVEKYR(A)	
	1925,9633	-15,5721	416-435	(R)QAIDGGVIAGEGDVDAVAAR(G)	
	1996,9047	-23,2206	137-155	(R)AHMEEDTGKLTHLGGTSGR(I)	
	2002,0023	-16,7281	220-237	(R)VDANLSLRPIGQEEFGTR(T)	
24	UDP-N-acetylmuramat-Alanin Ligase (Cg2368)				24 %
	1429,7555	-28,0605	383-394	(R)VIVAFQPHLYSR(T)	
	1494,7830	-25,7409	17-32	(R)VHLIGIGGAGMSGVAR(I)	
	1710,7971	-19,1461	1-16	(-)TTPHLSAEDIDLSR(V)	Acet-N
	1762,7926	-8,5686	205-219	(K)TPEAYFQVDFDFAGR(I)	
	2668,2373	-8,6081	159-184	(K)AGTNAHHGTGEVFIAEDESASLLR(Y)	
	3340,6345	-4,1523	249-281	(K)TVGYGTADAVQAHPPEVPAMATIVDSQVVAEGTR(A)	
25	Fumarase (Cg1145)				26 %
	1089,5107	-53,8095	31-40	(R)AVENFPISGR(G)	
	1101,5203	-54,6683	22-30	(K)ALWQAQTOR(A)	
	1195,5184	-49,9795	268-278	(R)DALVEFSGAMR(V)	
	1722,9259	-35,2447	202-216	(R)QIQLGIERVEATLPR(L)	
	1742,7650	-46,6051	253-267	(K)ELKEAENHFEAQAR(D)	
	2161,9898	-37,3106	182-201	(R)THLMDAVPVTLGQEFGGYAR(Q)	
	2178,0231	-19,3841	182-201	(R)THLMDAVPVTLGQEFGGYAR(Q)	
	2178,0231	-37,2378	217-240	(R)LGELAIGGTAAGTGINTSADFGGK(V)	1-Met-Ox
	2344,0590	-65,9315	433-454	(K)ELAESSPSIVTPLNSAIGYEAALKVAK(T)	
26	Malat-Chinon-Oxidoreduktase (Cg2192)				
	1347,7696	23,1196	87-98	(K)AVGINEKFQVSR(Q)	
	1593,8189	26,8769	196-209	(K)QYLDAAEEVEGTEIR(Y)	
	1632,8633	15,1412	35-47	(R)QLEPSWTQIVFER(L)	
	1634,8779	27,8153	296-311	(K)ASVGAPPMSVPHLDTR(V)	
	1645,8802	28,1973	477-490	(K)LASEPALFEQWAR(T)	
	2098,0816	2,9138	292-311	(K)VYGKASVGAPPMSVPHLDTR(V)	1-Met-Ox
	2194,0929	48,0484	383-401	(R)EYMPEAQNGDWETIVAGQR(V)	
	2307,2123	37,5261	196-215	(K)QYLDAAEEVEGTEIRYGHEVK(S)	
27	Pyruvatkinase (Cg2291)				25 %
	1437,7914	14,7632	370-383	(R)ALVAFTTSGDTAKR(V)	
	1695,8120	8,3481	80-94	(R)FTDGATVWENGETIR(I)	
	1823,9587	10,0468	334-349	(R)FAETDGRVPDLTHIPR(T)	
	1896,9491	19,2589	197-213	(R)SPADAELVHKIMDEEGR(R)	
	1937,8734	10,4983	36-51	(R)LNFSHGDHPDHEQNYK(W)	
	1977,1142	6,1408	245-261	(R)GDLGVEVPLEEVPLVQKR(A)	
	2022,0295	12,3728	77-94	(R)LGRFTDGATVWENGETIR(I)	
	2036,0195	12,6917	95-112	(R)ITVDDVEGTHDRVSTTYK(N)	
	2379,1238	9,2078	36-54	(R)LNFSHGDHPDHEQNYKWVR(E)	
28	ClpB (Cg3079)				16 %
	1364,6545	-72,7630	312-323	(R)LVGATTLNEYRK(Y)	
	1364,6545	-27,6736	702-713	(R)LTGGQGRITVDFR(N)	

Fortsetzung Tabelle 7.2

	1557,7552	-43,9640	367-381	(R)IQDSALVAAEELSNR(Y)	
	1759,8231	-56,7899	387-402	(R)FLPDKAIDLVDAAASR(L)	
	2134,0050	-53,1575	335-353	(R)FQQVYVGEPTVEDAIGILR(G)	
	2247,0238	-52,1359	649-670	(R)LVGAPPGYVGYDQGGQLTEAVR(R)	
	2258,0577	-60,0465	592-614	(R)AGVADPNRPTGSFLFLGPTGVGK(T)	
	2403,1001	-59,0909	649-671	(R)LVGAPPGYVGYDQGGQLTEAVRR(R)	
	2499,0751	-60,1880	150-171	(R)VTTQDPGEQFQALEKYSTDLT(L)	
29	Malatsynthase (Cg2559)				7 %
	1268,6638	-54,2929	156-169	(R)ISGLPVSGAVGGVR(M)	
	1291,6317	-62,3537	30-40	(R)TIRFETGQLAR(Q)	
	1957,0306	-30,9292	463-479	(R)AVLPVIPSREEFPYAIR(Q)	
	2056,8160	-39,6389	429-445	(R)YMHYHNPFPYSTGETGR(V)	
30a	F₁F₀-ATP-Synthase, α-UE (Cg1366)				39 %
	1553,7133	-16,4357	295-307	(R)EAYPGDVFYLHSR(L)	
	1630,8483	-19,7272	94-109	(R)TGDVLSIPVGEAFLGR(V)	
	1786,9528	-16,0952	93-109	(R)RTGDVLSIPVGEAFLGR(V)	
	2087,1193	-14,7410	74-92	(R)VGWVLGNVYELLKEGDQVR(R)	
	2222,1140	-7,4233	110-130	(R)VINPLGQPIDGLGEIASEEDR(V)	
	2385,1249	-13,6421	402-423	(R)DLEAFATFASDLDAASKSOLER(G)	
	2553,2749	-0,9543	222-246	(K)TLEEQGALEYTTIVAAPASDAAGFK(W)	
	2844,4148	-4,1841	509-535	(K)SAFQTTDGTPTVINEPEVEALDAGQVKK(D)	
	3192,5975	-1,0926	334-362	(K)ANDVSAFIPTNVISITDQVFLSDLFNR(G)	
	3526,6519	-5,8766	466-497	(R)RFESELHEYLGSNAAQVVEQIAGGAQLSDESK(E)	
	3570,9542	14,6381	110-142	(R)VINPLGQPIDGLGEIASEEDRVLELQAPTVLER(Q)	
30b	GroEL2 (Cg3011)				17 %
	1509,5770	-60,5563	201-213	(K)GYISGYFATDMER(L)	
	1642,7356	-72,8291	42-57	(K)AWGAPTITNDGVTIAR(E)	
	1899,7364	-64,4069	198-213	(R)FDKGYISGYFATDMER(L)	
	1974,8822	-73,5785	58-74	(R)EIELEDPEYKIGAEVLK(E)	
	2074,9394	-59,1181	80-100	(K)TDDVAGDGTATTATVLAQALVR(E)	
	2203,0111	-66,2198	79-100	(K)KTDDVAGDGTATTATVLAQALVR(E)	
	2360,0343	-67,8675	326-348	(K)VVVTKDDTTIVDGAGSEAQIEGR(V)	
31	GroEL1 (Cg0693)				20 %
	1697,7207	-54,6482	314-328	(K)AYAEFEFGDQKVGVR(A)	
	2375,0749	-50,2061	209-231	(R)ITVSKDETIIVDGAGSAEDVEAR(R)	
	2487,1134	-49,5729	184-207	(K)ATVVDPEVGINLNEAGEEVFGTAR(R)	
	2874,2376	-42,3556	400-426	(R)MVLTTAEASVVEKPAEEAADAHAGHHHH(-)	
32	Glycerolkinase (Cg3198)				13 %
	1587,7592	-95,6084	132-146	(R)TGLLINSYSPGPKIK(W)	
	1587,7592	-56,8567	292-305	(K)ISEHLLSTIAYQR(E)	
	1638,7632	-27,7942	6-21	(K)ANAYVAIDQGTSTR(A)	
	2285,9375	-99,8420	445-467	(R)LEDVETAVGVAFAGLGSGFFK(T)	
33	FtsZ, Zellteilungspotein (Cg2366)				37 %
	1220,4969	-136,8107	305-316	(R)VTVIATGFDAAR(A)	
	1609,5681	-124,0505	231-229	(R)SVMSEAGSALMGVGSAR(G)	
	1615,5604	-115,1415	381-395	(R)SGGGLFTTGNDRDYR(R)	
	1791,7143	-121,2318	166-181	(R)LLELGDANLSIMEAFR(A)	
	1951,8032	-116,9523	121-138	(K)MGALTIGVVTKPFEFEGFR(R)	
	2448,9062	-109,1183	283-304	(R)SDEDVNLIFGTIIDDNLGDEVVR(V)	
	2460,9727	-108,4862	92-119	(K)GADMVFTVAGEGGGTGTGAAPVVAGIAK(K)	
	2734,0151	-110,4513	281-304	(R)ERSEDEDVNLIFGTIIDDNLGDEVVR(V)	
	3503,5055	-87,8779	325-359	(R)AGISAAPAAEPVQQQVPTTATLPPEKESIFGGAR(E)	
34	Enolase (Cg1111)				34 %
	1140,4645	-25,0475	354-363	(R)AGYTSMMSHR(S)	
	1188,5995	-32,1731	120-131	(K)AAADSAGLPLFR(Y)	
	1461,6924	-53,1697	404-417	(R)IEQLLGDAAGVYAGR(S)	
	1735,7606	-60,4643	304-318	(K)VQIVGDDFFVTNPER(L)	
	1864,7983	-56,7087	196-215	(K)GLSTGLGDEGGFAPSVGSTR(E)	
	2117,8988	-61,4394	335-353	(K)VNQIGTLTETFDVAVDMAHR(A)	
	2385,9512	-62,7819	66-87	(K)AVENVNEEIGDELAGEADDQR(L)	
	3598,5405	-48,8310	17-52	(R)GNPTVEAEVFLDDGSHGVAGVPSGASTGVHEAHEL(R)	
35	DnaK (Cg3100)				31 %
	1240,6028	-79,4551	132-143	(K)EAGQIAGLNVLR(I)	
	1294,5493	-69,4423	511-521	(R)NNAESLVYQTR(K)	
	1497,7191	-82,6635	427-441	(K)LLGSFELGGIAPAPR(G)	
	1651,7751	-83,5866	128-143	(R)QATKEAGQIAGLNVLR(I)	
	1668,7971	-85,4255	128-143	(R)QATKEAGQIAGLNVLR(I)	
	1996,8663	-82,1277	299-318	(K)DAGVSVSEIDHVVVLVGSTR(M)	
	2098,8887	-93,2713	45-64	(K)NGEVLVVGSAKNQAVTNVDR(T)	
	2225,0252	-91,7720	420-441	(R)EATANKLLGSFELGGIAPAPR(G)	
	2606,0152	-89,6055	72-94	(R)HIGTDWVSAIDDKNYTSQEISAR(T)	
	2610,9807	-94,5753	397-419	(R)SETFTTAEDNQPSVQIQVFQGER(E)	
	2874,1132	-76,1879	102-127	(R)DAEAYLGEDVTDVAVTPAYFEDSQR(Q)	
	3097,3132	-60,4941	35-61	(K)VLADTYPELNEAFKDSIDKAPEEKER(G)	

pyro-Glu

Fortsetzung Tabelle 7.2				
	3010,3303	-79,5312	4-34	(R)AVGIDLGTNSVSVLEGGEPPVIANAEGRS(T)
	3338,3387	-82,4780	397-426	(R)SETFTTAEDNQPSVQIQVFQGERIATANK(L)
36	Aconitase (Cg1737)			6 %
	1216,4705	-56,0618	163-172	(R)WGSESFNSFR(V)
	1547,7130	-67,9516	771-784	(R)LQNQLVDIAGGYTR(D)
	1873,8793	-65,6717	326-342	(R)LTGRPEEQVALVEAYAK(A)
	2136,8980	-61,8006	394-413	(K)DLPTYTDDAVSVDTSIPATR(M)
37	EF-G (Cg0583)			32 %
	1096,4957	-109,2799	32-40	(R)ILFYTGINR(K)
	1224,5741	-111,3130	32-41	(R)ILFYTGINRK(V)
	1455,5885	-102,0923	233-245	(K)YFGGEELSIAEIK(A)
	1531,6452	-101,5761	306-319	(R)KPSDEEPLSALAFK(A)
	1581,6597	-94,9591	660-673	(K)VPLSQMFGYVGDLR(S)
	1703,6641	-96,2643	142-156	(K)LGADFYFTVGTIEDR(L)
	1780,7630	-100,4918	658-673	(K)AKVPLSQMFGYVGDLR(S)
	1835,7477	-98,8425	472-487	(R)EFKVEANIGDPQVAYR(E)
	1848,7801	-103,0873	334-350	(R)LYSGKVEPGEQVLNSTK(N)
	1928,7906	-101,4778	14-31	(R)NIGIMAHIDAGKTTTTER(I)
	2085,7055	-96,8446	578-596	(K)ATLEDGAYHDVDSSEMAFK(L)
	2167,8969	-97,6960	190-210	(R)GVTPIGTEATVEEIPAEALADR(A)
	2275,7734	-94,7228	42-61	(K)VGETHDGGATTDWMEQEKER(G)
	2615,0699	-92,0125	100-123	(R)VLDGAVAVFDGKEGVEPQSEQVWR(Q)
	2702,0423	-86,9379	680-704	(R)ANYSMVFDSYAEVPANVAADVIAER(N)
38	ClpC (Cg2963)			24 %
	1222,5189	-101,6326	185-195	(R)STSLVLDQFGR(N)
	1283,6105	-103,6353	11-21	(R)RVIVLAQEEAR(M)
	1411,5946	-100,7088	526-536	(R)LLNMEELHKK(I)
	1453,6900	-102,5890	785-797	(R)GFDPVLGARPLRR(T)
	1563,6664	-103,5424	563-578	(K)RPSGSFIFAGPSGVGK(T)
	1632,6873	-104,0506	841-854	(K)FTFTPRPKPMPEGK(F)
	1729,7323	-104,1776	413-428	(R)FLPDKAVDLIDEAGAR(M)
	1794,7373	-103,9009	334-349	(R)GELQTIGATTLDEYRK(H)
	2061,6802	-106,6547	695-714	(K)AVGLGFGSGSETSDAQYDR(M)
	2111,8198	-99,0534	613-632	(R)LFGAPPGYVGYEEGGQLTEK(V)
	2294,0593	-94,4737	360-379	(R)RFQPVQVPEPSVDLTVEILK(G)
	2320,8065	-98,7115	695-716	(K)AVGLGFGSGSETSDAQYDRMK(N)
	2366,9540	-103,2831	613-634	(R)LFGAPPGYVGYEEGGQLTEKVR(R)
	2521,0030	-105,3761	61-83	(R)QVEVEIIGQGPTTGHIPFTPR(A)
	3007,1769	-92,0209	811-838	(K)ILFGEIGAGEIVTDVVEGWDGESKDTDR(A)

Danksagung

Prof. Dr. Michael Bott möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die vielen Ratschläge, das Interesse am Fortgang dieser Arbeit und der kritischen Durchsicht dieses Manuskripts sowie für die Möglichkeit dieser Promotion danken.

PD Dr. Ulrich Schulte danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am IBT-1 und seinem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ebenso danke ich Dr. Steffen Schaffer, Dr. Sabine Engels-Schwartzlose und Carsten Ludwig für die initialen Arbeiten zu diesem Projekt.

Für die wunderbare Atmosphäre im Labor, im Büro und darüber hinaus danke ich allen ehemaligen und jetzigen Institutsangehörigen Melanie Bocker, Michael Bußmann, Sabine Engels-Schwartzlose, Verena Engels, Sabina Enns, Julia Frunzke, Lena Gebel, Tobias Georgi, Tanja Gerharz, Sonja Hasenbein, Armin Kabus, Nadine Koerfer, Andreas Krug, Christian Lange, Steffen Linder, Axel Niebisch, Christina Mack, Martina Mičková, Kerstin Morjan, Tino Polen, Sarah Schaaf, Steffen Schaffer, Christian Schultz, Michael Stolz, Brita Weil, Mirja Wessel, Marc Wingens und Daniela Zaade sowie alle, die ich hier vergessen habe.

Großer Dank gebührt André Laude, Nadine Koerfer, Martin Händel, Thomas Filbry, Eva Pallutz, Angela Linder, Frank Brosowski und Stephan Seel, die mir immer noch die Treue halten.

Mein besonderer Dank geht an Thorsten Kramer. Vielen Dank für die langjährige Freundschaft, die Unterstützung und die gemeinsam verlebte Zeit.

Silke Rosnowsky danke ich ebenso für die aufopfernde und liebevolle Unterstützung, für das offene Ohr für meine Probleme und Sorgen, für alle gemeinsam durchgemachten Hochs und Tiefs und für die wunderschöne Zeit.

Meinen Eltern und meinen „kleinen Schwestern“ sowie meiner ganzen Familie danke ich für den Mut, den sie mir immer wieder zugesprochen haben, für ihre große Unterstützung und ihr Verständnis nicht nur während der gesamten Promotion.

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

Band | Volume 8
ISBN 978-3-89336-528-9